

APLICACIÓN DE TÉCNICAS DE
IMÁGENES
HIPERESPECTRALES EN EL
INFRARROJO CERCANO PARA
LA DETERMINACIÓN DE
CONTAMINACIÓN FÚNGICA Y
DEOXINIVALENOL EN TRIGO

Trabajo Final de Máster
Bainotti Maria Belen
Octubre 2020



Universitat de Lleida



Máster en Gestión e
Innovación en la
Industria Alimentaria

El presente trabajo experimental fue realizado en el Departamento de Tecnología de Alimentos de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agraria de la Universidad de Lleida, y se presenta como requerimiento para optar por el título de Máster en Gestión e Innovación en la Industria Alimentaria.

TÍTULO: Aplicación de técnicas de imágenes hiperespectrales en el infrarrojo cercano para la determinación de contaminación fúngica y deoxinivalenol en trigo.

ALUMNO: María Belén Bainotti

DIRECTOR: Sonia Marín Sillué

CO-TUTOR: Antoni Femenias Llaneras

JURADOS: Antonio J. Ramos Girona (Presidente)

Pedro Elez Martínez (Vocal)

Sonia Marín Sillué (Vocal)

INDICE

Resumen	4
Introducción	6
1. Trigo, cultivo básico alimentario	6
2. Fusariosis de la espiga	7
3. Micotoxinas en trigo.....	8
3. 1. Generalidades de las micotoxinas	8
3. 2. Deoxinivalenol	8
3. 3. DON en la salud humana y animal, importancia y reglamentación	10
4. Gestión de seguridad alimentaria aplicada al DON	10
4. 1. Medidas de gestión de DON en el campo	11
4. 2. Medidas de gestión de DON en la industria	12
5. Métodos de detección y análisis	13
5. 1. Métodos de detección de FHB.....	13
5. 2. Métodos de detección de DON.....	13
6. Espectrometría NIR-HSI	14
6. 1. Fundamentos NIR	14
6. 2. Análisis hiperespectral.....	15
6. 3. Pretratamiento de datos hiperespectrales.....	18
7. Análisis multivariante.....	18
Objetivos	21
Metodología	22
Materiales	22
Métodos.....	23
Parte 1.....	23
Determinación de la correlación entre contaminación fúngica y DON en muestras de trigo a granel	23
A. Obtención y manejo de muestras	23
B. Determinación del espectro NIR para grano entero y grano molido	23
C. Determinación de la concentración de DON por HPLC	24
D. Determinación de la concentración de ergosterol por HPLC-UV.....	25
E. Análisis de la correlación mediante parámetros de regresión lineal	26
F. Análisis multivariante de los datos a partir de espectroscopía NIR	26
Parte 2.....	28
Cuantificación del contenido de DON en muestras de granos de trigo mediante el análisis por HSI-NIR y posterior clasificación de las mismas	28

A. Obtención y manejo de muestras	28
B. Determinación del espectro NIR para grano entero y grano molido	28
C. Determinación de la concentración de DON por HPLC	28
D. Análisis estadístico multivariante por el modelo de predicción PLSR y por el modelo de clasificación de muestras LDA.....	29
Parte 3.....	30
Cuantificación del contenido de DON en muestras de granos individuales de trigo mediante el análisis por HSI-NIR y posterior clasificación de las mismas	30
A. Obtención y manejo de muestras	30
B. Determinación del espectro NIR	30
C. Determinación de la concentración de DON por HPLC	30
D. Análisis estadístico multivariante por el modelo de predicción PLSR y por el modelo de clasificación de muestras LDA.....	31
Resultados y Discusión.....	32
Parte 1.....	32
Determinación de la correlación entre contaminación fúngica y micotoxina en muestras de trigo	32
A. Análisis de la correlación ergosterol vs DON mediante parámetros de regresión lineal	32
B. Cuantificación de ergosterol en muestras de trigo mediante PLSR	33
Parte 2.....	35
Cuantificación del contenido de DON en muestras de trigo mediante el análisis por HSI-NIR	35
y posterior clasificación de las mismas.....	35
A. Distribución del contenido de DON en muestras de trigo	35
B. Cuantificación de DON en muestras de trigo mediante el modelo PLSR.....	36
C. Clasificación de muestras de trigo según el contenido de DON por LDA	40
Parte 3.....	43
Cuantificación del contenido de DON en granos individuales de trigo mediante el análisis por HSI-NIR y posterior clasificación de las mismas	43
A. Distribución del contenido de DON en granos individuales de trigo	43
B. Cuantificación de DON en granos individuales de trigo mediante PLSR	44
C. Selección de longitudes óptimas para la detección de DON mediante NIR.....	45
D. Clasificación de muestras de trigo según el contenido de DON por LDA	47
Conclusiones.....	50
Referencias.....	51

Resumen

Castellano

Los grandes efectos nocivos para la salud de humanos y animales por consumo de alimentos contaminados con hongos micotoxigénicos y sus toxinas son un riesgo de seguridad alimentaria que involucra a todas las partes de la cadena alimentaria, por lo que es de vital importancia su gestión y control integrado. Con el fin de reducir este riesgo, la adquisición de imágenes hiperespectrales en el infrarrojo cercano (HSI-NIR) se considera una técnica emergente, rápida y prometedora capaz de reemplazar los métodos clásicos, costosos y destructivos, que requieren mucho tiempo para evaluar muestras de cereales contaminadas con deoxinivalenol (DON).

En este trabajo final de máster se ha desarrollado la técnica de espectroscopía HSI-NIR con el objetivo de obtener métodos de alta precisión que permitan la cuantificación y clasificación del DON, así como también la determinación de ergosterol, en muestras de trigo y en granos individuales naturalmente contaminadas. Concretamente, se analizaron las dos determinaciones mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) como método de referencia y se obtuvieron imágenes hiperespectrales de cada una. Los datos espectrales se procesaron mediante un software de análisis multivariante.

Los mejores modelos de predicción mediante regresión de mínimos cuadrados parciales (PLSR) revelaron que la técnica HSI-NIR es capaz de predecir la concentración de ergosterol en muestras de trigo con un RMSEP (error cuadrático medio de predicción) de 1,17 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y un R^2 (coeficiente de determinación) de 0,89. A su vez, la mejor predicción de DON en muestras obtuvo un RMSEP de 501,36 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y R^2 de 0,61 mientras que en granos individuales un RMSEP de 0,88 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y R^2 de 0,88. La mejor precisión de clasificación obtenida mediante el modelo de análisis discriminante lineal (LDA) fue del 82,93% en muestras a granel y del 90,10% en granos individuales para dos categorías, según el nivel máximo de la UE (1250 $\mu\text{g}/\text{kg}$). También se evaluaron granos individuales según su sintomatología asociada a fusariosis de la espiga (FHB), con un 100% de clasificación. Los parámetros obtenidos en los diferentes modelos de predicción y clasificación confirman la posibilidad de aplicar la técnica HSI-NIR en la evaluación de granos de trigo, pero algunos no son lo suficientemente precisos, por lo que debe perfeccionarse, ajustarse a cada necesidad y considerarse un punto de partida para mejorar aún más los protocolos para la gestión de DON.

