



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
CAMPUS PROFESSORA CINOBELINA ELVAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS

VANESSA FIGUEIREDO DUARTE VIEIRA

DISCRIMINAÇÃO DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS USANDO
ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE
FOURIER ACOPLADA A REFLECTÂNCIA TOTAL ATENUADA E ANÁLISE
MULTIVARIADA

Bom Jesus - PI

2023

VANESSA FIGUEIREDO DUARTE VIEIRA

**DISCRIMINAÇÃO DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS USANDO
ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE
FOURIER ACOPLADA A REFLECTÂNCIA TOTAL ATENUADA E ANÁLISE
MULTIVARIADA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias - PPGCA, Campus Professora Cinobelina Elvas - CPCE, da Universidade Federal do Piauí - UFPI, na área de concentração Produção Vegetal como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias.

Orientadora: Profa. Dra. Francisca Diana da Silva Araújo

Bom Jesus - PI

2023

FICHA CATALOGRÁFICA

Universidade Federal do Piauí

Biblioteca Setorial do Campus Professora Cinobelina Elvas Serviço de
Processamento Técnico

- V658d** Vieira, Vanessa Figueiredo Duarte.
Discriminação de fungos fitopatogênicos usando
espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier
acoplada a reflectância total atenuada e análise multivariada./
Vanessa Figueiredo Duarte Vieira. – 2023.
44 f.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí,
Campus Professora Cinobelina Elvas, Programa de Pós-
graduação em Ciências Agrárias, Bom Jesus-PI, 2023.
Orientação: “Profa. Dra. Francisca Diana da Silva
Araújo”.
1. Plantas-doenças. 2. Fungos fitopatogênicos.
3. Macrophomina. 4. Pseudofusicoccum. I. Vieira,
Vanessa F. Duarte. II. Araújo, Francisca Diana da
Silva. III. Título.

CDD 632

Elaborado por Sérvulo Fernandes da Silva Neto – CRB-15/603

VANESSA FIGUEIREDO DUARTE VIEIRA

**DISCRIMINAÇÃO DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS USANDO
ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE
FOURIER ACOPLADA A REFLECTÂNCIA TOTAL ATENUADA E ANÁLISE
MULTIVARIADA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias, do Campus Professora Cinobelina Elvas, da Universidade Federal do Piauí, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias.

Área de Concentração: Produção Vegetal

Linha de Pesquisa: Proteção de Plantas.

Aprovada em 31 de agosto de 2023.

BANCA EXAMINADORA



Documento assinado digitalmente

FRANCISCA DIANA DA SILVA ARAÚJO

Data: 03/09/2024 08:43:46-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Francisca Diana da Silva Araújo (UFPI/CPCE)
Orientadora



Documento assinado digitalmente

WEVERSON LIMA FONSECA

Data: 29/08/2024 09:02:05-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Wéverson Lima Fonseca (UFPI/CTBJ)
Examinador Externo ao Programa



Documento assinado digitalmente

RAIMUNDO CLECIO DANTAS MUNIZ FILHO

Data: 23/08/2024 08:58:02-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Raimundo Clécio Dantas Muniz Filho (UEMA)
Examinador Externo à Instituição

RESUMO

Fungos fitopatogênicos são os principais agentes causadores de doenças severas em plantas, gerando perdas significativas na produção agrícola. Neste sentido, a identificação rápida e precoce de fitopatógenos é fundamental para o direcionamento das estratégias de manejo e controle eficaz de doenças a fim de prevenir ou reduzir sua gravidade. O objetivo deste estudo foi realizar a caracterização e discriminação de diferentes espécies de fungos fitopatogênicos usando a técnica de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier acoplada a reflectância total atenuada (ATR-FTIR, do inglês *Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) e análise multivariada para classificação. Foram utilizadas 5 espécies de fungos dos gêneros *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Macrophomina*, *Neoscytallidium* e *Pseudofuicoccum*, isolados de culturas agrícolas, frutíferas e plantas ornamentais. A discriminação e classificação das amostras fúngicas foi conduzida usando diferentes regiões de impressão digital dos espectros de ATR-FTIR e o método supervisionado de análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA, do inglês *partial least squares-discriminant analysis*). Os resultados mostraram que as regiões I (800–1800 cm^{-1}) e III (800-1800 cm^{-1} e 2800-2990 cm^{-1}) podem ser usadas como biomarcadores espectroscópicos para diferenciação e classificação dos fungos por ATR-FTIR, uma vez que o PLS-DA revelou qualidade de ajuste e predição satisfatórias gerando valores de $Q^2 = 0,60$, $R^2 = 0,96$ e precisão = 0,52 na validação cruzada. As bandas de absorção no infravermelho de maior relevância na separação das classes foram as vibrações de estiramento C–C, de estiramento C–O de fosfodiéster e flexões das ligações C–H de amida III. Este método pode ser uma importante ferramenta de diagnóstico no setor agrícola para manejo de doenças, considerando que pode fornecer a extensão da diferenciação e/ou similaridade biológica entre isolados fúngicos.

Palavras-chave: Assinatura espectral; PLS-DA; *Colletotrichum*; *Fusarium*; *Macrophomina*; *Neoscytallidium*; *Pseudofuicoccum*

ABSTRACT

Plant pathogenic fungi are the main causative agents of diseases associated with significant productivity losses in agriculture. Thus, the rapid and early identification of plant pathogens is essential for directing effective management and control strategies for diseases to prevent or reduce their severity. The objective of this study was to characterize and discriminate different species of plant pathogenic fungi using the Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR) spectroscopy technique and chemometric analysis. Five fungal species of the genera *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Macrophomina*, *Neoscytalidium*, and *Pseudofuicoccum*, isolated from agricultural crops, fruit tree, and ornamental plant, were used. Discrimination of the fungal samples was conducted using different fingerprint regions of ATR-FTIR spectra and the partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA). The results showed that regions I (800–1800 cm^{-1}) and III (800–1800 cm^{-1} and 2800–2990 cm^{-1}) can be used as spectroscopic biomarkers for differentiation and classification of fungi by ATR-FTIR, as the PLS-DA revealed adjustment quality and satisfactory prediction, generating values of $Q^2 = 0.60$, $R^2 = 0.96$ and precision = 0.52 in cross-validation. The most relevant infrared absorption bands in the separation of classes were the vibrations of C–C stretching, C–O stretching of phosphodiester and bending of C–H bonds of amide III. This method can be an important diagnostic tool in the agricultural sector for disease management, considering that it can provide the biological differentiation and/or similarity between fungal species.

Keywords: Spectral signature; PLS-DA; *Colletotrichum*; *Fusarium*; *Macrophomina*; *Neoscytalidium*; *Pseudofuicoccum*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Registro do fungo <i>Colletotrichum gossypii</i> f. sp., e de conídios do fungo <i>Colletotrichum</i> sp. observados em microscópio.....	12
Figura 2 - Registro do fungo crescido e de esporos do <i>Fusarium sambucinum</i> observados em microscópio.....	13
Figura 3 - Registro do fungo crescido e de células individuais de <i>Neoscytalidium dimidiatum</i> analisadas em microscópio.....	14
Figura 4 - Registro do fungo crescido e de células individuais de <i>Macrophomina</i> analisadas por microscópio.....	15
Figura 5 - Registro do fungo crescido e de células individuais do <i>Pseudofusicoccum</i> analisadas por microscópio.....	16
Figura 6 - Representação esquemática do espectro eletromagnético.....	18
Figura 7 - Representação das vibrações de estiramento e de flexão.....	19
Figura 8 - Espectros de ATR-FTIR de <i>Colletotrichum truncatum</i> COUFPI 226 (CS), <i>Fusarium Sacchari</i> COUFPI 55 (FS), <i>Macrophomina Phaseolina</i> COUFPI 10 (MP), <i>Neoscytallidium Dimidiatum</i> COUFPI 239 (NT) e <i>Pseudofuicoccum Stromaticum</i> COUFPI 36 (PS).....	27
Figura 9 - Gráficos de escores 2D de PLS-DA obtidos a partir dos espectros de ATR-FTIR de <i>Colletotrichum truncatum</i> COUFPI 226 (CS), <i>Fusarium Sacchari</i> COUFPI 55 (FS), <i>Macrophomina Phaseolina</i> COUFPI 10 (MP), <i>Neoscuytallidium Dimidiatum</i> COUFPI 239 (NT) e <i>Pseudofuicoccum Stromaticum</i> COUFPI 36 (PS).....	29
Figura 10 - Validação cruzada do modelo de PLS-DA para as regiões I e III do espectro de ATR-FTIR das cepas de fitopatógenos através das variantes 5-fold e leave-one-out.....	31
Figura 11 - Teste de permutação do modelo de PLS-DA baseado na distância de separação para as regiões I e III.	32
Figura 12 - Escores VIP acima de 1,4 derivados do modelo de PLS-DA para as componentes 1, 2 e 3 usando as regiões I dos espectros de ATR-FTIR das cepas fúngicas.....	33

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

ATR	Reflectância Total Atenuada
CS	<i>Colletotrichum truncatum</i>
FS	<i>Fusarium Sacchari</i>
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier
IR	Radiação Infravermelha
MP	<i>Macrophomina Phaseolina</i>
NS	<i>Pseudofuicoccum Stromaticum</i>
NT	<i>Neoscuytallidium Dimidiatum</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PLS-DA	Análise Discriminantes de Quadrados Mínimos Parciais

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	09
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	11
2.1	Etiologia e aspectos gerais dos fungos.....	11
2.1.1	Colletotrichum.....	12
2.1.2	Fusarium.....	13
2.1.3	Neoscytalidium.....	14
2.1.4	Macrophomina.....	15
2.1.5	Pseudofusicoccum.....	16
2.2	Métodos convencionais de identificação fúngica.....	17
2.3	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier acoplada reflectância total atenuada (ATR-FTIR) aplicada na caracterização de fungos.....	18
2.4	ATR-FTIR e análise multivariada na classificação de fungos.....	21
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1	Cepas fúngicas.....	24
3.2	Preparação das amostras.....	24
3.3	Análises por ATR-FTIR.....	25
3.4	Processamento de dados e análise quimiométrica.....	25
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	27
4.1	Caracterização das bandas de absorção infravermelha de fungos fitopatogênicos.....	27
4.2	Classificação dos fungos fitopatogênicos por espectroscopia ATR-FTIR e método PLS-DA.....	28
4.3	O PLS-DA surge como método efetivo para caracterização de fungos fitopatogênicos.....	34
5	CONCLUSÃO.....	36
	REFERÊNCIAS.....	37

1 INTRODUÇÃO

Os danos causados por fungos patogênicos às culturas incluem redução da produtividade e qualidade do produto, morte de plantas, redução da resistência a estresses ambientais e propagação de doenças (Singh; Sharma; Singh, 2020). Calcula-se que fitopatógenos contribuam com aproximadamente 13,3% dos danos, enquanto plantas invasoras representam 13,2% e insetos juntamente com ácaros somam 15,6% das perdas (Kreyci; Menten, 2013). Portanto, é crucial identificar rapidamente os sintomas e o agente patogênico para implementar medidas de controle eficazes.

Atualmente, a identificação de fungos é baseada em uma abordagem polifásica usando características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e moleculares (Gannibal, 2022). Os métodos clássicos e ferramentas de identificação moleculares possuem as desvantagens de serem demorados, caros e disponíveis apenas para determinados táxons (Santos *et al.*, 2010).

A espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier acoplada à espectroscopia de refletância total atenuada (ATR-FTIR, do inglês *Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) é uma técnica de amostragem que quando usada em conjunto com a espectroscopia no infravermelho, se torna uma ferramenta poderosa para a caracterização e diferenciação de fungos, envolvendo um preparo mínimo de amostra, análise direta, velocidade, automação e baixo custo (Santos *et al.*, 2010), podendo ser utilizada em conjunto com métodos convencionais de identificação fúngica.

A espectroscopia ATR-FTIR combinada com análise de componentes principais (PCA), seguida de análise discriminante linear (LDA), foi aplicada na classificação de isolados de *Colletotrichum coccodes* (Salman *et al.*, 2012) e *Fusarium oxysporum* (Salman *et al.*, 2011) e na diferenciação de patógenos fúngicos transmitidos pelo solo (Huleihel *et al.*, 2018). ATR-FTIR e quadrados mínimos parciais (PLS) foram utilizadas para a caracterização e quantificação espectral de *Phakopsora pachyrhizi* (Fantin *et al.*, 2019). Cepas de *Trichoderma* foram caracterizadas por ATR-FTIR e métodos multivariados não supervisionados (Fantin *et al.*, 2022).

Dentre as ferramentas quimiométricas, a Análise Discriminantes de Quadrados Mínimos Parciais (PLS-DA) é um método estatístico usado para tarefas de predição e classificação, captando a relação entre variáveis preditoras e variáveis respostas de interesse, separando ou discriminando ao máximo, diferentes classes ou grupos. O PLS-DA é de interesse desse estudo, por sua capacidade de lidar com dados de alta dimensão e lidar com problemas

de multicolinearidade (Barker; Rayens, 2003). Os estudos metabolômicos resultam em conjuntos de dados multivariados complexos com correlações de variáveis entre os níveis de metabólitos medidos, dessa forma, faz necessário uma atenção em qual análise de dados multivariado será mais bem utilizado para explorar esses conjuntos de dados complexos (Szymańska et al., 2012).

Não foram encontrados registros na literatura envolvendo a caracterização por ATR-FTIR de espécies dos gêneros *Macrophomina*, *Neoscytallidium* e *Pseudofuicoccum*, além das espécies *Colletotrichum truncatum* e *Fusarium sacchari*.