English

The great harmful effects on the health of humans and animals from the consumption of food contaminated with mycotoxigenic fungi and their toxins is a food safety risk that involves all parts of the food chain and its integrated management and control is of vital importance. In order to reduce this risk, hyperspectral imaging in the near infrared (HSI-NIR) is considered an emerging, rapid and promising technique capable of replacing the classical, expensive and destructive, time-consuming methods of evaluating samples of cereals contaminated with deoxynivalenol (DON).

In this master final project, the HSI-NIR spectroscopy technique has been developed with the aim of obtaining high accuracy methods that allow determining the quantification and classification of deoxynivalenol (DON), as well as the ergosterol determination, in wheat

samples at naturally contaminated bulk and individual grains. Specifically, the wheat samples were analyzed using high performance liquid chromatography (HPLC) as a reference method, hyperspectral images of each one were obtained, and the spectral data were processed by multivariate analysis software.

The best prediction models using partial least squares regression (PLSR) revealed that HSI-NIR is able to predict ergosterol concentration in bulk wheat samples with a RMSEP (mean square error of prediction) of 1.17 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and an R^2 (coefficient of determination) of 0.89. In turn, the best DON prediction in bulk samples obtained an RMSEP of 501.36 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and R^2 of 0.61, while in individual grain samples an RMSEP of 0.88 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and R^2 of 0.88. The best classification precision obtained by the linear discriminant analysis (LDA) model was 82.93% in bulk samples and 90.10% in individual grains for two categories, according to the maximum EU level (1250 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Individual grains were also evaluated according to their symptoms associated with *Fusarium Head Blight* (FHB), with a 100% classification. The parameters obtained in the different prediction and classification models confirm the possibility of applying the HSI-NIR technique in the evaluation of wheat grains, but some are not sufficiently precise. Therefore, it must be refined, adjusted to each need, and considered a starting point to further improve the protocols for DON management.

Català

Els grans efectes nocius per a la salut d'humans i animals per consum d'aliments contaminats amb fongs micotoxigènics i les seves toxines són un risc de seguretat alimentària que involucra a totes les parts de la cadena alimentària i és de vital importància la seva gestió i control integrat. Per tal de reduir aquest risc, l'adquisició d'imatges hiperespectrals en l'infraroig proper (HSI-NIR) es considera una tècnica emergent, ràpida i prometedora capaç de reemplaçar els mètodes clàssics, costosos i destructius, que requereixen molt de temps per avaluar mostres de cereals contaminades amb deoxinivalenol (DON).

En aquest treball final de màster s'ha desenvolupat la tècnica d'espectroscòpia HSI-NIR amb l'objectiu d'obtenir mètodes d'alta precisió que permeten determinar la quantificació i classificació de deoxinivalenol (DON), així com també la determinació ergosterol, en mostres de blat a granel i en grans individuals naturalment contaminats. Concretament, es van analitzar els dos tipus de mostres de blat mitjançant cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC) com a mètode de referència, es van obtenir imatges hiperespectrals de cadascuna, i les dades espectrals es van processar mitjançant un programari d'anàlisi multivariant.

Els millors models de predicció mitjançant regressió de mínims quadrats parcials (PLSR) van revelar que HSI-NIR és capaç de predir la concentració d'ergosterol en mostres de blat a granel amb un RMSEP (error quadràtic mitjà de predicció) de 1,17 mg/kg i un R^2 (coeficient de determinació) de 0,89. Al seu torn, la millor predicció de DO en mostres a granel va obtenir un RMSEP de 501,36 mg/kg i R^2 de 0,61 mentre que en mostres de grans individuals un RMSEP de 0,88 mg/kg i R^2 de 0,88. La millor precisió de classificació obtinguda mitjançant el model d'anàlisi discriminant lineal (LDA) va ser de l'82,93% en mostres a granel i de l'90,10% en grans individuals per a dues categories, segons el nivell màxim de la UE (1250 mg/kg). També es van avaluar grans individuals segons la seva simptomatologia associada a fusariosis de l'espiga (FHB), amb un 100% de classificació. Els paràmetres obtinguts en els diferents models de predicció i classificació confirmen la possibilitat d'aplicar la tècnica HSI-NIR en l'avaluació de grans de blat, però alguns, no són prou precisos. Pel que ha de ha de perfeccionar-se, ajustar-se a cada necessitat i considerar-se un punt de partida per millorar encara més els protocols per a la gestió de DON.

Introducción

Según estimaciones de la FAO, las pérdidas mundiales de productos alimenticios debido a micotoxinas son del orden de 1.000 millones de toneladas al año. A su vez, el 25% de los cultivos alimentarios mundiales, como el trigo, se ven afectados por hongos productores de micotoxinas (FAO, 1977). Las pérdidas de alimentos se traducen en una disminución de ingresos y en un impacto económico que afecta a toda la cadena alimentaria. Reducir estas pérdidas causadas por las micotoxinas podría significar, por lo tanto, un impacto inmediato y significativo en la Seguridad de los Alimentos.

En los últimos años, la introducción de un nuevo enfoque de la cadena alimentaria, donde el suministro de alimentos sanos, inocuos y nutritivos es una responsabilidad compartida a lo largo de la misma, ha puesto en búsqueda estrategias de prevención y control así como la adopción de medidas basadas en el análisis del riesgo para mejorar las condiciones sanitarias asociadas a micotoxicosis.

A lo largo de este trabajo, se expondrán los conceptos relacionados a lo mencionado anteriormente y se propone la aplicación de tecnología HSI-NIR en la detección y control de la micotoxina deoxinivalenol (DON) presente en el trigo.

1. Trigo, cultivo básico alimentario

Se entiende por trigo al grano obtenido de las distintas variedades de *Triticum vulgare* L. y de *Triticum durum*. La semilla de trigo destinada a alimentación tanto humana como animal deberá ser sana, limpia, exenta de sabor, olores anómalos, y otras partículas extrañas, y deberá permanecer bien conservada (FAO/OMS, 1995).

En cuanto a los aspectos nutricionales, un grano de trigo contiene 78,10% de carbohidratos, 14,70% de proteínas, 2,10% de grasas, 2,10% de minerales y proporciones considerables de vitaminas (tiamina y vitamina B) y minerales (zinc, hierro) (Kumar et al., 2011; Topping, 2007). A su vez, es una buena fuente de minerales traza como el selenio y el magnesio (Adams et al., 2002). Es por esto que el trigo y sus subproductos son considerados alimentos con un alto valor nutricional, y además aporta más calorías y proteínas a la dieta mundial que cualquier otro cultivo de cereales (Kumar et al., 2011). Por otra parte, se ha estudiado que brindan múltiples beneficios para la salud (Singh et al., 2016; Šramková et al., 2009).

Aparte de ser nutritivo, es fácil de almacenar y transportar y se puede procesar en varios tipos de alimentos. Los granos se procesan para elaborar harina de trigo que luego puede utilizarse para alimentos como pan, galletas, productos de repostería, fideos y gluten de trigo vital o seitán. El trigo también se utiliza en otras industrias como por ejemplo en la producción de piensos, producción de etanol, elaboración de cerveza de trigo, como materia prima a base de trigo para cosméticos, como proteína de trigo en sucedáneos de la carne, para fabricar compuestos de paja de trigo o incluso, en la elaboración de bioplásticos y biocombustibles (Kumar et al., 2011).

Los cereales en grano tales como el maíz, el trigo, el arroz y la cebada, son cultivados en grandes cantidades alrededor del mundo y proporcionan más nutrientes que cualquier otro tipo de cultivo; por tanto, son importantes tanto social como económicamente (FAO/OMS, 2020). La última previsión de la FAO sobre la producción mundial de cereales en 2020 ha sido corregida al alza con un aumento de 9,3 millones de toneladas en los últimos meses, y ahora se sitúa en casi 2.790 millones de toneladas, de las cuales, la producción mundial de trigo representa unas 761,5 millones (FAO, 2020).

Debido a su gran consumo y producción, la garantía de calidad e inocuidad del trigo es de suma importancia. Como tal, se pone un esfuerzo considerable en el control de enfermedades que afectan la producción así como también la ingestión de granos de trigo infectados presenta un riesgo considerable para la salud de los seres humanos y los animales (OMS, 2007).

2. Fusariosis de la espiga

Un problema crónico de los cereales en todo el mundo es la infección por hongos pertenecientes a los géneros *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Fusarium* spp. y *Alternaria* spp. (Wagacha & Muthomi, 2008a). Los mohos pueden invadir, colonizar y producir metabolitos durante la precosecha (en campo) o en las etapas de poscosecha (almacenamiento, transporte y procesamiento). Cuando la interacción patógeno/huésped es eficaz, estos mohos colonizan e invaden los granos, penetrando profundamente los tejidos mediante la secreción de enzimas para descomponer los productos complejos o mediante aberturas naturales, o generadas por insectos o daños mecánicos. En condiciones adecuadas de temperatura, humedad, actividad de agua y nutrientes, la contaminación avanza y el hongo puede desarrollar síntomas en la planta así como también diferentes metabolitos (Ramos, 2011).

La *Fusariosis de la Espiga* o *Fusarium Head Blight* (FHB) es una enfermedad fúngica que puede afectar a varios cereales de grano pequeño tales como el trigo, la cebada y la avena (Parry et al., 1995). El principal agente causal de FHB es *Fusarium culmorum* aunque también se han encontrado otras especies del género tales como *F. graminearum*, *F. poae*, *F. avenaceum*, *F. sporotrichoides* y *F. equiseti* (Aoki et al., 2014; O'Donnell et al., 2004; Parry et al., 1995).

Fusarium spp. es un género, perteneciente al filo Ascomycota, formado por más de 70 especies de hongos filamentosos que se encuentran distribuidos por todo el mundo. Estos microorganismos son comunes en el suelo y mientras algunas especies pueden crecer como saprófitas sobre residuos vegetales y otros sustratos orgánicos, otras son patógenas y pueden causar, en condiciones propicias, diversas enfermedades en las plantas (Leslie & Summerell, 2006).

En el trigo, la infección por FHB inicia cuando las esporas transportadas por diversos factores como el aire o desechos de cosechas anteriores, entran en contacto con el grano. Si ocurre en las primeras etapas del desarrollo de la semilla causa el mayor daño físico, aunque si se dan las condiciones adecuadas, el hongo puede infectar al grano hasta su cosecha (Alisaac et al., 2018).

Los tubos germinativos de los conidios, espora infectante del hongo, entran al tejido de la espiguilla a través de aberturas naturales de la misma y del tejido de la antera en degradación (Osborne & Stein, 2007). Con el desarrollo continuo de la enfermedad, la clorofila

se descompone y toda la espiguilla pierde su color y comienzan a aparecer manchas blanquecinas o rosadas producto del color del micelio (Trail, 2009). La producción de nuevos conidios favorece la propagación de la enfermedad desde la espiga infectada hacia otras espigas adyacentes de la misma o diferente planta (Brown et al., 2010; Ribichich et al., 2000).

Los granos de trigo infectados con hongos del género *Fusarium* son pequeños, marchitos, livianos y pueden estar cubiertos con decoloración blanca o rosada (McMullen et al., 2012). A su vez, la calidad tecnológica, nutricional y organoléptica también se puede ver afectada (Kreuzberger et al., 2015).

3. Micotoxinas en trigo

3. 1. Generalidades de las micotoxinas

Las micotoxinas son productos naturales de bajo peso molecular, producidos como metabolitos secundarios por algunos mohos filamentosos (toxicogénicos). Los principales géneros de hongos micotoxigénicos son *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp., *Alternaria* spp., y *Penicillium* spp. (Bennett, 1987).

Debido a sus diversas estructuras químicas, orígenes biosintéticos, diferentes efectos biológicos y su producción por diferentes especies de hongos, su clasificación no es sencilla. Una de las clasificaciones más comunes es según el género de hongo que la produce. Las principales micotoxinas son aflatoxinas, alcaloides del ergot, fumonisinas, ocratoxinas, patulina, toxinas de *Alternaria*, tricotecenos, zearalenona. En cuanto a su actividad toxicológica, la misma puede ser muy variada. La ingestión, inhalación o absorción cutánea puede llegar a producir diferentes enfermedades, que pueden afectar a diferentes órganos como el hígado, los riñones, o el cerebro, y que puede incluso, llegar a causar la muerte (Ramos, 2011).

En la actualidad, muchos hongos producen numerosos compuestos biológicamente activos, de los cuales un gran número son tóxicos para plantas y animales, incluidos los seres humanos. Cuando en un substrato (ya sea un cereal, fruta, o alimento elaborado) crece un moho, existe el riesgo de que haya una contaminación por micotoxinas. Si el alimento contaminado por micotoxinas es ingerido, puede desencadenar una micotoxicosis, lo que supone un riesgo a la salud del consumidor (Ramos, 2011). La enfermedad mencionada en el apartado anterior representa una amenaza significativa para la salud debido a que, durante la colonización del tejido vegetal y dadas las condiciones ambientales adecuadas, las especies de *Fusarium* pueden producir numerosas micotoxinas (Edite Bezerra da Rocha et al., 2014; Hussein & Brasel, 2001). Las principales micotoxinas metabolizadas por estos hongos son los tricotecenos, principalmente el deoxinivalenol, y sus derivados, así como zearalenona, fumonisinas, ácido fusárico, fusarenona, o enniantinas (Ferrigo et al., 2016).

3. 2. Deoxinivalenol

El deoxinivalenol (DON) es una micotoxina natural producida principalmente por *Fusarium graminearum* y comúnmente se la conoce como vomitoxina debido a sus fuertes efectos eméticos después del consumo, ya que es transportada al cerebro, donde corre por

receptores dopaminérgicos (Kushiro, 2008). A su vez, es probablemente el contaminante más conocido y común en los granos de cereales y sus productos derivados.

Químicamente, el DON es un compuesto orgánico polar, que pertenece a los tricotecenos tipo B y su nombre químico es 12,13-epoxi-3,7,15-trihidroxi-tricotec-9-en-8-ona (Nagy et al., 2005). En su molécula contiene 3 grupos hidroxilo libres (-OH), que están asociados a su toxicidad (Figura 1).