Dessa forma, o objetivo deste estudo foi realizar a caracterização e discriminação de diferentes espécies de fungos fitopatogênicos dos gêneros *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Macrophomina*, *Neoscytallidium* e *Pseudofuicoccum* usando a técnica de ATR-FTIR e o método de análise supervisionada PLS-DA para classificação.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Etiologia e aspectos gerais dos fungos

Os primeiros registros fósseis de fungos datam de cerca de 1 bilhão de anos atrás, embora acredite-se que eles possam ter surgido muito antes disso. Os fungos desempenharam um papel fundamental na colonização dos ambientes terrestres, pois foram os primeiros organismos a desenvolver a capacidade de decompor a matéria orgânica, permitindo a reciclagem de nutrientes e o enriquecimento dos solos (Galembeck; Costa, 2016).

Ao longo da história, os fungos têm desempenhado diversos papéis ecológicos e econômicos. Alguns fungos possuem simbiose com as plantas, formando associações mutualísticas conhecidas como micorrizas, em que auxiliam na absorção de nutrientes pelas raízes das plantas. Porém, os fungos que infectam plantas, conhecidos como fitopatógenos, representam uma ameaça para a agricultura e a produção de alimentos, que pode levar a perdas significativas de colheitas e danos econômicos (Abreu *et al.*, 2022).

Os fitopatógenos fúngicos são responsáveis por doenças como oídio, ferrugem, míldio, podridão de raízes, podridão de frutas e manchas foliares, entre outras. Essas doenças podem afetar diversas partes das plantas, incluindo folhas, caules, flores, frutos e raízes (Abreu *et al.*, 2022; Romero-Marcano; Silva-Acuña; Sánchez-Cuevas, 2022).

Uma vez que os fungos infectam uma planta, eles invadem os tecidos vegetais e se alimentam de nutrientes, causando danos estruturais e fisiológicos. Isso pode levar a sintomas visíveis, como manchas, deformações, murcha, necrose, queda prematura de folhas e redução na produção de frutos (Ciampi; Radie; Alvarez, 2007; Abreu *et al.*, 2022; Romero-Marcano *et al.*, 2022;).

Neste trabalho, foram utilizadas espécies de fungos fitopatogênicos dos gêneros *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Macrophomina*, *Neoscytallidium* e *Pseudofuicocum*, os quais serão abordados a seguir.

2.1.1 *Colletotrichum*

O gênero *Colletotrichum* (Figura 1) atualmente consiste em mais de 257 espécies, incluindo patógenos vegetais e endófitos. Pertencente a classe *Coelomycetes*, é um fungo com uma extensa diversidade de espécies e distribuição de hospedeiros, sendo extensivamente estudado em diferentes regiões do mundo (Liu *et al.*, 2022). O *Colletotrichum* inclui espécies fúngicas que causam doenças antracnoses em várias plantas, afetando a produção e a qualidade dos frutos.

Espécies de *Colletotrichum* foram identificadas no Brasil, causando doenças em várias culturas, como chuchu, uva e mamão. No chuchu, uma nova espécie patogênica chamada *Colletotrichum menezesiae* sp. foi isolada, formando um clado distinto dentro do complexo de espécies de *C. orbiculare* (Vieira *et al.*, 2023). Na uva, *Colletotrichum siamense* foi identificado como o agente causal da podridão madura, que é uma preocupação significativa para a produção de uvas no Brasil (Batista *et al.*, 2023).

Além disso, descobriu-se que *Colletotrichum* spp., incluindo *C. melonis* e *C. nymphaeae*, causam manchas foliares de glomerela e podridão amarga em pomares de maçã no sul do Brasil (Gelain *et al.*, 2022). No mamão, várias espécies de *Colletotrichum* foram identificadas, incluindo *C. chrysophilum*, *C. fructicola*, *C. gloeosporioides*, *C. karsti*, *C. okinawense*, *C. plurivorum*, *C. queenslandicum*, *C. siamense*, *C. theobromicola* e *Colletotrichum truncatum*. Essas descobertas destacam a diversidade e a prevalência das espécies de *Colletotrichum* no Brasil, enfatizando a necessidade de estratégias eficazes de manejo de doenças nas práticas agrícolas (Souza; Gomes; Rodrigues, 2022).

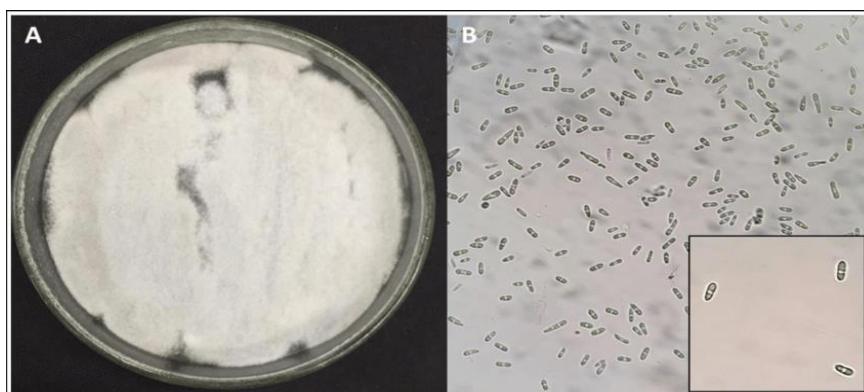


Figura 1 – Registro do fungo crescido do *Colletotrichum gossypii* f. sp., cefalosporioides (A), e conídios do fungo de *Colletotrichum* sp. observados em microscópio (B). Fonte: Puia *et al.* (2020).

A disseminação dos fungos do gênero *Colletotrichum* ocorre principalmente por meio de esporos produzidos em estruturas chamadas acérvulos. Esses esporos são facilmente disseminados pelo vento, água, insetos, animais e podem sobreviver em restos de plantas ou solo por longos períodos. E em condições favoráveis, como alta umidade e temperaturas moderadas, promovem a germinação dos esporos e a infecção das plantas hospedeiras (Hyde *et al.*, 2009; Damm *et al.*, 2012).

2.1.2 *Fusarium*

Para o gênero *Fusarium* (Figura 2), atualmente, existem 190 espécies aceitas de *Colletotrichum*, com 11 complexos de espécies e 23 espécies únicas (Sokolova; Egorova; Hovrin, 2021). Esses fungos são encontrados em todo o mundo e são conhecidos por sua capacidade de sobreviver no solo e em restos de plantas por longos períodos (Ciampi; Radie; Alvarez, 2007).

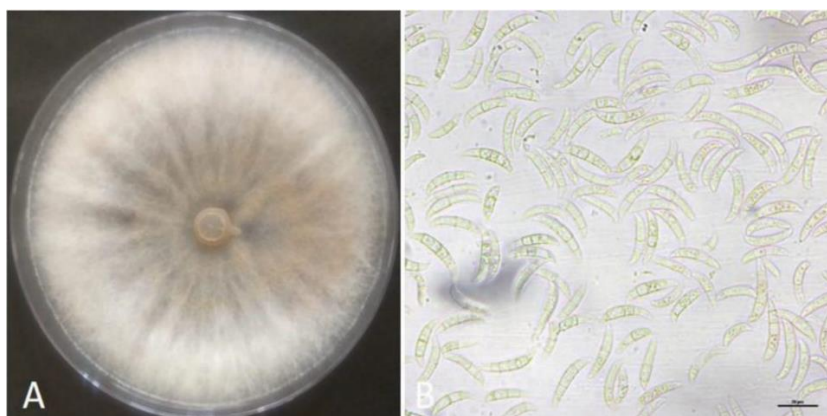


Figura 2 – Registro do fungo crescido (A) e de esporos (B) do *Fusarium sambucinum* observados em microscópio. Fonte: Tiwari *et al.* (2023).

Os fungos do gênero *Fusarium* são classificados como ascomicetos, pertencentes à ordem Hypocreales. Eles produzem estruturas reprodutivas conhecidas como conídios, que são facilmente disseminados pelo vento, água, insetos e equipamentos agrícolas. Além disso, algumas espécies também produzem estruturas de resistência chamadas clamidósporos, que podem sobreviver em condições desfavoráveis e contribuir para a disseminação do fungo (Ma *et al.*, 2013).

Esses fungos podem causar a murcha vascular, podridão de raízes, podridão de frutos, manchas foliares e *ear rot* (podridão de espiga) em cereais necrose, descoloração, deformação

e, em casos graves, morte das plantas. A infecção por *Fusarium* torna-se conveniente em condições ambientais favoráveis. Logo, nessas condições a planta encontrando-se com feridas, raízes danificadas ou a semente infectada propicia a germinação dos esporos (Ma *et al.*, 2013; Summerell, 2019).

No Brasil há uma grande preocupação na produção de melão, com *F. falciforme*, *F. sulawesiense*, *F. perambucanum*, *F. kalimantanense* e *Fusarium sp* (Ambrósio, 2022). Além disso, *Fusarium pseudocircinatum* foi relatado como um patógeno que causa nanismo e malformação em plantas de girassol no Brasil. Essas descobertas destacam a diversidade e o impacto das espécies de *Fusarium* em várias culturas no Brasil (Almeida, 2022).

2.1.3 *Neoscytalidium*

O gênero *Neoscytalidium* (Figura 3) abrange um grupo de fungos filamentosos que são amplamente distribuídos na natureza. Esses fungos pertencem à classe dos *Dothideomycetes*, e podem ser encontrados em uma variedade de habitats, incluindo solo, plantas e materiais vegetais em decomposição. Eles causam infecções que geralmente resultam em sintomas como declínio da saúde das plantas, murcha, necrose de tecidos e, em alguns casos, a morte das plantas. Essas doenças podem afetar uma ampla variedade de hospedeiros, incluindo árvores frutíferas, árvores ornamentais, palmeiras, videiras e arbustos (Ciampi; Radie; Alvarez, 2007; Bunyaratavej *et al.*, 2016).

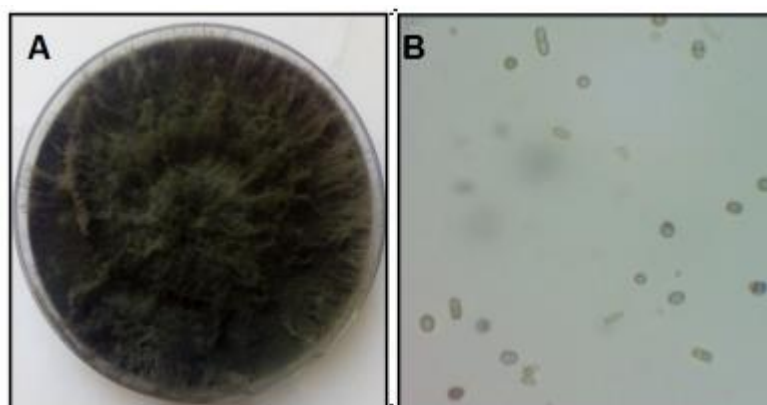


Figura 3 – Registro do fungo crescido (A) e de células individuais (B) de *Neoscytalidium dimidiatum* observados em microscópio. Fonte: Zeinab *et al.* (2019).

Os fungos do gênero *Neoscytalidium*, se disseminam através de esporos que são produzidos em estruturas chamadas conídios, que em condições de alta umidade e temperaturas moderadas tornam-se beneficiados para a germinação. Esses conídios podem ser disseminados pelo vento, água, insetos, ferramentas agrícolas ou mesmo por meio de lesões presentes nas plantas (Bunyaratavej *et al.*, 2016).

2.1.4 *Macrophomina*

O gênero *Macrophomina* (Figura 4) é representado por mais de três espécies, incluindo *M. phaseolina*, *M. pseudophaseolina* e *M. euphorbiicola*, pertencente à classe *Sordariomycete* e engloba um grupo de fungos fitopatogênicos que podem causar doenças em várias plantas cultivadas em todo o mundo. Esses fungos são classificados como fungos ascomicetos, pertencentes à ordem *Botryosphaeriales*, e conhecidos por sua capacidade de sobreviver em condições adversas do solo e por causarem doenças comuns em diversas culturas (Ciampi; Radie; Alvarez, 2007).

Eles podem ser encontrados principalmente no solo, onde formam estruturas de resistência conhecidas como clamidósporos. Essas estruturas permitem que os fungos sobrevivam em condições desfavoráveis, como altas temperaturas e falta de umidade, por longos períodos (Marquez *et al.*, 2021).

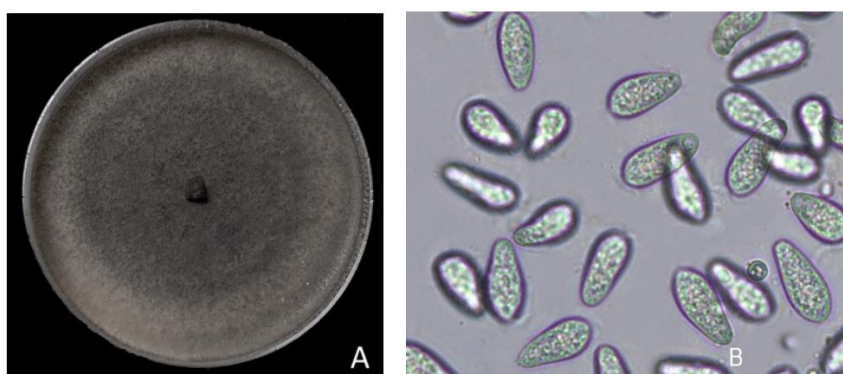


Figura 4 – Registro do fungo crescido (A) e de células individuais (B) de *Macrophomina* analisadas por microscópio. Fonte: Nouri *et al.* (2020).