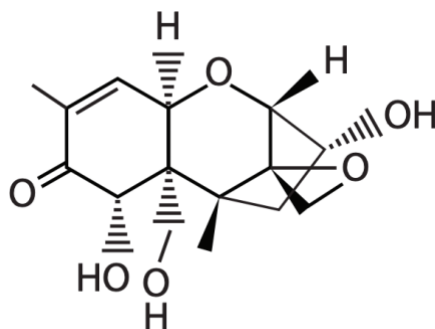


Figura 1. Estructura química del deoxinivalenol (Sobrova et al., 2010).

De su estructura química se derivan sus propiedades físicas y químicas que se muestran en la Tabla 1. Una de las propiedades fisicoquímicas más importantes del DON es su capacidad para soportar altas temperaturas. El hecho de que sea termoestable supone un riesgo a la hora elaborar alimentos a base de cereales porque puede estar presente en los alimentos una vez procesados (Kushiro, 2008; Vidal et al., 2018). A su vez, estudios informaron que, en el caso de la pasta y fideos cocidos, los niveles de DON se reducen debido a la lixiviación en el agua de cocción debido a que la micotoxina es soluble en agua (Sugita-Konishi et al., 2006; Visconti et al., 2004).

Tabla 1. Propiedades físicoquímicas del deoxinivalenol (Sobrova et al., 2010).

Propiedad	Información
Nombre	Deoxinivalenol (DON), vomitoxina
Nombre IUPAC	12,13-epoxi-3,7,15-trihidroxitricotec-9-en-8-ona
Fórmula molecular	$H_{15}O_{20}O_6$
Masa molar	296,32 g/mol
Punto de ebullición	$546,9 \pm 50,0$ °C
Punto de fusión	151- 153 °C
Presión de vapor	$4,26 \cdot 10^{-14}$ torr (a 25°C)
Solubilidad	Solventes polares orgánicos (por ej. metanol acuoso, etanol, cloroformo, acetonitrilo y acetato de etilo) y agua

3. 3. DON en la salud humana y animal, importancia y reglamentación

Aunque el DON suele estar presente en niveles bajos (como partes por millón o partes por billón), se han informado numerosos efectos nocivos debido a su exposición crónica o aguda en humanos y animales (Pestka & Smolinski, 2005).

En animales, una exposición crónica al DON se asocia a trastornos nutricionales como pérdida de peso y anorexia y a problemas inmunológicos, tales como la inmunosupresión (Eriksen & Pettersson, 2004). Por otra parte, la ingesta de alimentos contaminados con esta micotoxina en humanos puede resultar en trastornos gastrointestinales (diarrea, vómitos, náuseas y dolor abdominal), retraso del crecimiento en niños (Gong et al., 2004), reducción de la función inmunológica (Wagacha & Muthomi, 2008) y efectos adversos en el timo, bazo, corazón e hígado (Sobrova et al., 2010). A su vez, con exposiciones excesivas en un corto período de tiempo puede llegar a presentar consecuencias graves como la aparición de cáncer de hígado o incluso, la muerte (IARC, 2012; Lewis et al., 2005).

Por lo tanto, para evitar riesgos para salud, muchos países han establecido niveles máximos de DON antes de que los cereales se procesen e incorporen a la dieta humana y animal. En la Unión Europea (UE), el límite máximo establecido en alimentación humana de DON para trigo es de 1,25 mg/kg mientras que para alimentos procesados este valor es menor, siendo 0,75 mg/kg en harinas y pasta seca, 0,5 mg/kg en productos de panadería y 0,2 mg/kg en alimentos infantiles con el límite más estricto (CE, 2006c; EFSA, 2013a). Otros países, como Argentina, ha adoptado los valores establecidos por la Normativa del MERCOSUR, sumando una Resolución al Código Alimentario Argentino niveles de DON que oscilan entre los 0,2 mg/kg y 1 mg/kg para el trigo y sus subproductos (CAA, 2019). Sin embargo, no hay reglamentaciones suficientes para esta micotoxina a diferencia de las aflatoxinas, las cuales poseen numerosos estudios y las normativas son más específicas debido a su peligrosidad (carcinógena grupo 1 mientras que DON es grupo 2B) (IARC, 2012).

4. Gestión de seguridad alimentaria aplicada al DON

En los últimos años, el problema de la seguridad alimentaria mundial en relación a la contaminación de cultivos básicos con micotoxinas ha aumentado. La presencia de micotoxinas en los cereales, como el DON en trigo, conlleva importantes riesgos para la salud humana y animal, además de tener un gran impacto en la economía de las industrias y gobiernos. Por lo tanto, es importante prevenir, reducir y detectar cuanto sea posible este riesgo.

El DON es uno de los principales tricotecenos que se encuentran en el maíz y los cereales de grano pequeño, y es responsable de un impacto económico sustancial, principalmente en el trigo, la cebada, la avena y el centeno (Zain, 2011). La dieta europea se basa en gran medida en derivados del trigo, por lo que la exposición al DON puede ser significativa (Cano-Sancho et al., 2011; EFSA, 2014). En base a esto, numerosos estudios comenzaron a evaluar la exposición alimentaria al DON en Europa y en el mundo para poder establecer límites de regulación. El Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) del JECFA Y CODEX decidió convertir la ingesta diaria máxima tolerable provisional (IDTMP) para el DON en una IDTMP de 1 µg/kg de peso corporal para DON y sus derivados acetilados (3-Ac-DON y 15-Ac-DON) (EFSA, 2013b).

Debido a la dificultad de eliminar el DON de los granos una vez ya contaminados por su gran estabilidad en los mismos, todas las partes que forman la cadena alimentaria deben adoptar buenas prácticas para prevenir y reducir la contaminación por toxinas de *Fusarium* spp., y ello debe conseguirse merced a unos principios que se apliquen de manera uniforme. La medida de gestión más importante para reducir su presencia en alimentos y la exposición humana es la aplicación de unas buenas prácticas de higiene. Con el fin de reducir la incidencia de estas micotoxinas en los cereales se deben llevar a cabo unas buenas prácticas agrícolas (BPA) como primera línea de defensa contra la contaminación y luego como segunda línea de defensa unas buenas prácticas de fabricación (BPF) durante la manipulación, almacenamiento y distribución de los cereales. Además, también considerar el DON y otras micotoxinas dentro del sistema de Análisis de Peligros y de Puntos de Control Críticos (APPCC). Para ayudar en la gestión de este peligro, se han creado unas recomendaciones para la prevención y la reducción de micotoxinas que incluyen al DON (CE, 2006a, 2006b; Codex Alimentarius, 2003, 2012; FAO/OMS, 2003).