As doenças causadas pelos fungos do gênero *Macrophomina* são conhecidas como podridão de colo e raízes, ou "podridão carvão". Essas doenças afetam várias culturas, incluindo cereais, oleaginosas, hortaliças, plantas ornamentais e árvores frutíferas. Os sintomas variam,

mas podem incluir murcha, amarelecimento das folhas, necrose dos tecidos e, em casos graves, a morte das plantas (Dhingra; Sinclair, 1978; Marquez *et al.*, 2021).

A disseminação dos fungos do gênero *Macrophomina* ocorre principalmente através de clamidósporos presentes no solo contaminado. Os clamidósporos podem ser transportados por água, vento, implementos agrícolas ou animais, e podem infectar as plantas através de feridas ou raízes danificadas. As condições favoráveis para a infecção incluem altas temperaturas, baixa umidade e estresse nas plantas. O manejo das doenças causadas pelos fungos do gênero *Macrophomina* é um desafio, uma vez que eles têm a capacidade de sobreviver no solo por longos períodos e a falta de medidas eficazes de controle (Marquez *et al.*, 2021).

2.1.5 *Pseudofusicoccum*

O gênero *Pseudofusicoccum* (Figura 5) é composto por fungos filamentosos que pertencem à família Botryosphaeriaceae. Esses fungos são conhecidos por causar doenças em várias espécies de plantas, incluindo árvores frutíferas, plantas ornamentais e culturas agrícolas (Sharma; Kulkarni; Shouche, 2013).

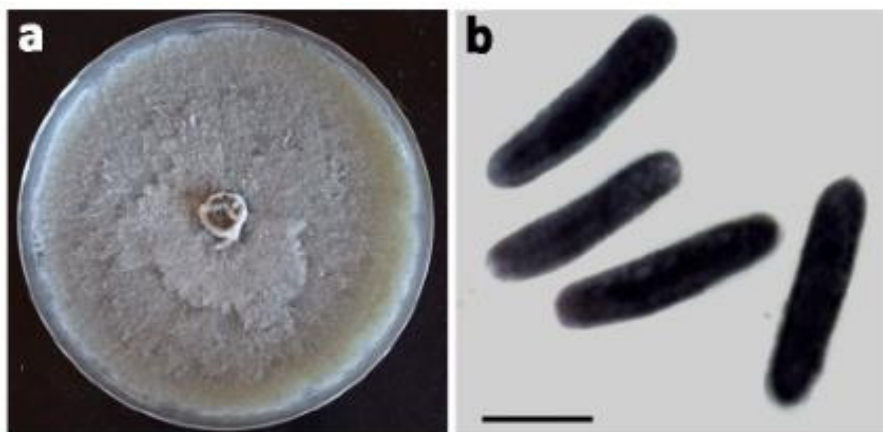


Figura 5 – Registro do fungo crescido (A) e de células individuais (B) do *Pseudofusicoccum* analisadas por microscópico. Fonte: Sessa; Abreo; Lupo (2021).

Os fungos do gênero *Pseudofusicoccum* são classificados como ascomicetos e são encontrados em todo o mundo. Eles têm a capacidade de colonizar os tecidos das plantas, causando sintomas como manchas foliares, cancro, necrose de ramos e podridão de frutos. Essas doenças podem resultar em danos significativos às plantas e afetar a produção agrícola e a qualidade dos produtos (Li *et al.*, 2023).

Sua disseminação ocorre principalmente por meio de esporos produzidos em estruturas chamadas picnídios. Esses esporos podem ser transportados pelo vento, água, insetos, ferramentas agrícolas e podem ser disseminados através de lesões presentes nas plantas (Sharma; Kulkarni; Shouche, 2013; Li *et al.*, 2023).

2.2 Métodos convencionais de identificação fúngica

Uma variedade de métodos encontra-se empregada no âmbito da identificação de fungos, uma tarefa desafiadora em virtude das intrincadas características inerentes a esses microorganismos. A cultura e análise morfológica emergem como pilares incontestáveis nesse contexto, pressupondo o isolamento do fungo em um meio de cultura e subsequente análise de suas características visuais, incluindo forma, dimensões, coloração e padrões de crescimento. Por sua vez, a microscopia, enquanto ferramenta fundamental, outorga uma perscrutação minuciosa, viabilizando a observação de traços microscópicos distintivos, como esporos e hifas, que frequentemente constituem indicadores para uma identificação acurada (Martins; Menten; Sanguino, 2009; Calumby *et al.*, 2019).

Adicionalmente, a avaliação bioquímica assume um papel proeminente, implicando na exploração das atividades enzimáticas e reações metabólicas específicas de cada espécie fúngica. Este método propicia um vislumbre das nuances bioquímicas singulares a cada gênero, contribuindo para o processo discriminativo. Paralelamente, os testes sorológicos revestem-se de relevância ao detectar antígenos ou anticorpos específicos, conferindo uma abordagem de cunho imunológico à tarefa identificativa (Martins; Menten; Sanguino, 2009).

Todavia, à medida que a biotecnologia e a genômica corroboram avanços científicos, técnicas mais sofisticadas, a exemplo do sequenciamento de DNA, assumem uma posição preponderante no quadro das ferramentas empregadas na identificação precisa de fungos. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) amplifica seções genômicas peculiares, facultando um exame molecular detalhado, enquanto os testes de metabolismo abrem perspectivas ao explorar respostas fisiológicas dos fungos perante uma variedade de substratos e condições (Martins; Menten; Sanguino, 2009; Leal *et al.*, 2019).

Em face da complexidade e diversidade que tipificam o reino dos fungos, com frequência, a combinação sinérgica destas diversas abordagens se manifesta como um requisito

inelutável para uma elucidação fidedigna, propiciando uma visão multifacetada e holística na condução da identificação fúngica.

2.3 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier acoplada reflectância total atenuada (ATR-FTIR) aplicada na caracterização de fungos

A Espectroscopia de ATR-FTIR tem se mostrado uma ferramenta eficaz e promissora na caracterização e classificação de fungos. Essa abordagem utiliza a interação entre radiação infravermelha e a superfície da amostra, permitindo uma análise direta e não destrutiva das propriedades moleculares dos fungos (Wenning; Scherer, 2013; Skolik; Mcainsh; Martin, 2019).

O uso da radiação no infravermelho (IV) começou por volta de 1900 e os primeiros espectrômetros por transformada de Fourier surgiram na década de 1960, utilizando o interferômetro de Michelson (Coblentz, 1908). Foi somente na década de 1970 que o uso do FTIR se tornou popular e atualmente pode ser aplicado para qualquer tipo de composto. A região IV é subdividida em próximo (*NIR*, do inglês *near infrared*), médio (*MIR*, do inglês *mid infrared*) e distante (*FIR*, do inglês *far infrared*) (Figura 6), sendo o *MIR* a região mais comumente utilizada para a identificação microbiana (Naumann, 2000; Balan, *et al.*, 2019).

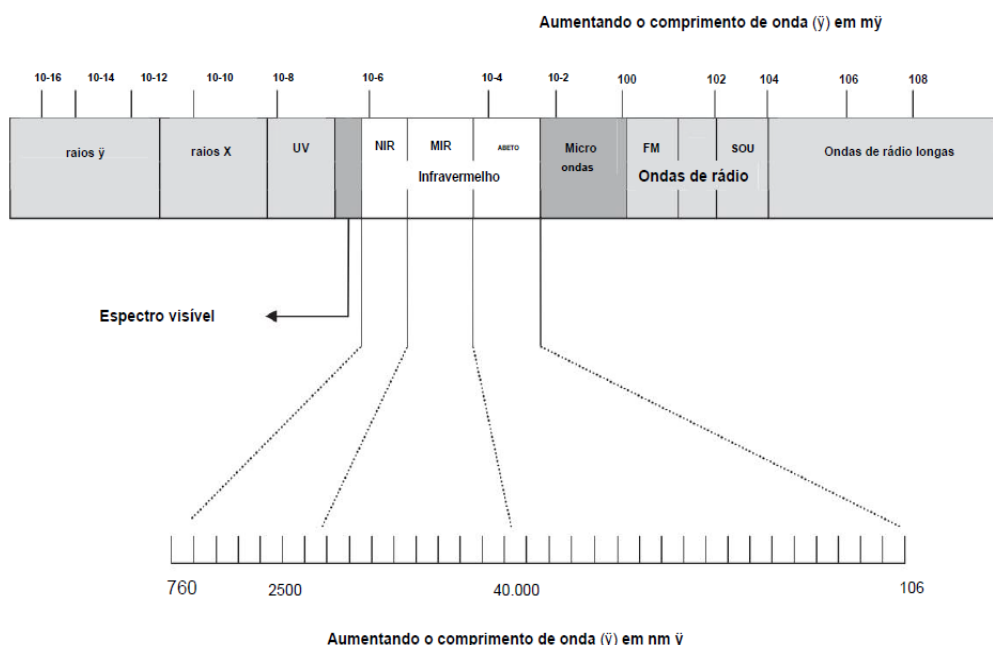


Figura 6 – Representação esquemática do espectro eletromagnético. Fonte: Santos *et al.* (2010).

O princípio básico do FTIR envolve a passagem de luz infravermelha através de uma amostra e a medição da quantidade de luz transmitida ou absorvida em diferentes comprimentos de onda, tendo a capacidade de transmitir simultaneamente todos os comprimentos de onda da luz infravermelha média através de uma amostra, resultando em uma significativa melhoria na taxa de amostragem e ampliando-a em várias ordens de magnitude. Essa técnica envolve um feixe de referência que aproveita o fenômeno da interferência construtiva e destrutiva entre esses feixes e a amostra, resultando em algo conhecido como interferômetro (Silverstein, 2005).

A interferência construtiva e destrutiva da luz infravermelha, se dá através da energia suficiente para excitar as vibrações moleculares, resultando em diferentes modos de vibração, como as vibrações de estiramento e de flexão (Figura 7) dos grupos funcionais presentes na amostra (Morgano *et al.*, 2017).

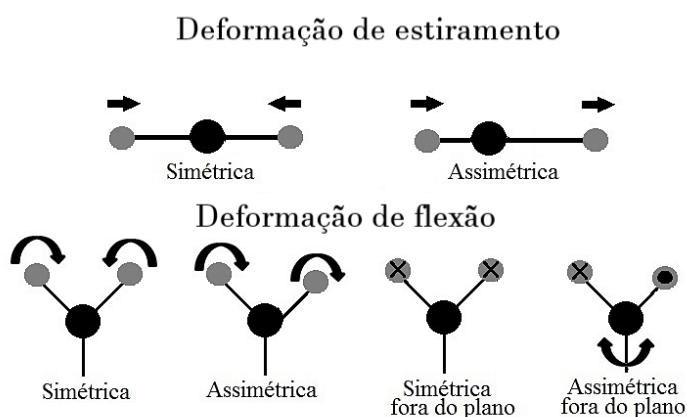


Figura 7 - Representação das vibrações de estiramento e de flexão. Fonte: Adaptado de Macedo (2017).

Quando a radiação infravermelha (IR) é absorvida, é possível observar as vibrações moleculares, desde que ocorra uma alteração geral no seu dipolo. Cada uma dessas mudanças dipolares identificáveis, manifesta-se em faixas de frequência específicas, as quais dependem da estrutura química da molécula e das ligações que ela possa ter com outras estruturas. É importante notar que diferentes grupos funcionais podem vibrar em frequências parecidas, o que pode dificultar a distinção durante a análise espectral de IR. Essa situação ocorre frequentemente em moléculas e misturas complexas, como as presentes em organismos vivos, podendo ainda obter informações composicionais valiosas por meio dessas análises (Mayo, 2004).

Ao realizar a análise de uma amostra com um espectrômetro FTIR e obter o resultado do interferômetro, aplica-se a transformada de Fourier e gera o espectro das intensidades das

vibrações moleculares em função do número de onda ou comprimento de onda. Cada composto químico possui um conjunto único de bandas de absorção, formando uma espécie de "impressão digital" que permite sua identificação (Lecellier *et al.*, 2014).

Uma das limitações da FTIR é que, se as amostras são muito espessas, uma quantidade insuficiente de luz passa pela amostra para detecção. Uma alternativa ao processamento de amostras é usar a reflectância total atenuada (ATR) para garantir que a intensidade de luz suficiente seja transmitida. O feixe infravermelho é direcionado para o cristal em um ângulo menor que o ângulo crítico, refletindo totalmente e internamente na superfície superior do cristal e sendo direcionado para o detector. A avaliação da amostra é realizada pela análise dos picos de radiação eletromagnética que incide sob o cristal e detecta na amostra um componente bioquímico, sendo a análise do espectro realizada para investigar regiões que podem variar de acordo com espécie ou função (Legner; Meinen; Rauber, 2018; Fantin *et al.*, 2022).

Ao examinar as frequências de vibração de diferentes grupos funcionais presentes nos componentes celulares dos fungos, como proteínas, lipídios, carboidratos e ácidos nucleicos, a técnica de ATR-FTIR pode fornecer uma "impressão digital" molecular única para cada espécie de fungo. Esses padrões moleculares podem ser usados para identificar e distinguir espécies de fungos, bem como para analisar variações entre cepas e determinar diferenças em sua composição química (Wenning; Scherer, 2013; Morgano *et al.*, 2017).