4. 1. Medidas de gestión de DON en el campo

Para lograr una gestión eficaz de los hongos y sus micotoxinas en el campo, se deben combinar diferentes estrategias de control. En la fase que va desde la siembra del cultivo hasta el transporte de la cosecha, es importante aplicar unas buenas prácticas agrícolas para reducir los factores de riesgo y entonces prevenir la contaminación del trigo cultivado (Gilbert & Haber, 2013) Las prácticas más importantes son: la rotación de los cultivos, la elección de la variedad o híbrido, la planificación de los cultivos (buenas condiciones meteorológicas), la gestión de los suelos, el uso preciso de los fungicidas, la cosecha, el secado, el almacenamiento y el transporte (CE, 2006a)

La rotación de cultivos permite reducir el riesgo de contaminación, esto se logra utilizando en las rotaciones cultivos que no sean huéspedes de *Fusarium* spp. como por ejemplo hortalizas, tubérculos, etc. La elección de semillas híbridas resistentes a fitopatógenos o variedades resistentes a climas adversos también es importante (Alisaac et al., 2018; Dweba et al., 2017). Por otra parte, existe una gran variación estacional en las micotoxinas de *Fusarium* en el trigo, y deben tenerse en cuenta los factores agronómicos para minimizar los niveles aplicando diferentes estrategias previas a la cosecha (Edwards & Jennings, 2018). Las espigas de trigo son particularmente sensibles a las infecciones por especies de *Fusarium*, cuando coinciden las lluvias o la humedad relativa alta y las temperaturas moderadas (Beyer et al., 2010). Algunas medidas para evitar el estrés vegetal ocasionado por condiciones climáticas como sequía, fuertes vientos o carencia de nutrientes pueden ser, la planificación de los tiempos de cosecha y siembra, adecuado riego, suministro óptimo de nutrientes esenciales, etc. Para esto es recomendable analizar el suelo para determinar la necesidad o no de fertilizantes u otros productos para garantizar un correcto pH del suelo y disponibilidad de nutrientes. Se debe reducir al máximo los daños provocados por insectos y por infecciones fúngicas cercanas al cultivo mediante un uso adecuado de fungicidas e insecticidas registrados y otras prácticas (Codex Alimentarius, 2003).

Antes de comenzar la cosecha es importante evaluar la calidad del grano teniendo en cuenta las limitaciones de un muestreo representativo y de un análisis rápido in situ. El contenido de humedad debe ser el más adecuado posible a fin de evitar o disminuir la probabilidad de contaminación. En cuanto a los equipos de recolección, debe asegurarse de que funciona correctamente y las condiciones de higiene son buenas ya que si no se pueden producir daños en el cereal y contaminaciones (CE, 2006a).

Durante el almacenamiento, se sabe que el crecimiento de moho y la producción potencial de DON pueden ocurrir, favorecidos por el ambiente frío y húmedo, o debido al alto nivel de humedad (Reddy et al., 2010). En esta etapa, se deben controlar a intervalos regulares su contenido en humedad y temperatura. Un aumento de la temperatura puede ser debido a proliferación microbiana o una infestación de insectos. Los procedimientos de mantenimiento y limpieza de las instalaciones de almacenamiento deben ser los adecuados. Puede incluir el uso de insecticidas o fungicidas registrados y/u otros métodos apropiados (CE, 2006a).

4. 2. Medidas de gestión de DON en la industria

A la entrada en fábrica se debe realizar un muestreo lo más representativo posible y analizar mediante equipos de análisis rápidos el contenido de DON para determinar si el lote es aceptable o si por el contrario supera el límite crítico. También es importante que los cereales que llegan tengan un contenido de humedad inferior al nivel seguro, que informará sobre la posibilidad de que haya podido crecer *Fusarium* y/u otros hongos y así sobre la producción de micotoxinas. Además, dentro del plan de control de proveedores se harán periódicamente analíticas instrumentales o por técnicas más precisas (FAO/OMS, 2003).

El muestreo tiene un papel fundamental en la precisión de la determinación del contenido de micotoxinas, que están distribuidas muy heterogéneamente en los lotes. Los criterios generales que se deben cumplir en el control oficial se detallan en el Reglamento (CE) No 401/2006. Durante el muestreo y la preparación de las muestras, deberán tomarse precauciones para evitar toda alteración que pueda afectar al contenido de micotoxinas y la representatividad de las muestras, la toma de muestras será efectuada por una persona autorizada y se adoptarán todas las medidas necesarias para el adecuado acondicionamiento y envío al laboratorio (CE, 2006b). Por otra parte, para el análisis de las muestras los laboratorios deberán estar acreditados siguiendo la norma EN ISO/IEC 17025 para garantizar que aplican el control de calidad analítica (EFSA, 2013a)

Durante las etapas de procesamiento, es difícil de eliminar el DON del cereal debido a que esta micotoxina no se destruye por completo en ninguna de las etapas comunes de procesamiento de trigo (Liang et al., 2018; Vidal et al., 2016). La influencia del procesamiento de alimentos sobre las micotoxinas en general, o sobre el DON en particular, ha sido revisada por varios autores (Bullerman & Bianchini, 2007; Castells et al., 2005, 2008; Hazel & Patel, 2004)

Las etapas de limpieza y clasificación de granos de trigo es una medida de control prometedor para reducir los niveles de micotoxinas en los alimentos. Por otra parte, la detección temprana y eliminación selectiva de los granos dañados y contaminados por hongos, permite asegurar la calidad de las semillas y la seguridad alimentaria. (Beyer et al., 2010).

En síntesis, la contaminación del trigo con DON puede deberse a muchos factores. Como las buenas prácticas no pueden controlarlos a todos (como en el caso de las condiciones climáticas) y no todos los factores tienen la misma importancia o puede haber interacciones entre ellos, es importante adoptar un planteamiento integrado que aborde todos los posibles factores de riesgo de una forma razonada y durante toda la cadena alimentaria del trigo. También es de vital importancia que se informe de las experiencias de años anteriores en la prevención y crecimiento de hongos y toxinas de *Fusarium*, de modo que puedan utilizarse en la determinación de las medidas que deben tomarse para prevenir la formación de estas toxinas en años venideros.

5. Métodos de detección y análisis

5. 1. Métodos de detección de FHB

Se han utilizado muchos métodos para determinar la contaminación fúngica en los cereales. Los métodos tradicionales incluyen técnicas microbiológicas (siembra en medios de cultivos selectivos y diferenciales, análisis microscópicos y algunos métodos rápidos), moleculares (por ej. PCR, RT-PCR) e inmunológicos (por ej. ELISA) (Castells et al., 2008; Frac et al., 2016; Gourama & Bullerman, 1995; Muthomi et al., 2008; Waalwijk et al., 2004).

Otro método para evaluar la contaminación fúngica es la medición de oxisterol 5,7-dieno, comúnmente denominado *ergosterol*. Dicho compuesto, es el esterol más abundante en las membranas celulares de los hongos. Su función principal es el mantenimiento de la estructura y función de las mismas, regulando la permeabilidad y la fluidez (Douglas & Konopka, 2014; Weete, 1989). Debido a que es específico de hongos, diversos autores lo han utilizado como un buen indicador de actividad fúngica y del nivel de contaminación. (Klamer & Bååth, 2004; Mille-Lindblom et al., 2004; Montgomery et al., 2000; Seitz et al., 1979).

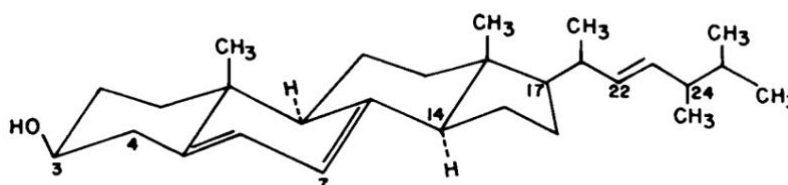


Figura 2. Estructura de la molécula de ergosterol ((22E,24R)-24-metilcolesta-5,7,22-trienol)(Weete, 1989)

El análisis visual humano en muestras de trigo ha sido el método tradicional para la clasificación de granos dañados por *Fusarium* (FDK). Los FDK presentan ciertas características visuales tales como, color blanquecino/rosado, textura arrugada, menor tamaño, entre otras, que permiten estimar la gravedad de la enfermedad. Si bien esta técnica es no destructiva y no requiere equipo especializado, la inspección visual es una tarea subjetiva sujeta a distorsiones psicológicas y cognitivas que requiere a su vez, un esfuerzo laboral, una persona capacitada y consistente (Bock et al., 2010a; S. R. Delwiche et al., 2019)

5. 2. Métodos de detección de DON

En cuanto a la detección y cuantificación de DON se han utilizado varios métodos cromatográficos de referencia, incluida la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detectores ultravioleta, de fluorescencia o espectrométricos de masas (MS), y la cromatografía de gases (GC) junto con detectores de ionización de llama o MS (Femenias et al., 2020a; Simsek et al., 2012; Sulyok et al., 2006; Trombete et al., 2016). Otros métodos para el análisis de micotoxinas se basan en el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) (Maragos et al., 2006), pruebas de tiras inmunocromatográficas (Krska & Molinelli, n.d.) y biosensores inmunoquímicos (Meneely & Elliott, 2014).

En la actualidad, entre todos los métodos tradicionales mencionados anteriormente los más utilizados son HPLC y ELISA dado que proporcionan estimaciones relativamente

precisas y confiables. Sin embargo, una de las desventajas más frecuentes presentes en ELISA son los falsos positivos debido a la reactividad cruzada de los anticuerpos y la dependencia de la matriz y los falsos negativos causados por la baja sensibilidad. A su vez, la cromatografía se caracteriza por una alta sensibilidad y selectividad, logrando una cuantificación precisa de micotoxinas (Ran et al., 2013).

A pesar de esto, estos métodos no son adecuados para la inspección de granos en línea en las industrias por varias razones. El ingreso de los granos a la fábrica y su correspondiente análisis de calidad e inocuidad requiere un alto rendimiento, una inversión de capital limitada y un tiempo de respuesta corto, mientras que para llevar a cabo estos métodos se necesitan equipos costosos, un laboratorio capacitado, tiempo de análisis y además la destrucción de las muestras (Lattanzio et al., 2009; Schaafsma et al., 2004).

Por el momento, las empresas que monitorean todos los lotes que ingresan, utilizan dispositivos de flujo lateral para detecciones rápidas, a pesar de tener una precisión limitada. Estos métodos de inspección o clasificación del grano se basan en la densidad del mismo utilizando una tabla de gravedad (Tkachuk et al., 1991) o en sus propiedades ópticas (Ruan et al., 1998), y solo son útiles para clasificarlos según densidad o analizar aspectos visuales de los granos, pero no para analizar DON.

Igualmente, existe un gran interés por parte de los agricultores y la industria alimentaria en aplicar técnicas alternativas de detección y cuantificación rápidas y no destructivas capaces de sustituir las existentes. Estas técnicas incluyen, espectroscopía en infrarrojo cercano (Pasquini, 2018), espectroscopía fotoacústica infrarroja transformada Fourier (Greene et al., 1992), imágenes computarizadas a color (Ma et al., 2016), narices electrónicas (Paollesse et al., 2006), adquisición de imágenes espectrales (Femenias et al., 2020a) o térmicas junto con los métodos de procesamiento de imágenes (Chelladurai et al., 2010), tomografía de neutrones (Cleveland IV et al., 2008), microtomografía computarizada y rayos X (Narvankar et al., 2009).

6. Espectrometría NIR-HSI

6. 1. Fundamentos NIR

La espectroscopía de infrarrojo cercano (NIR) utiliza el espectro electromagnético en el rango de 780 a 2500 nm y proporciona información estructural relacionada con el comportamiento de vibración de enlaces moleculares de hidrógeno (O-H, C-H, C-O y N-H) que conforman una sustancia analito. Cuando estos enlaces, junto con el resto de uniones químicas, son irradiados por frecuencias NIR presentan cambios de energía vibratoria y reflejan, transmiten o absorben, los haces de luz a diferentes longitudes de onda dependiendo la constitución química y los parámetros físicos de la muestra. Esta energía se puede medir en un detector el cual la traduce en un espectro de absorción NIR conformado por picos o bandas espectrales (Cen & He, 2007a).

Existen diferentes modos de medición de muestras en espectrometría NIR, los cuales se basan generalmente en, reflectancia, transmitancia o absorbancia. El haz de luz que incide al objeto, interactúa con él de manera que los rayos pueden reflejarse, transmitirse o absorberse, y esta interacción es lo que determina el modo de medición y la diferencia entre cada uno. Es muy importante interpretar estas variaciones de luz con la muestra ya que

pueden otorgar información importante acerca de las propiedades y características de la misma. Para la evaluación de muestras sólidas, como los granos de cereales, la reflectancia difusa es el modo más adecuado para distinguir características de los espectros NIR. Esto es debido a que el haz de luz en la reflectancia difusa tiene capacidad para penetrar parcialmente en la muestra (Pasquini, 2003).

La espectroscopia NIR convencional es una buena alternativa ya que posee tiempos de prueba reducidos, es no destructiva y no requiere productos químicos para la preparación de muestras como en los métodos analíticos químicos tradicionales. Sin embargo, es una técnica espacial limitada, especialmente para la medición de muestras heterogéneas (Manley, 2014).

Una de las desventajas de la espectrometría NIR convencional es que, según el modo de medición, los espectrofotómetros NIR no pueden capturar los constituyentes internos dentro de alimento, ya que la luz no penetra o penetra parcialmente. Esto puede resultar en diferencias entre la composición predicha y medida (Gowen et al., 2007)

Por otro lado, debido a que ésta técnica no se encuentra validada para todos los productos alimenticios existentes, siempre que se intente utilizar para una muestra en particular se debe validar el modelo de predicción teniendo en cuenta un método de referencia, como HPLC o ELISA. Esto hace que el error en técnica sea mayor porque surge de la sumatoria del error del método referencial más el error del modelo NIR, el cual debe ser el menor posible. En consecuencia, se necesitan tecnologías eficientes para la caracterización espacial de las muestras y a su vez, modelos de validación y calibración que permitan disminuir el error acumulado.