A avaliação da amostra é realizada pela análise dos picos de radiação eletromagnética que incide sob o cristal e detecta na amostra um componente bioquímico, sendo a análise do espectro realizada para investigar regiões que podem variar de acordo com espécie ou função (Legner; Meinen; Rauber, 2018; Fantin *et al.*, 2022). A caracterização e classificação de fungos por meio da ATR-FTIR são vantajosas devido à sua rapidez, sensibilidade e a exigência de quantidades mínimas de amostra. Além disso, a técnica é não destrutiva, permitindo que as amostras permaneçam intactas para análises posteriores já que o modo ATR evita a necessidade de preparação da amostra porque a amostragem ocorre através de uma onda evanescente que existe fora do cristal e, portanto, dentro da amostra. Essa abordagem também tem potencial para ser automatizada e integrada em sistemas de análise de alta produtividade (Wenning; Seiler; Scherer, 2002; Wenning; Scherer, 2013).

A espectroscopia ATR-FTIR, tem sido usada a mais de duas décadas para o exame de amostras biológicas. Vem se obtendo bons resultados na classificação de diferentes gêneros, espécies e cepas de fungos e bactérias, além de observações de materiais complexos como biofilmes, biodeteriorização fúngica e materiais inorgânicos, tornando-se uma técnica popular entre os pesquisadores (Kos; Lohninger; Krska, 2002; Salman *et al.*, 2012).

A técnica de ATR-FTIR, gera um grande conjunto de dados gerados pelo seu perfil espectral, necessitando de métodos estatísticos bem estabelecidos para detectar pequenas diferenças entre os espectros fúngicos, sendo necessária a utilização das etapas de pré-processamento de dados e análises discriminantes. A fim de se obter bons resultados, o uso das técnicas de química analítica moderna, vem sendo beneficiada pelos notáveis conjuntos de instrumentos avançados, permitindo a obtenção de respostas instrumentais naturalmente multivariadas, resultando em uma rápida e eficiente geração de dados unidimensionais e multidimensionais a partir de uma única medição, obtendo informações confiáveis e relevantes de maneira expedita, sendo, esses métodos multivariados, aplicados em análises com uma frequência cada vez maior em setores industriais e de pesquisas (Carvelo *et al.*, 2019; Gannibal, 2022).

2.4 ATR-FTIR e análise multivariada na classificação de fungos

A alta precisão da ATR-FTIR combinada com tecnologias analíticas empregadas para estudos metabolômicos, ganharam notável popularidade (Winder *et al.*, 2001). O uso das técnicas de química analítica moderna, vem obtendo respostas instrumentais naturalmente multivariadas, resultando em uma rápida e eficiente geração de dados unidimensionais e multidimensionais a partir de uma única medição, obtendo informações confiáveis e relevantes de maneira expedita, sendo, esses métodos multivariados, aplicados em análises com uma frequência cada vez maior em setores industriais e de pesquisas (Carvelo *et al.*, 2019; Gannibal, 2022).

As principais etapas da análise de dados metabolômicos compreendem pré-processamento, pré-tratamento, processamento, pós-processamento, validação e, finalmente, interpretação (Broadhurst; Kell, 2006).

A parte do processamento, consiste na análise de dados e talvez, a etapa mais desafiadora e demorada. É necessário um estudo do desenho experimental para a seleção e emprego de técnicas apropriadas que irão extrair informações uteis da amostra, podendo ser utilizadas inúmeras técnicas estatísticas, sendo cada uma delas apresentando vantagens e desvantagens relacionadas (Broadhurst; Kell, 2006).

Os desafios que os analistas de dados encontram ao analisar dados metabólicos são o ajuste excessivo do modelo, o que significa que a abordagem estatística escolhida classifica

muito bem os dados de treinamento, mas as amostras subsequentes são muitas vezes classificadas incorretamente, isto é, o modelo é incapaz de 'generalizar' porque aprendeu perfeitamente os dados de treinamento. Outros obstáculos podem estar relacionados à tecnologia analítica usada para gerar os dados, bem como aos métodos estatísticos usados para a análise. Portanto, são necessárias análises estatísticas robustas que permitam a geração de resultados precisos (Brereton, 2006).

Entre esses métodos de classificação supervisionado, o método discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA), é uma técnica quimiométrica que determina a qual classe pertence uma amostra desconhecida a partir das informações fornecidas ao sistema neste caso, os espectros na região do infravermelho médio e a classe original das amostras (Barker; Rayens, 2003). O PLS-DA é um método de calibração inversa que permite a otimização da separação entre diferentes grupos de amostras, que é possível ligando duas matrizes de dados X (variáveis dependentes) e Y (variáveis dependentes correspondentes), maximizando a covariância entre as variáveis. O método é na verdade uma extensão do PLS1 que lida com uma única variável contínua dependente, enquanto o PLS2 (chamado PLS-DA) pode lidar com múltiplas variáveis categóricas dependentes (Wold; Sjostrom; Eriksson, 2001; Chang; Lin, 2011).

Este novo subespaço permite a previsão da variável Y com base em um número reduzido de fatores (variáveis latentes). Esses fatores descrevem o comportamento das variáveis dependentes Y e abrangem o subespaço no qual as variáveis independentes X são projetadas. Por exemplo, se considerarmos a divisão de amostras em diferentes classes, a variável Y será composta por um único vetor que terá uma entrada 0 para todas as amostras da primeira classe e uma entrada 1 para todas as amostras da segunda classe (ou vice-versa, não importa). Quando os dados contêm três classes, os três grupos serão codificados binariamente em 3 variáveis com a matriz Y como $[1\ 0\ 0]$ para todas as amostras da classe 1, $[0\ 1\ 0]$ para amostras da classe 2 e, finalmente, $[0\ 0\ 1]$ para amostras da classe 3 (Wold; Sjostrom; Eriksson, 2001; Chang; Lin, 2011).

De modo geral, o algoritmo PLS1-DA é utilizado em problemas binários de classificação, enquanto em problemas multiclases geralmente é utilizado o algoritmo PLS2-DA, uma vez que um único modelo é desenvolvido para as todas as amostras. Devido a esse fato, neste tutorial será empregada somente a PLS2-DA e sempre que neste trabalho for feita referência ao método PLS-DA, estaremos nos referindo ao método PLS2-DA.

A principal vantagem desta abordagem PLS-DA é a disponibilidade e manipulação de dados altamente colineares e ruidosos, que são resultados muito comuns de experimentos

metabolômicos (Barker; Rayens, 2003). Além disso, fornece diversas estatísticas como peso de carga, importância variável na projeção (VIP) e coeficiente de regressão, determina a qual classe irá pertencer uma amostra desconhecida a partir das informações fornecidas ao sistema, sendo neste caso, a região dos espectros do infravermelho médio e os pré-processamento das amostras. Os métodos supervisionados exigem o conhecimento sobre as amostras e suas classes para definir as regras que serão utilizadas para essa classificação de amostras (Yi *et al.*, 2016).

A análise de agrupamento por métodos hierárquicos (HCA, do inglês *Hierarchical Cluster Analysis*) é um método de reconhecimento padrão entre amostras, que objetiva o aumento e compreensão de um conjunto de dados, examinando os agrupamentos das amostras que são similares entre si, sendo classificadas como exploratória, ou não supervisionada. A HCA pode ser aplicada na identificação de grupos de um determinado conjunto de dados para o teste de hipóteses de identificação de membros de um dado grupo (Bratchell, 1989; Ferreira, 2005; Mingoti; Glória, 2005).

Em estudos no campo da microbiologia de alimentos, o FTIR com o PLS-DA tem sido usado para identificar cepas de fungos filamentosos com altos níveis de precisão, entre 92,3 – 98,77% em nível de espécie (Lecellier *et al.*, 2014). Li *et al.* (2022) utilizaram a ATR-FTIR combinada com PLS-DA para construir modelos multiclasse e de duas classes para diferenciar 10 espécies de fungos de lagarta. Wang *et al.* (2019) analisaram 120 amostras de Lingzhi (congumelos) por ATR-FTIR em combinação com modelos de classificação de floresta aleatória (RF), máquina de vetores de suporte (SVM) e PLS-DA, a fim de diferenciar as diversas espécies.

Barboux; Boust; Di Martino (2021) desenvolveram um método baseado em ATR-FTIR acoplado a uma análise discriminante de mínimos quadrados parciais para preparação de amostras e identificação de *Serpula lacrymans*, agente causal da podridão seca em madeira na Europa, Rússia, América do Norte e Japão. Nos estudos de Wang *et al.* (2019) foi utilizada a técnica de ATR-FTIR e cromatografia líquida ultrarrápida (UFLC), em conjunto com PLS-DA e regressão de mínimos quadrados parciais (PLSR) para comparação e análise quantitativa de amostras de *Macrohyphoria cocos* selvagens e cultivadas coletadas em diferentes locais da província de Yunnan.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cepas fúngicas

Isolados de cinco espécies de fungos fitopatogênicos dos gêneros *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Macrophomina*, *Neoscytallidium* e *Pseudofuicoccum* foram utilizados neste estudo (Tabela 1), os quais foram obtidos de diferentes espécies de plantas e identificados com base em marcadores morfológicos e pela amplificação e sequenciamento de genes. As cepas fazem parte da biblioteca de micro-organismos do Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal do Piauí (UFPI). Os fungos foram mantidos em meio ágar batata dextrose (PDA, do inglês *potato dextrose agar*) a 28°C na ausência de luz e preservados pelo método de Castellani.

Tabela 1 - Descrição das cepas fúngicas analisadas.

Fungo	Sigla	Hospedeiro	Referência
<i>Colletotrichum truncatum</i> COUFPI 226	CS	Sementes de <i>Phaseolus lunatus</i> (Lima bean)	Mota <i>et al.</i> (2017)
<i>Fusarium sacchari</i> COUFPI 55	FS	Folhas de <i>Saccharum officinarum</i> (Cana-de-açúcar)	Carvalho <i>et al.</i> (2023)
<i>Macrophomina phaseolina</i> COUFPI 10	MP	Sementes de <i>Vicia faba</i> (Feijão-fava)	Mota <i>et al.</i> (2017)
<i>Neoscytallidium dimidiatum</i> COUFPI 239	NT	Folhas de <i>Sansevieria trifasciata</i> (Espada de São Jorge)	Monteles <i>et al.</i> (2020)
<i>Pseudofuicoccum stromaticum</i> COUFPI 36	PS	Ramos de <i>Syzygium malaccensis</i> (Jambeiro)	Silveira <i>et al.</i> (2018)

Fonte: Autora, 2023.

3.2 Preparação das amostras

As cepas fúngicas foram cultivadas em meio PDA e incubadas a 28°C por 7 d, exceto o *C. truncatum* COUFPI 226, que foi incubado a 28°C por 14 d. Fragmentos de 1,0 cm² de cada isolado foram transferidos para o meio caldo batata dextrose (PDB, do inglês *Potato Dextrose Broth*) sendo feita 7 repetições, os quais permaneceram sob agitação constante de 200 rpm a temperatura ambiente por 3 d (Huleihel *et al.*, 2018). As suspensões de células dos fungos foram

centrifugadas a 10.000 rpm por 4 min e os *pellets* resultantes foram lavados quatro vezes com 1,5 mL de água destilada estéril. Em seguida, 45 mg de células de cada isolado foram transferidas para tubos de 1,5 mL, com a adição de 50 µL de água destilada estéril, para a medição espectroscópica (Salman *et al.*, 2012; Huleihel *et al.*, 2018). Foram preparadas 7 replicatas para cada cepa fúngica.

3.3 Análises por ATR-FTIR

Alíquotas de aproximadamente 100 µL das suspensões fúngicas foram depositadas em cristal de seleneto de zinco (ZnSe) e secas por um período de 30 min, utilizando fluxo de gás nitrogênio (Salman *et al.*, 2014). Em seguida, os espectros de infravermelho de cada amostra foram adquiridos em um espectrômetro FTIR MIR/NIR Frontier Perkin Elmer, com acessório de ATR horizontal MIRacle™ (Pike Technologies, Fitchburg, USA). Os espectros foram adquiridos na região do infravermelho médio na faixa de 600 a 4000 cm⁻¹, com resolução de 4 cm⁻¹ e 32 varreduras. Antes de cada análise, o cristal foi limpo com álcool isopropílico P.A. e um espectro de fundo foi registrado empregando o cristal sem amostra.

3.4 Processamento de dados e análise quimiométrica

A análise dos dados espectrais foi feita por meio de três etapas distintas: (1) pré-processamento, (2) processamento e (3) análise estatística multivariada. Os dados brutos foram pré-processados usando o software Spectrum (Perkin Elmer, Waltham, MA, EUA), no qual foi realizada a correção de linha de base, transformação da ordenada espectral em absorbância e normalização.

O processamento dos dados foi realizado no software online MetaboAnalyst 5.0 (Pang *et al.*, 2021), no qual a entrada de dados consistiu em um arquivo .csv organizados no formato de uma matriz (X), em que cada linha dessa matriz representa as amostras e cada coluna corresponde à absorbância nos diferentes comprimentos de onda (cm⁻¹). A presença de valores ausentes ou picos com valores constantes (ou seja, todos os zeros) foi verificada e feita a filtragem de dados usando desvio padrão para remover variáveis quase constantes ao longo das

condições do experimento. Os dados foram dimensionados usando a escala de Pareto, concentrando os dados em metabolitos majoritários.

A análise estatística supervisionada PLS-DA foi realizada para classificar os isolados fúngicos. Após inúmeros estudos sobre a escolha da região do espectro que seria escolhida para as análises estatísticas, o PLS-DA foi realizado, separadamente, para todo o espectro (600-4000 cm^{-1}) e três regiões específicas: região I (800 – 1800 cm^{-1}), região II (2800 – 2990 cm^{-1}) e região III (800 – 1800 cm^{-1} ; 2800 – 2990 cm^{-1}) (Salman *et al.*, 2014). A importância da variável na projeção (VIP, do inglês *Variable Importance in Projection*) foi determinada e as 15 principais bandas foram selecionadas. A classificação dos dados foi feita por meio da análise de conjuntos de treinamento e testes selecionados aleatoriamente do banco de dados. Duas variantes de validação cruzada k-fold, frequentemente aplicadas em reconhecimento de padrões, foram utilizadas para examinar os resultados de classificação: (1) *5-fold*, ou seja, 20-80% quando 80% dos dados foram usados para treinamento e 20% para teste; (2) *leave-one-out* (LOO), obtida quando $k = N$, onde N é o número de pontos de dados; geralmente aplicada quando a quantidade de dados é relativamente pequena (Salman *et al.*, 2012). A significância estatística do modelo PLS-DA foi avaliada com testes de permutação ($n = 2000$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização das bandas de absorção infravermelha de fungos fitopatogênicos

Os espectros de absorção no infravermelho representativos para cada um dos fungos fitopatogênicos estão mostrados na figura 8. A intensa banda de absorção de estiramento O–H observada nos espectros de todos os fungos é referente à presença de água, provavelmente proveniente do citoplasma ou resquício de água do preparo de amostra, tornando sua região inapropriada para a análise multivariada. Bandas de absorção ao redor de $2800\text{--}2990\text{ cm}^{-1}$ foram atribuídas a vibrações de estiramento C–H de grupos metílicos e metilênicos, principalmente de lipídeos, e a banda em torno de 1744 cm^{-1} à vibração de estiramento C=O de fosfodiéster (Shapaval *et al.*, 2010; Salman *et al.*, 2012).

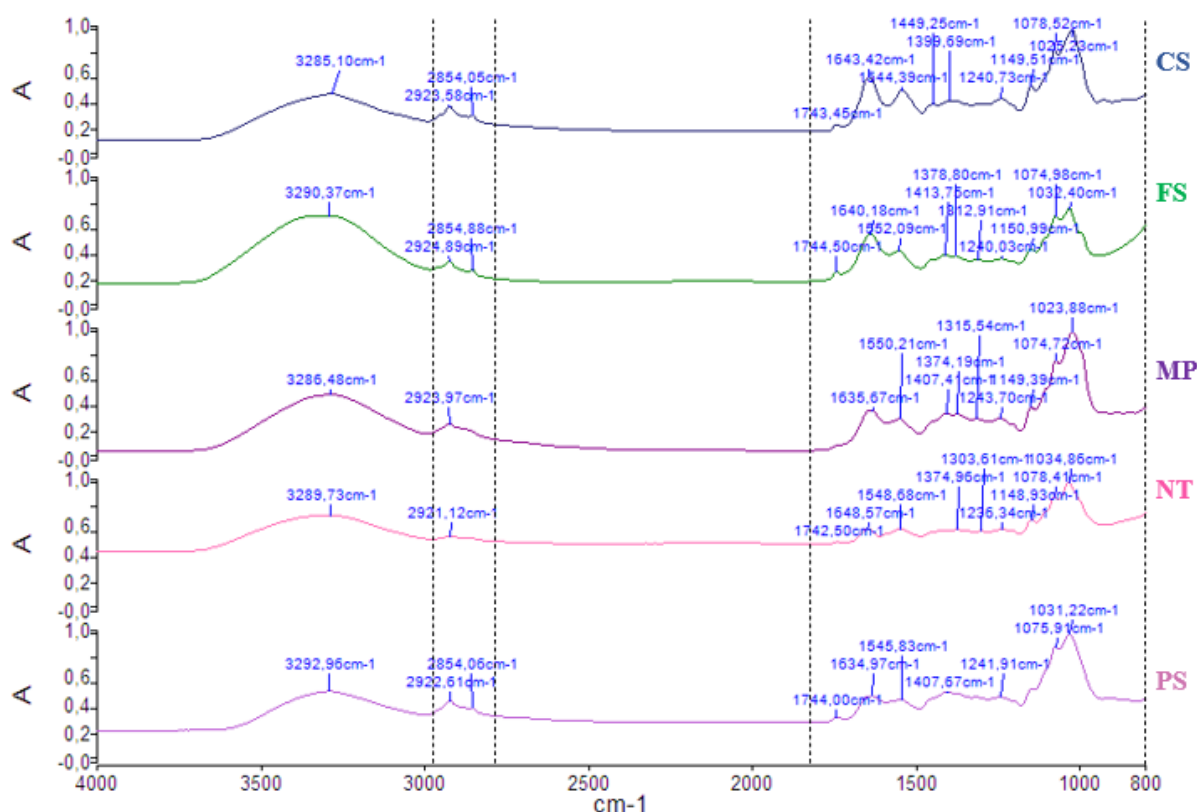


Figura 8 - Espectros de ATR-FTIR de *Colletotrichum truncatum* COUFPI 226 (CS), *Fusarium Sacchari* COUFPI 55 (FS), *Macrophomina Phaseolina* COUFPI 10 (MP), *Neoscytallidium Dimidiatum* COUFPI 239 (NT) e *Pseudofuicoccum Stromaticum* COUFPI 36 (PS). As regiões de *fingerprint* de $800 - 1800\text{ cm}^{-1}$ e $2800 - 2990\text{ cm}^{-1}$ estão marcadas com linha tracejada. Fonte: Autora, 2023.

Bandas de vibrações de estiramento C=O acoplado a flexão N-H e ao estiramento C-N referentes à amida I, provavelmente de ligações peptídicas de proteínas, foram visíveis ao redor de 1648 cm^{-1} . Amidas II e III apareceram em 1550 e 1240 cm^{-1} , respectivamente (Forato; Bernardes-Filho; Colnago, 1998; Salman *et al.*, 2012). Os picos em $1449/1378\text{ cm}^{-1}$ foram atribuídos à vibração de flexão das ligações C-H de lipídeos e proteínas. Bandas de vibrações de estiramento C-C ao redor de 1150 cm^{-1} e C-O em 1078 e 1024 cm^{-1} , respectivamente, foram atribuídas a polissacarídeos, como a quitina e glicogênio. Picos de absorção ao redor de 980 cm^{-1} foram referentes à vibração de estiramento C-O de fosfodiéster (San-Blas *et al.*, 2012; Salman *et al.*, 2014; Huleihel *et al.*, 2018).

4.2 Classificação dos fungos fitopatogênicos por espectroscopia ATR-FTIR e método PLS-DA

Para controlar de forma eficaz as doenças fúngicas nas plantas, faz-se necessário identificar com rapidez e precisão os agentes responsáveis pelas infecções em seus estágios iniciais, a fim de escolher o método específico e eficaz para evitar a propagação dos fitopatógenos (Salman *et al.*, 2014; Huleihel *et al.*, 2018). Estudos prévios evidenciaram o potencial da espectroscopia ATR-FTIR como uma ferramenta poderosa para classificação de fitopatógenos a nível de gênero, espécie e linhagem, o que torna possível rastrear a doença e escolher o método fitossanitário para controlá-la (Kos; Lohninger; Krska, 2002; Salman *et al.*, 2014; Huleihel *et al.*, 2018). No presente estudo, utilizamos a técnica de ATR-FTIR para explorar seu potencial na diferenciação e classificação de fungos fitopatogênicos isolados a partir de culturas de agrícolas, frutíferas e plantas ornamentais.

Os espectros das 35 amostras de fungos fitopatogênicos mostraram elevada similaridade, com apenas pequenas variações nas intensidades das bandas, não apresentando um padrão claro que se correlacionasse com as diferentes cepas. Assim, recorreu-se ao método de PLS-DA para diferenciação e classificação dos fungos (Figura 9). O método supervisionado de análise multivariada escolhido para diferenciação e classificação dos fungos fitopatogênicos foi o PLS-DA. Essa técnica de classificação busca identificar os elementos ou características ocultas que melhor discriminam entre dois ou mais grupos distintos de amostras (bloco X), predizendo a classe de linhagem, espécie ou gênero. O objetivo foi encontrar essas características latentes com a máxima covariância possível em relação a uma classe alvo

específica definida no bloco de dados Y (Oussama *et al.*, 2012). Este método pode ser aplicado na descoberta de biomarcadores, utilizando-se as variáveis de importância relativa do modelo PLS-DA recebendo classificações variáveis de acordo com o coeficiente que recebe a classificação. Dessa forma, é possível identificar quais variáveis têm maior influência na discriminação entre os diferentes grupos de amostras (Breitling *et al.*, 2004).

O método de PLS-DA foi aplicado a três diferentes regiões: região I (800–1800 cm^{-1}) (Figura 9A), região II (2800–2990 cm^{-1}) (Figura 9B) e região III (800 – 1800 cm^{-1}) (Figura 9C), para determinar qual geraria os melhores resultados. As regiões foram selecionadas baseadas em trabalhos prévios (Salman *et al.*, 2012; 2014).

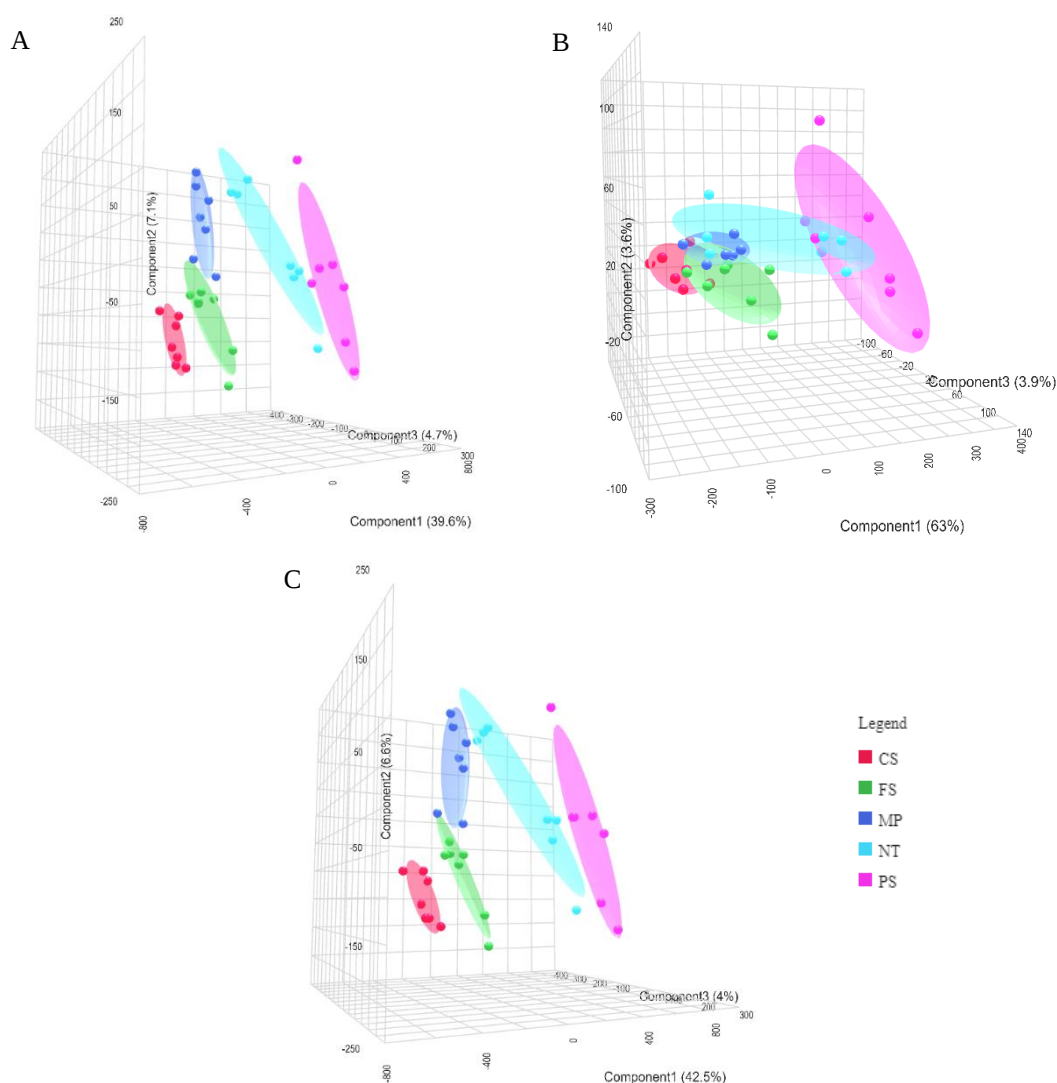


Figura 9 - Gráficos de escores 2D de PLS-DA obtidos a partir dos espectros de ATR-FTIR de *Colletotrichum truncatum* COUFPI 226 (CS), *Fusarium Sacchari* COUFPI 55 (FS), *Macrophomina Phaseolina* COUFPI 10 (MP), *Neoscytallidium Dimidiatum* COUFPI 239 (NT) e *Pseudofuicocum Stromaticum* COUFPI 36 (PS). Os cálculos foram realizados usando o espectro de absorção de infravermelho nas regiões de

800–1800 cm^{-1} (A), 2800–2990 cm^{-1} (B) e regiões combinadas 800–1800 e 2800–2990 cm^{-1} (C). As áreas sombreadas indicam as regiões de confiança de 95%.

A comparação pelo PLS-DA resultou em uma separação das amostras ao se utilizar a região I, de 800–1800 cm^{-1} (Figura 9A, B), com variância total de 51,4%, correspondendo a 39,6% da componente 1, 7,1% da componente 2 e 4,7% da componente 3, sendo possível diferenciar completamente as amostras das diferentes espécies fúngicas. O agrupamento de amostras de CS mostrou-se muito distante das amostras de PS, indicando que estes fungos apresentam uma composição de biomarcadores bastante diferenciada, e próximo ao agrupamento de amostras de FS, sugerindo que estes são um pouco mais semelhantes. As amostras de PS, por sua vez, permaneceram próximas ao agrupamento de amostras de NT, sugerindo que estes fungos compartilham de alguns biomarcadores similares. O aglomerado de amostras de MP mostrou-se em uma posição intermediária entre NT e FS, provavelmente apresentando biomarcadores em comum a ambos os fungos.