6. 2. Análisis hiperespectral

La técnica de imágenes hiperespectrales (HSI) muestra muchas ventajas comparada con la espectroscopía NIR tradicional. Se requiere una manipulación mínima y no destructiva de la muestra, posee medidas respetuosas con el medio ambiente, resultados extremadamente rápidos una vez validado el método y análisis de bajo costo (Sendin et al., 2018). Aunque no se han demostrado buenas sensibilidades a compuestos minoritarios (como el DON, entre otras micotoxinas), como para tener la eficacia suficiente para analizarlo de forma rutinaria, HSI-NIR posee mayor sensibilidad y fiabilidad en la detección de diferentes compuestos químicos mayoritarios en ubicaciones específicas en el grano, como proteínas, humedad, almidón, etc. (Xing et al., 2019; Zhao et al., 2020).

Descrita en Gowen et al. (2007), la técnica HSI combina los principios de la espectroscopía con la toma de imágenes tradicionales. Su ventaja es que no solo analiza muestras en múltiples longitudes de onda para generar una imagen, sino que también proporciona información espectral en cada píxel espacial de una muestra, lo que garantiza un mayor potencial analítico (Cen et al., 2016).

La Figura 3 muestra una representación esquemática de las tres dimensiones capturadas por la imagen, dos de ellas corresponden a la ubicación espacial del píxel y la tercera a la adquisición de datos espectrales a través del rango de longitudes de onda NIR. Además, también se presenta una ilustración de la respuesta espectral tanto para el píxel individual como para la imagen completa.

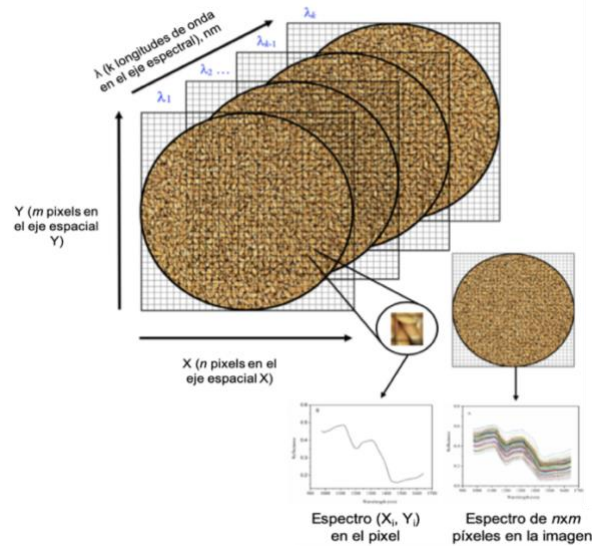


Figura 3. Diagrama de imagen hiperespectral para una muestra de trigo y la relación entre el eje espacial (X, Y) y el eje espectral (λ) (Femenias et al., 2020b)

Las múltiples combinaciones entre los vectores de imágenes (X, Y), que determinan la ubicación del píxel en la imagen, y el vector de información espectral para cada píxel en diferentes longitudes de onda crean un hipercono tridimensional que contiene una cantidad elevada de información (Dale et al., 2012). La información espacial y espectral permite a los investigadores la construcción de "mapas químicos" que muestran la distribución de ciertos componentes del grano (Feng & Sun, 2012).

Los principales sistemas para la obtención de imágenes hiperespectrales son: *push-broom imaging* (información espectral bidimensional a lo largo del eje espacial línea por línea), *whisk-broom scan* (generación de espectro para un solo píxel a la vez) y *staring imaging* (generación de un plan espectral a través del eje de longitud de onda) (Femenias et al., 2020b).

El más utilizado en la inspección de alimentos es el *push-broom* o método de barrido. Esta técnica se basa en el movimiento de la muestra en la dirección del eje Y mientras el espectrómetro registra los espectros de cada píxel en la línea del eje X, por lo que es una buena herramienta para escaneos y mediciones de muestras que se desplazan en línea (Boldrini et al., 2012).

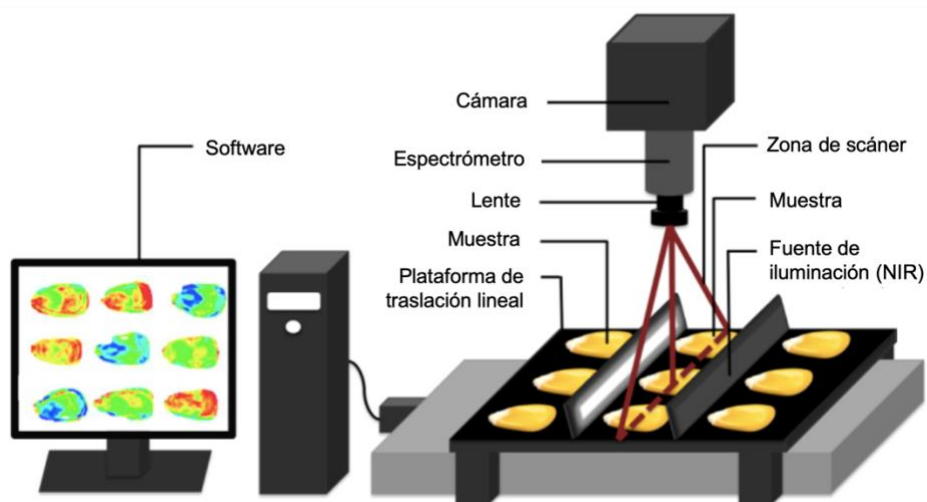


Figura 4. Esquema de un sistema de imágenes hiperespectrales NIR pushbroom (Sendin et al., 2018).

La Figura 4 muestra una representación esquemática de un instrumento de espectroscopía NIR-HSI *push-broom*. Los diferentes componentes que lo conforman son:

1. Fuente de luz o energía radiante: Las lámparas halógenas de tungsteno son las fuentes de iluminación comúnmente utilizadas en HSI-NIR. Esto se debe a su bajo costo, durabilidad, estabilidad y capacidad para emitir luz en un amplio rango espectral (400-2500 nm) (ElMasry & Sun, 2010). Otras fuentes de iluminación incluyen lámparas halógenas de cuarzo, diodos emisores de luz (LED), láseres sintonizables y lámparas de xenón (Sendin et al., 2018).
2. Dispositivo para la selección de la longitud de onda: El sistema divisor de haz juega un papel importante en el espectrómetro HSI-NIR y se utiliza como filtro de luz para convertir la luz multicolor en luz de un solo color (Cen & He, 2007a).
3. Unidad móvil para presentar la muestra: La muestra se escanea linealmente mediante un dispositivo formado por una plataforma de traslación y un motor. Ambos permiten el análisis de la muestra completa regulando la posición y velocidad mientras el sistema óptico se mantiene fijo.
4. Detector óptico para convertir la energía en una señal eléctrica: El sistema óptico incluye tres componentes, una cámara, un espectrógrafo y una lente objetivo. La cámara, caracterizada por sus propiedades electrónicas semiconductoras para la detección espectral y espacial, puede ser de dispositivo acoplado cargado (CCD) o de semiconductores de óxido metálico complementario (CMOS)(Gowen et al., 2007; Manley, 2014). El espectrógrafo, que se considera la clave del sistema, dispersa la luz en diferentes longitudes de onda para general un espectro para cada píxel de la imagen (ElMasry et al., 2012). Por último, la lente objetivo que está acoplada al espectrógrafo para enfocar el haz de luz desde el objeto escaneado al detector (cámara). Las condiciones de la cámara, espectrógrafo e iluminación determinan el rango espectral del sistema (Gowen et al., 2007).
5. Procesador de señal y lectura para analizar y procesar los datos: El instrumento de adquisición de datos se basa en un software de procesamiento informático que convierte los datos brutos obtenidos en datos de imágenes espectrales. Además, también permite la corrección de luz y oscuridad, mejora de la imagen, operaciones matemáticas simples y un gran volumen de almacenamiento de datos como imágenes de banda espectral (Femenias et al., 2020b). Estas funciones, requieren computadoras potentes con una capacidad significativa de almacenar la gran cantidad de información obtenida, lo que a menudo, contribuye al aumento del costo del instrumento (Manley, 2014).