Já a região II, de 2800–2990 cm^{-1} (Figura 9B), que mostrou variância total de 70,5%, com 63% da componente 1, 3,6% da componente 2 e 3,9% da componente 3, não gerou uma diferenciação satisfatória das diferentes cepas fúngicas. Nesse caso, os aglomerados das amostras de CS, FS, MP e NT permaneceram sobrepostos, contribuindo somente na separação total entre as amostras de CS, FS e MP das amostras de PS. A região III (Figura 9C), referente à combinação das regiões I e II, resultou em uma diferenciação idêntica à região I, no entanto, apresentando um valor de variância total um pouco maior, de 53,1% com contribuições de 42,5% da componente 1, 6,6% da componente 2 e 4% da componente 3. As regiões I e III apresentaram, portanto, os melhores resultados.

A análise de validação cruzada com os primeiras três componentes para a região I produziu um modelo com uma boa previsibilidade ($Q^2 = 0,58$), valor de ajuste ($R^2 = 0,96$) e precisão (precisão = 0,52) (Figura 10A) para a primeira componente usando a variante 5-fold, a qual mostrou valores ligeiramente melhores que a variante LOO (Figura 10B). A validação cruzada 5-fold para a região III gerou melhores resultados para a componente 3, com valores de $Q^2 = 0,60$, $R^2 = 0,96$ e precisão = 0,52 (Figura 10C), também ligeiramente melhores que LOO (Figura 10D). Os maiores valores de Q^2 , portanto, foram obtidos ao se utilizar a região III.

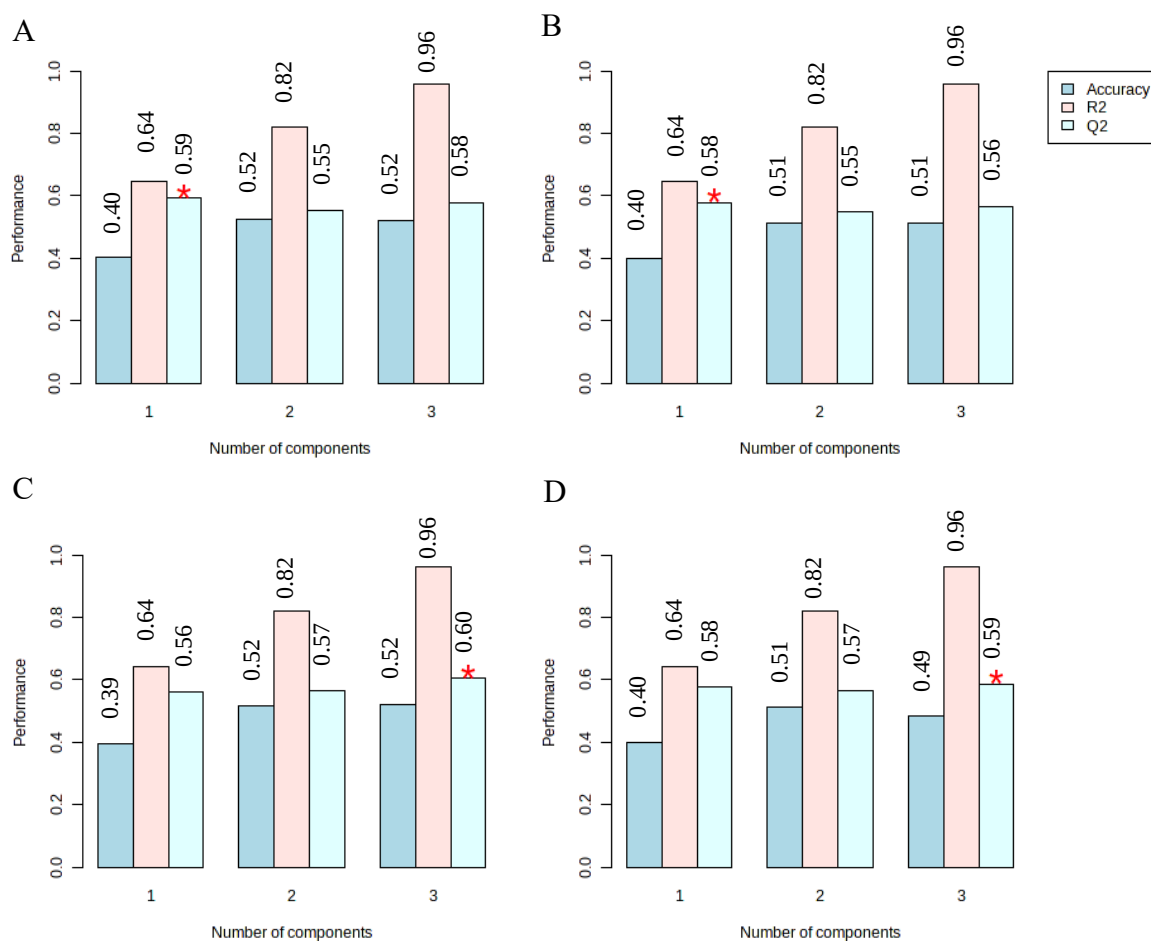


Figura 10 - Validação cruzada do modelo de PLS-DA para as regiões I (A, B) e III (C, D) do espectro de ATR-FTIR das cepas de fitopatógenos através das variantes 5-fold (A, C) e leave-one-out (B, D).

Como o PLS-DA tende a superajustar os dados, é necessário realizar testes de permutação para checar se a separação é estatisticamente significativa. Os testes de permutações baseados na distância de separação B/W (razão entre a soma dos quadrados e a soma interna dos quadrados) para as regiões I (Figura 11A) e III (Figura 11B) mostraram valores de $p=0,001$ e $p=0,043$, respectivamente, os quais foram menores que 0,05 demonstrando a significância da separação.

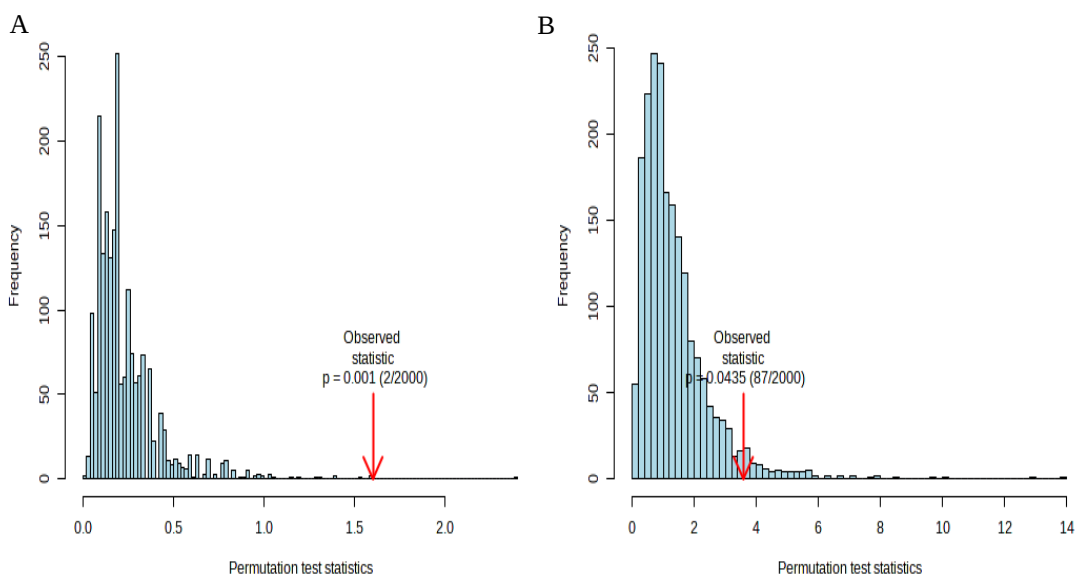


Figura 11 – Teste de permutação do modelo de PLS-DA baseado na distância de separação para as regiões I (A) e III (B).

A partir dos valores de *loadings* do PLS-DA usando a região I, foram selecionadas as bandas de absorção dos espectros de ATR-FTIR com valores de VIP acima de 1,4 para a componente 1 (Figura 12). Bandas de absorção referentes às vibrações de estiramento C–O em 1030/1115 cm^{-1} , flexão das ligações C–H em 1415/1380/1315 cm^{-1} , bandas de amida III em 1270/1295 cm^{-1} , estiramento C–C em 1150 cm^{-1} e estiramento C–O de fosfodiéster em 960 cm^{-1} foram de alta relevância na separação das cepas PS e NT, mostrando-se de moderada a baixa intensidade em MP, FS e CS. Bandas de estiramento C–O em 1015, 1075, 1045, 1085 e 1020 cm^{-1} e estiramento C–O de fosfodiéster em 980 cm^{-1} foram de alta intensidade em PS e MP, com moderada a baixa intensidade nas demais. E a banda de estiramento C–O em 1080 cm^{-1} mostrou-se de maior intensidade em PS e FS e de moderada a baixas intensidades nas demais.

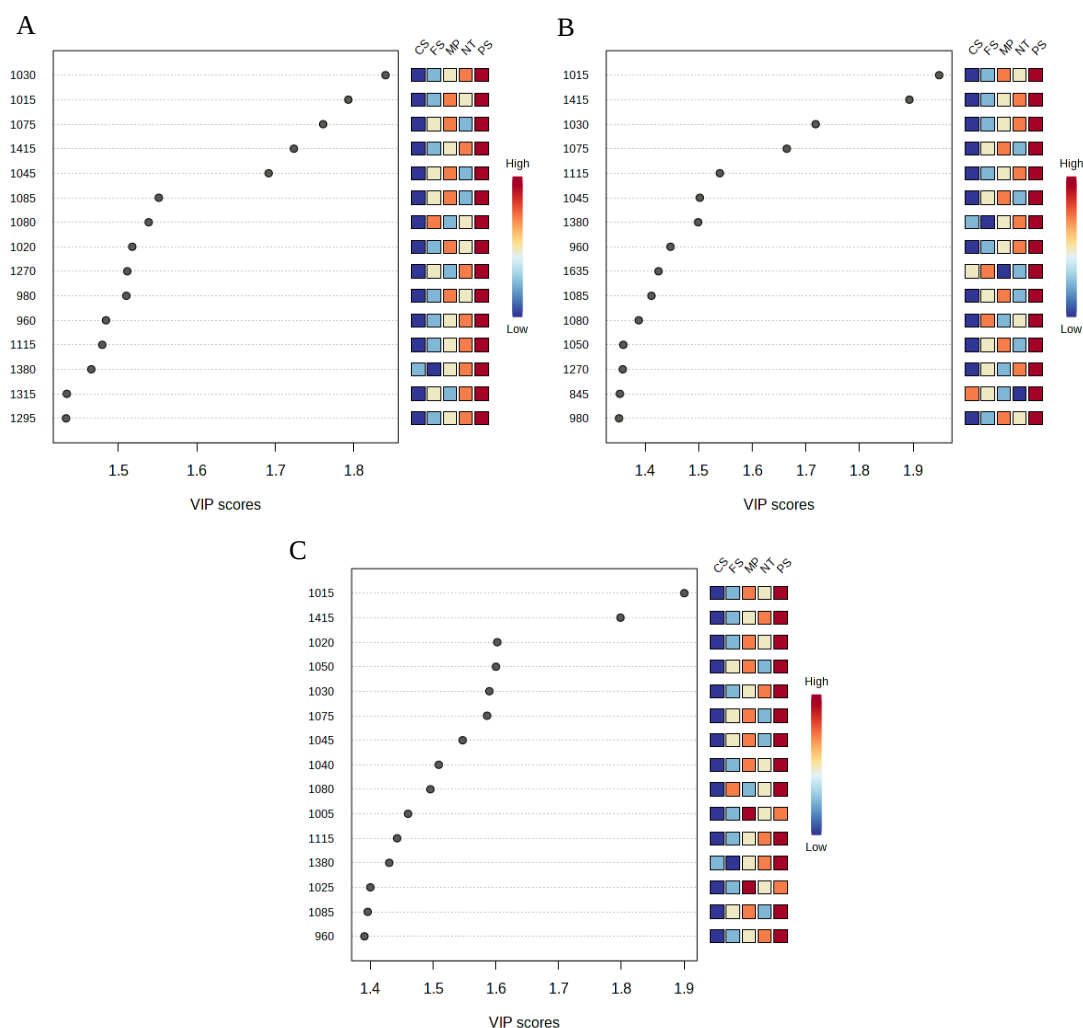


Figura 12 – Escores VIP acima de 1,4 derivados do modelo de PLS-DA para as componentes 1 (A), 2 (B) e 3 (C) usando as regiões I dos espectros de ATR-FTIR das cepas fúngicas.

As bandas de maior contribuição para a separação das amostras na componente 2 foram de estiramento C–O em 1015, 1045, 1050, 1075 e 1085 cm⁻¹ e estiramento C–O de fosfodiéster em 980 em cm⁻¹, as quais foram de maior intensidade em MP e PS e baixa intensidade em CS; flexão das ligações C–H em 1415/1380 cm⁻¹, estiramento C–O em 1030/1115 cm⁻¹, estiramento C–O de fosfodiéster em 960 cm⁻¹ e bandas de amida III em 1270 cm⁻¹ de alta relevância em NT e PS e baixa em CS; as bandas em 1635 e 1080 cm⁻¹ foram mais intensas em FS e PS e menos intensas em MP e CS, respectivamente; e a banda em 845 cm⁻¹ foi a única de maior intensidade compartilhada por CS e PS e de menor intensidade em NT. Na componente 3 destacaram-se na separação as bandas em 1005 e 1025 cm⁻¹ que foram de maior intensidade em MP e mais baixa intensidade em CS. Os resultados de escores VIP foram semelhantes para a região III (Figura 12).

4.3 O método PLS-DA surge como método efetivo para caracterização de fungos fitopatogênicos

Os dados revelaram que a aplicação do PLS-DA possibilitou um modelo de discriminação efetivo na separação dos grupos amostrais de acordo com a espécie de fungo. As separações mais evidenciadas ocorreram entre CS em relação à PS e NT e entre PS em relação à FS (Figura 9). A discriminação das cepas CS em relação a PS e NT está relacionada aos biomarcadores presentes nas assinaturas espectrais de PS e NT e de baixa intensidade em CS e que foram de alta relevância na separação (Figura 8), correspondendo às vibrações de estiramento C–O de polissacarídeos, flexão das ligações C–H de lipídeos e proteínas, bandas de amida III de proteínas e estiramento C–O de fosfodiéster. A diferenciação entre as cepas PS e FS, pode ser atribuída principalmente pela banda 1380 cm^{-1} referente à flexão das ligações C–H de lipídeos e proteínas que foi de alta relevância para PS e de baixa para FS (Figura 9A). Na componente 2 (Figura 9B) a banda de 1635 cm^{-1} atribuída à amida I de ligações peptídicas foi de alta intensidade em PS e baixa em MP, e a banda 845 cm^{-1} de alta relevância em PS e baixa em NT. Os resultados demonstram que a aplicação do PLS-DA foi efetiva principalmente para diferenciação da cepa CS em relação a PS e NT e da cepa PS em relação a FS.

As variantes de validação cruzada 5-fold e LOO apresentaram valores semelhantes de R^2 e Q^2 . R^2 (soma dos quadrados capturados pelo modelo) indica a variação mostrada por todas as 3 componentes no modelo e Q^2 (validação cruzada R^2) mostra a melhor precisão da previsão do modelo quando as 5 componentes foram consideradas. Teoricamente, quanto mais próximo o valor de R^2 e Q^2 de 1, melhor é o modelo PLS-DA (Szymańska *et al.*, 2012). Os valores obtidos revelaram qualidade de ajuste e qualidade de predição satisfatórias. Os valores de Q^2 ligeiramente superiores ao se utilizar a região III em comparação à região I, sugerem que a combinação das regiões de $800\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$ e $2800\text{--}2990\text{ cm}^{-1}$ foi ligeiramente melhor para discriminação e classificação dos diferentes fungos.

Em face do exposto, esses achados correspondem ao primeiro relato envolvendo a caracterização e diferenciação de espécies do gênero *Macrophomina*, *Neoscytallidium* e *Pseudofuicoccum* pela técnica de ATR-FTIR combinada com análise multivariada. Linhagens fúngicas do gênero *Fusarium* foram previamente caracterizadas ATR-FTIR (Salman *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2020) e diferenciadas usando análise de componentes principais (PCA) e análise discriminante linear (LDA), resultando na classificação de 10 isolados de *Fusarium oxysporum*. Relatos da caracterização de espécies do gênero *Colletotrichum* também foram

encontrados, onde 14 isolados de *Colletotrichum coccodes* foram diferenciados e classificados por ATR-FTIR e métodos multivariados (PCA e LDA) nas regiões combinadas de 2990–2800 e 1800–800 cm^{-1} (Salman *et al.*, 2014). A caracterização e identificação de cepas de *Colletotrichum* e *Fusarium* também foi relatada por Huleihel *et al.* (2018), em que amostras puras e mistas de fungos dos gêneros *Colletotrichum*, *Verticillium*, *Rhizoctonia* e *Fusarium* foram analisadas utilizando ATR-FTIR e análise multivariada e os resultados mostraram que a melhor diferenciação entre fungos puros e mistos foi obtida na região de 675 a 1800 cm^{-1} .

5 CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho demonstram que as regiões I (800–1800 cm^{-1}) e III (800–1800 cm^{-1} e 2800–2990 cm^{-1}) dos espectros de ATR-FTIR podem ser usadas como biomarcadores espectroscópicos para diferenciação e classificação dos fungos, uma vez que o PLS-DA revelou qualidade de ajuste e predição satisfatórias atingindo valores de $Q^2 = 0,60$, $R^2 = 0,96$ e precisão = 0,52 na validação cruzada. As bandas de absorção no infravermelho de maior relevância na separação das classes foram as vibrações de estiramento C–C, de estiramento C–O de fosfodiéster e flexões das ligações C–H de amida III.

O método de PLS-DA revelou uma boa diferenciação da cepa CS em relação a PS e NT e da cepa PS em relação a FS. As cepas MP, NT e PS mostraram algumas regiões de sobreposição no gráfico de escores do PLS-DA, sugerindo que estes fungos possuem alguns biomarcadores similares e que necessitam ser analisados por outros métodos de caracterização e separação. Por este método, pode ser desenvolvido uma importante ferramenta de diagnóstico no setor agrícola para identificação de doenças fúngicas, através do desenvolvimento de um equipamento portátil para identificação fúngica no próprio campo, considerando que pode fornecer a extensão da diferenciação e/ou similaridade biológica entre isolados fúngicos.

REFERÊNCIAS

- ABREU, L. D. P. S.; BERBERT, P. A.; SOUZA T. C. E.; MARTINAZZO, A. P. Alternativa sustentável de uso da *Bacillus amyloliquefaciens* no biocontrole de fungos fitopatogênicos: uma revisão. **Revista de Ciências Ambientais**, v. 16, n. 1, p.01-15, 2022.
- ALMEIDA, R. N. **Pré-seleção de linhagens de milho-pipoca para resistência à podridão de espigas ocasionada por *Fusarium* sp.** 2022. 119 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Rio de Janeiro, 2022.
- AMBRÓSIO, A. Aggressivity of different *Fusarium* species causing fruit rot in melons in **Brazil Plant Disease**, v. 1, n. 12, p. 1-19, 2022.
- BALAN, V.; MIHAI, C. T.; COJOCARU, F. D.; URITU, C. M.; DODI, G.; BOTEZAT, D. G. Vibrational spectroscopy fingerprinting in medicine: from molecular to clinical practice. **Materials**, v. 12, n. 18, p. 2884, 2019.
- BARBOUX, R.; BOUSTA, F.; DI MARTINO, P. FTIR spectroscopy for identification and intra-species characterization of *Serpula lacrymans*. **Applied Sciences**, v. 11, n. 18, p. 8463, 2021.
- BARKER, M.; RAYENS, W. Partial least squares for discrimination. **Journal of Chemometrics**, v.17, n. 3, p. 166-173, 2003.
- BATISTA, D. C.; VIEIRA, W. A. S.; BARBOSA, M. A. G.; CÂMARA, M. P. S. First report of *Colletotrichum siamense* causing grape ripe rot in Brazil. **Plant Disease**, v. 107, n. 9, p. 2881, 2023.
- BRATCHELL, N. Multivariate response surface modelling by principal components analysis. **Journal of Chemometrics**, v. 3, n. 4, p. 579-588, 1989.
- BREITLING, R.; ARMENGAUD, P.; AMTMANNA, A.; HERZYK, P. Rank products: a simple, yet powerful, new method to detect differentially regulated genes in replicated microarray experiments. **FEBS Letters**, v. 573, p. 83-92, 2004.
- BRERETON, R. G. Consequences of sample size, variable selection, and model validation and optimisation, for predicting classification ability from analytical data. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 25, n. 11, p. 1103-1111, 2006.
- BROADHURST, D. I.; KELL, D. B. Statistical strategies for avoiding false discoveries in metabolomics and related experiments. **Metabolomics**, v. 2, n. 12, p. 171-196, 2006.
- BUNYARATAVEJ, S.; LEEYAPHAN, C.; RUJITHARANAWONG, C.; SURAWAN, T. M.; MUANPRASAT, C. MATTHAPAN, L. Efficacy of 5% amorolfine nail lacquer in *Neoscytalidium dimidiatum* onychomycosis. **Journal of Dermatological Treatment**, v. 27, n. 4, p. 359-363, 2016.

CALUMBY, R. J. N.; SILVA, J. A.; DA SILVA, D. P.; DE FARIAS MOREIRA, R. T.; DOS SANTOS ARAUJO, M. A.; DE ALMEIDA, L. M.; ALVINO, V. Isolamento e identificação da microbiota fúngica anemófila em Unidade de Terapia Intensiva. **Brazilian Journal of Development**, v. 5, n. 10, p. 19708-19722, 2019.

CARVALHO, M. R. V.; ROCHA, K. C. A.; MELO, M. P.; BRITTO, F. B.; BARGUIL, B. M.; ALCÂNTARA NETO, F.; BORGES, A. F.; SILVA, J. P.; BESERRA JR, J. E. A. Identification and genetic diversity of *Fusarium sacchari* associated with pokkah boeng disease of sugarcane in Northeast Brazil. **Journal of Phytopathology**, v. 171, n. 1, p. 36-47, 2023.

CARVELO, J. A. M.; GONZÁLEZ, A.; GONZÁLEZ, M. G.; RODRÍGUEZ, C. L. Alternative data mining/machine learning methods for the analytical evaluation of food quality and authenticity: a review. **Food Research International**, v. 122, p. 25-39, 2019.

CHANG, C. -C.; LIN, C. -J. LIBSVM: a library for support vector machines. **ACM Transactions on Intelligent Systems and Technology**, v. 2, n. 3, p. 1-27, 2011.

CIAMPI, L.; RADIE, S., ALVAREZ, E. Patología vegetal micológica. **Ciencia e Investigación Agraria**, v. 34, n. 2, p. 160-160, 2007.

COBLENTZ, W. W. **Investigations of Infra-red Spectra: pt. V. Infra-red reflection spectra. pt. VI. Infra-red transmission spectra. pt. VII. Infra-red emission spectra.** Washington: Carnegie institution of Washington, 1908.

DAMM, U.; CANNON, P. F.; WOUDEMBERG, J. H. C.; CROUS, P. W. The *Colletotrichum acutatum* species complex. **Studies in Mycology**, v. 73, p. 37-113, 2012.

DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. Biology and pathology of *Macrophomina phaseolina*. **Biology and Pathology of Macrophomina Phaseolina**, v. 1, n. 12, p. 166, 1978.

FANTIN, L. H.; FELÍCIO, A. L. S. M.; BRAGA, K.; GAETA, G. M.; FRANÇA, J. A.; CANTERI, M. G. Spectral characterization and quantification of *Phakopsora pachyrhizi* urediniospores by Fourier transformed infrared with attenuated total reflectance. **European Journal of Plant Pathology**, v. 154, p. 1149-1157, 2019.

FANTIN, L. H.; FELÍCIO, A. L. S. M.; SUMIDA, C. H.; GONÇALVES, R. M.; BRAGA, K.; FRANÇA, J. A.; CANTERI, M. G. Characterization of *Trichoderma* strains using FTIR-ATR spectroscopy and molecular analysis. **European Journal of Plant Pathology**, v. 162, n. 4, p. 945-956, 2022.

FERREIRA, M. Determination of protein in raw coffee for NIR spectroscopy and regression PLS. **Food Science and Technology**, v. 25, p. 25-31, 2005.

FORATO, L. A.; BERNARDES-FILHO, R.; COLNAGO, L. A. Protein structure in KBr pellets by infrared spectroscopy. **Analytical Biochemistry**, v. 259, n. 1, p. 136-141, 1998.

GALEMBECK, E.; COSTA, C. A evolução da composição da atmosfera terrestre e das formas de vida que habitam a Terra. **Revista Química Nova na Escola**, v. 38, n. 4, 2016.

GANNIBAL, P. B. Polyphasic approach to fungal taxonomy. **Biology Bulletin Reviews**, v. 12, n. 1, p. 18-28, 2022.

GELAIN, J.; LYKINS, S.; ROSA, P. F.; SOARES, A. T.; DOWLING, M.; SCHNABEL, G.; MAY DE MIO, L. L. Identification and fungicide sensitivity of *Colletotrichum* spp. from apple flowers and fruitlets in Brazil. **Plant Disease**, v. 107, n. 4, p. 1183-1191, 2023.

HULEIHEL, M.; SHUFAN, E.; TSROR, L.; SHARAH, U.; LAPIDOT, I.; MORDECHAI, S.; SALMAN, A. Differentiation of mixed soil-borne fungi in the genus level using infrared spectroscopy and multivariate analysis. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 180, p. 155-165, 2018.

HYDE, K. D.; CAI, L.; MCKENZIE, E. H. C.; YANG, Y. L.; ZHANG, J. Z.; PRIHASTUTI, H. *Colletotrichum*: a catalogue of confusion. **Fungal Diversity**, v. 39, n. 1, p. 1-17, 2009.

KOS, G.; LOHNINGER, H.; KRSKA, R. Fourier transform mid-infrared spectroscopy with attenuated total reflection (FT-IR/ATR) as a tool for the detection of *Fusarium* fungi on maize. **Vibrational Spectroscopy**, v. 29, n. 1-2, p. 115-119, 2002.

KREYCI, P. F.; MENTEN, J. O. M. A soja turbinada do plantio a colheita. Caderno técnico cultivar soja. Limitadoras de produtividade, USP - São Paulo. **Revista Cultivar**, n.167, 2013. Disponível em:
<http://www.agro.basf.com.br/agr/ms/pt_BR/function/conversions:/publish/content/APBrazi/solutions/fungicidas/caderno-limitadoras-de-produtividade> Acesso em: 16 de agosto de 2023.

LEAL, C. A. S.; SILVA, G. G.; SILVA, G. M.; SILVA, L. B. G.; PINHEIRO, J. W.; MOTA, R. A. Padronização de uma PCR para diagnóstico molecular de *Microsporum canis* em amostras de pelos e crostas de cães e gatos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 71, n. 12, p. 1143-1148, 2019.

LECELLIER, A.; MOUNIER, J.; GAYDOU, V.; CASTREC, L.; BARBIER, G.; ABLAIN, W.; MANFAIT, M.; TOUBAS, D.; SOCKALINGUM, G. D. Differentiation and identification of filamentous fungi by high-throughput FTIR spectroscopic analysis of mycelia. **International Journal of Food Microbiology**, v. 168, p. 32-41, 2014.

LEGNER, N.; MEINEN, C.; RAUBER, R. Root differentiation of cultivars and provenances of agricultural plants using FTIR spectroscopy. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 1-13, 2018.

LI, G.; WU, W.; LU, L.; CHEN, B.; CHEN, S. Characterisation of *Pseudofusicoccum* species from diseased plantation-grown *Acacia mangium*, *Eucalyptus* spp., and *Pinus massoniana* in Southern China. **Pathogens**, v. 12, n. 4, p. 574, 2023.

LI, Y.; BI, Q.; WEI, W.; YAO, C.; ZHANG, J.; GUO, D. Sequential decision fusion pipeline for the high-throughput species recognition of medicinal caterpillar fungus by using ATR-FTIR. **Microchemical Journal**, v. 179, p. 107437, 2022.

LIU, F.; MA, Z. Y.; HOU, L. W.; DIAO, Y. Z.; WU, W. P.; DAMM, U.; SONG, S.; CAI, L. Updating species diversity of *Colletotrichum*, with a phylogenomic overview. **Studies in Mycology**, v. 101, p. 1-56, 2022.

MA, L. J.; GEISER, D. M.; PROCTOR, R. H.; ROONEY, A. P.; O'DONNELL, K.; TRAIL, F.; DONALD, M. G.; JOHN, M.; KAZAN, K. Fusarium pathogenomics. **Annual Review of Microbiology**, v. 67, p. 399-416, 2013.

MACEDO, W. R. **Enzimas e sua importância para a indústria de alimentos**. Ciência e Tecnologia de Alimentos: sustentabilidade, desafio e inovação, 2017. 20 p.

MARQUEZ, N.; GIACHERO, M. L.; DECLERCK, S.; DUCASSE, D. A. *Macrophomina phaseolina*: General characteristics of pathogenicity and methods of control. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, p. 634397, 2021.

MARTINS, T. D.; MENTEN, J. O. M.; SANGUINO, A. Fungos associados às sementes (Cariopses) de cana-de-açúcar: métodos para detecção, incidência e relação entre incidência fúngica e ambiente de produção das sementes. **Summa Phytopathologica**, v. 35, n. 3, p. 173-178, 2009.

MAYO D. W.; OLIVEIRA F. A; HANNAH R. W. **Course Notes on Interpretation of Infrared and Raman Spectra**. John Wiley and Sons, 2004, 568 p.

MINGOTI, S. A.; GLÓRIA, F. A. A. Comparando os métodos paramétrico e não-paramétrico na determinação do valor crítico do teste estatístico de médias proposto por Hayter e Tsui. **Production**, v. 15, p. 251-262, 2005.

MONTELES, R. P.; SOUSA, E.S.; MATOS, K.S.; BRITO, V. S. T.; MARUZANETE PEREIRA MELO, M. P.; BESERRA JR, J. E. A. *Neoscytalidium dimidiatum* causa queima das folhas em *Sansevieria trifasciata* no Brasil. **Australasian Plant Disease Notes**, v. 15, p. 1-4, 2020.

MORGANO, M. A.; FARIA, C. G.; FERRÃO, M. F.; BRAGAGNOLO, N.; MOTA, J. M.; MELO, M. P.; SILVA, F. F. S.; SOUSA, E. M. J.; SOUSA, E. S.; BARGUIL, B. M.; BESERRA JR, J. E. A. Fungal diversity in Lima bean seeds. **Revista Brasileira de Engenharia de Biosistemas**, v. 11, p. 79-87, 2017.

MOTA, J. M.; MELO, M. P.; SILVA, F. F. S.; SOUSA, E. M. J.; SOUSA, E. S.; BARGUIL, B. M. Fungal diversity in Lima bean seeds. **Revista Brasileira de Engenharia de Biosistemas**, v. 11, p. 79-87, 2017.

NAUMANN, D. Infrared spectroscopy in microbiology. **Encyclopedia of analytical Chemistry**, v. 102, p. 131, 2000.

NOURI, M. T.; LAWRENCE, D. P.; KALLSEN, C. E.; TROUILLAS, F. P. *Macrophomina* crown and root rot of pistachio in California. **Plants**, v. 9, n. 2, p. 134, 2020.

OUSSAMA, A.; ELABADI, F.; PLATIKANOV, S.; KZAIBER, F.; TAULER, R. Detection of olive oil adulteration using FT-IR spectroscopy and PLS with variable importance of projection (VIP) scores. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 89, p. 1807-1812, 2012.

PANG, Z.; CHONG, J.; ZHOU, G.; MORAIS, D. A. L.; CHANG, L.; BARRETTE, M.; GAUTHIER, C.; JACQUES, P. E.; LI, S.; XIA, J. MetaboAnalyst 5.0: narrowing the gap between raw spectra and functional insights. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. 1, p. 388-396, 2021.

PUIA, J. D.; MARTINS, B. R.; HOSHINO, A. T.; BORSATO, L. C.; FERREIRA, M. G. D. B.; DE CARVALHO, M. A.; MACHADO, J.A.; MEHTA, Y.R.; VIGO, S. C. *Colletotrichum gossypii* f. sp. Cephalosporioides: differential behavior of cotton strains. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 3, n. 2, p. 738-746, 2020.

ROMERO-MARCANO, G. S.; SILVA-ACUÑA, R.; SÁNCHEZ-CUEVAS, M. C. Fitopatógenos fúngicos asociados a semillas de moringa en el estado Monagas, Venezuela. **LA CALERA**, v. 22, n. 39, p. 118-126, 2022.

SALMAN, A.; LAPIDOT, I.; POMERANTZ, A.; TSROR, L.; HAMMODY, Z., MOREH, R.; MORDECHAI, S. Detection of *Fusarium oxysporum* fungal isolates using ATR spectroscopy. **Journal of Spectroscopy**, v. 27, n. 5-6, p. 551-556, 2011.

SALMAN, A.; POMERANTZ, A.; TSROR, L.; LAPIDOT, I.; MOREH, R.; MORDECHAI, S.; HULEIHEL, M. Utilizing FTIR-ATR spectroscopy for classification and relative spectral similarity evaluation of 41hol41 *Colletotrichum coccodes* isolates. **Analyst**, v. 137, n. 15, p. 3558-3564, 2012.

SALMAN, A.; SHUFAN, E.; TSROR, L.; MOREH, R.; MORDECHAI, S.; HULEIHEL, M. Classification of *Colletotrichum coccodes* isolates into vegetative compatibility groups using infrared attenuated total reflectance spectroscopy and multivariate analysis. **Methods**, v. 68, n. 2, p. 325-330, 2014.

SAN-BLAS, E.; CUBILLÁN, N.; GUERRA, M.; PORTILLO, E.; ESTEVES. Characterization of Xenorhabdus and Photorhabdus bacteria by Fourier transform mid-infrared spectroscopy with attenuated total reflection (FT-IR/ATR). **Spectrochimica Acta Part A. Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 93, n. 12, p. 58-62, 2012.

SANTOS, C.; FRAGA, M. E.; KOZAKIEWICZ, Z.; LIMA, N. Fourier transform infrared as a powerful technique for the identification and characterization of filamentous fungi and yeasts. **Research in Microbiology**, v. 161, n. 2, p. 168-175, 2010.

SESSA, L.; ABREO, E.; LUPO, S. *Pseudofusicoccum* sp. Causing shoot canker in peach in Uruguay. **Australasian Plant Disease Notes**, v. 16, n. 5, p. 10, 2021.

SHAPAVAL, V.; MØRETRØ, T.; SUSO, H. P.; ÅSLI, A. W.; SCHMITT, J.; LILLEHAUG, D.; MARTENS, H.; BÖCKER, U. A high-throughput microcultivation protocol for FTIR spectroscopic characterization and identification of fungi. **Journal of Biophotonics**, v. 3, n. 8, p. 512-521, 2010.

SHARMA, R.; KULKARNI, G.; SHOUCHE, Y. S. *Pseudofusicoccum adansoniae* isolated as na endophyte from *Jatropha podagrica*: new record for India. **Mycotaxon**, v. 123, n. 1, p. 39-45, 2013.

SILVEIRA, G. F.; MELO, M. P.; TEIXEIRA, J. W. M.; VIANA, D. C.; SILVA, J. D. C.; BESERRA JR, J. E. A. First report of *Lasiodiplodia theobromae* and *Pseudofusicoccum stromaticum* causing dieback in *Syzygium malaccense* tree in Brazil. **Forest Pathology**, v. 48, p. 12408, 2018.

SILVERSTEIN, R. M.; KIEMLE, D. J.; WEBSTER, F. X. Spectrometric identification of organic compounds. 7. ed. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons; 2005. 502 p.

SINGH, V.; SHARMA, N.; SINGH, S. A review of imaging techniques for plant disease detection. **Artificial Intelligence in Agriculture**, v. 4, n. 4, p. 229-242, 2020.

SOUZA, W. J. O.; GOMES, E. N.; RODRIGUES, J. S. **Desenvolvimento rural e sustentabilidade: energia, produção e novos mercados**. Guarujá: Científica Digital, 2022.

SOKOLOVA, L. M.; EGOROVA, A. A.; HOVRIN, A. N. Determination of the species of fungi of the genus *Fusarium* by molecular method. **Agrarian science**, v. 9, p. 118-124, 2021.

SKOLIK, P.; MCAINSH, M. R.; MARTIN, F. L. ATR-FTIR spectroscopy non-destructively detects damage-induced sour rot infection in whole tomato fruit. **Planta**, v. 249, p. 925-939, 2019.

SUMMERELL, B. A. Resolving *Fusarium*: current status of the genus. **Annual Review of Phytopathology**, v. 57, p. 323-339, 2019.

SZYMAŃSKA, E.; SACCENTI, E.; SMILDE, A. K.; WESTERHUIS, J. A. Double-check: validation of diagnostic statistics for PLS-DA models in metabolomics studies. **Metabolomics**, v. 8, p. 3-16, 2012.

TIWARI, R. K.; LAL, M. K.; KUMAR, R.; SHARMA, S.; SAGAR, V.; KUMAR, A.; AGGARWAL, R. Impact of fusarium infection on potato quality, starch digestibility, in vitro glycemic response, and resistant starch content. **Journal of Fungi**, v. 9, n. 4, p. 466, 2023.

VIEIRA, W. A. S.; COSTA, C. A.; CÂMARA, M. P. S.; MICHEREFF, S. J.; REIS, A. *Colletotrichum menezesiae* sp. nov.: a novel species causing anthracnose on chayote in Brazil. **Phytotaxa**, v. 597, n. 1, p. 80-86, 2023.

WANG, Q.; ZUO, Z.; HUANG, H.; WANG, Y. Comparison and quantitative analysis of wild and cultivated *Macrohyphoria cocos* using attenuated total reflection-Fourier transform infrared spectroscopy combined with ultra-fast liquid chromatography. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 226, n.12, p. 117633, 2020.

WANG, Y. Y.; LI, J. Q.; LIU, H. G.; WANG, Y. Z. Attenuated total reflection-Fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR) combined with chemometrics methods for the classification of Lingzhi species. **Molecules**, v. 24, n. 12, p. 2210, 2019.

WENNING, M.; SCHERER, S. Identification of microorganisms by FTIR spectroscopy: perspectives and limitations of the method. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 7111-7120, 2013.

WENNING, M.; SEILER, H.; SCHERER, S. Fourier-transform infrared microspectroscopy, a novel and rapid tool for identification of yeasts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 10, p. 4717-4721, 2002.

WINDER, C. L.; CORNMELL, R.; SCHULER, S.; JARVIS, R. M.; STEPHENS, G. M.; GOODACRE, R. Metabolic fingerprinting as a tool to monitor whole-cell biotransformations. **Analitycal and Bioanalytical Chemistry**, v. 3, n. 399, p. 387-441, 2001.

WOLD, S.; SJÖSTRÖM, M.; ERIKSSON, L. PLS-regression: a basic tool of chemometrics. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 58, n. 2, p. 109-130, 2001.

YI, L.; DONG, N.; YUN, Y.; DENG, B.; REN, D.; LIU, S.; LIANG, Y, Chemometric methods in data processing of mass spectrometry-based metabolomics: a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 914, p. 17-34, 2016.

ZEINAB, A. M.; AL-TEMEME, A.; LAHUF, R. G.; ABDALMOOHSIN, A. T.; AL-AMIRRY. Occurrence, identification, pathogenicity and control of *Neoscytalidium dimidiatum* fungus, the causal agent of sooty canker on *Eucalyptus camaldulensis* in Kerbala province of Iraq. **Plant Archives**, v 19, n. 1, p. 31-38, 2019.