El funcionamiento del sistema consiste, en primer lugar, en la iluminación de la muestra. El haz de luz reflejado de la muestra es captado por la lente del objetivo de la cámara, que hace pasar la luz a través de la óptica de difracción contenida en el espectrógrafo y entonces dispersa la señal para formar los componentes espectrales para cada píxel de la banda. La muestra se mueve más allá de la lente del objetivo en la plataforma de traslación y se repite el proceso formando más bandas. La unión de todas estas bandas forman una imagen bidimensional que junto con la información espectral acaban formando el hipercubo tridimensional que se almacena en un PC para su posterior análisis (Mcmullin et al., 2005)

6. 3. Pretratamiento de datos hiperespectrales

Las técnicas de preprocesamiento son herramientas útiles para reducir la variabilidad de los datos adquiridos del espectrometría HIS-NIR, los cuales contienen mucha información de fondo además de la información de la muestra (Cen & He, 2007a). Con el fin de mejorar el análisis de datos posterior (análisis exploratorio, desarrollo de modelos de calibración y clasificación), los objetivos principales del pretratamiento de datos son reducir el ruido, garantizar espectros suaves, eliminar el desplazamiento de la línea de base, linealizar los datos de los espectros y corregir los efectos de dispersión de la luz (Martens et al., 2003; Ozaki et al., 2007).

El éxito de los modelos depende de la selección de la técnica de preprocesamiento adecuada para reducir o mantener la complejidad del modelo. Por otro lado, se deben evitar los pasos de preprocesamiento demasiado estrictos porque pueden ocultar información valiosa de los datos espectrales. En la actualidad, existen muchos métodos de preprocesamiento, como *smoothing* o suavizado, tratamiento de 1ª o 2ª derivada, transformación variable normal estándar (SNV), corrección de dispersión multiplicativa (MSC), transformación de Fourier (FT) y algunos métodos nuevos que incluyen transformación de ondas (WT), corrección de señal ortogonal (OSC) y señal de analito neto (NAS) (Cen & He, 2007b).

Las derivadas primera y segunda se aplican ampliamente en espectroscopia analítica, tales transformaciones eliminan los efectos multiplicativos y aditivos. Las diferencias entre aplicar la primera o la segunda derivada es que la primera derivada se basa en la diferencia entre dos puntos espectrales posteriores y se elimina la línea de base. La segunda derivada se basa en los puntos espectrales sucesivos de la primera derivada, por lo que se eliminan las tendencias tanto de la línea de base como de la derivada (Tsai & Philpot, 1998).

La segunda técnica más aplicada utilizada para la corrección de la dispersión de NIR es el SNV. Este método de preprocesamiento es adecuado para eliminar las interferencias multiplicativas y aditivas de la dispersión en la distancia de la luz y el tamaño de las partículas (Barnes et al., 1989).

7. Análisis multivariante

Uno de los desafíos en las imágenes hiperespectrales es la alta dimensionalidad y la enorme cantidad de datos (Alisaac et al., 2018). Una vez preprocesados los datos que permiten reducir la variabilidad de información, se aplican herramientas estadísticas multivariantes para encontrar relaciones entre las muestras y las numerosas variables obtenidas. Las técnicas de análisis multivariante cualitativas más comunes son el análisis de componentes principales (PCA), el análisis de conglomerados (CA), el análisis discriminante lineal (LDA) y las redes neuronales artificiales (ANN). Para el análisis cuantitativo multivariante, las técnicas son mínimos cuadrados parciales (PLS), regresión de componentes principales (PCR) y regresión lineal múltiple (MLR) (Kumar et al., 2014).

- **Análisis Discriminante Lineal**

Un método de clasificación ampliamente utilizado en HSI es el análisis discriminante lineal (LDA), cuyo propósito es encontrar patrones de reconocimiento que permitan la separación de los datos en diferentes grupos. La técnica LDA maximiza la relación entre las varianzas de las muestras (u observaciones) comparadas con la varianza del

grupo completo, de esta manera detecta diferencias significativas entre grupos de datos sobre los que se observan variables discriminantes. En otras palabras, basándose en distancias calculadas según la información que contienen puede separar muestras en función de sus diferencias o agruparlas según sus similitudes (Esteki et al., 2018).

- **Regresión de mínimos cuadrados parciales**

Esta técnica estadística permite la predicción de concentraciones de muestras desconocidas a partir de datos espectrales se utilizan técnicas de regresión lineal y no lineal (Westad et al., 2013). La regresión de mínimos cuadrados parciales (PLSR) es una técnica cuantitativa que permite correlacionar variables de datos mediante regresión lineal para obtener predicciones posteriores. PLSR utiliza el enfoque de variables latentes ortogonales denominados componentes principales (PCs) para encontrar las relaciones fundamentales entre dos matrices (X e Y) en lugar de proyectar los datos en un espacio bidimensional. Así se construyen nuevos vectores en las direcciones de máxima varianza, reduciendo la gran cantidad de datos (167 longitudes de onda NIR) a un número limitado de variables o PCs. De esta manera, se modela la estructura en un máximo de covarianza X-Y y mejora la regresión posterior de la variable dependiente en estas direcciones (Liu & Rayens, 2007; Martens, 2001; Wold et al., 2001)

Los métodos de regresión, como el PLS, requieren un conjunto de datos de calibración y uno de validación. En la calibración se utilizan los valores de referencia y datos espectrales para calcular los coeficientes de regresión. En cambio, en la validación, idealmente se utiliza un conjunto nuevo de datos espectrales y los coeficientes de regresión obtenidos previamente en la calibración para predecir y medir las variables desconocidas y el error de predicción (Boldrini et al., 2012). La información del método de referencia y los datos espectrales utilizados para la calibración y la validación deben ser representativos de la población con la que se trabaja.

Para la validación, se puede utilizar un procedimiento de validación cruzada o un conjunto de muestras independiente (validación externa), con el fin de obtener un error realista de predicción y obtener valores de concentración lo más cercanos posible a la concentración real del analito de interés en muestras desconocidas a partir de sus datos espectrales.

Cuando no es posible acceder a dos conjuntos de muestras autónomas del conjunto de calibración, se utiliza un procedimiento de validación cruzada. En este caso, se deja una sola muestra fuera del conjunto de entrenamiento para cada iteración, y se realiza una validación cruzada de dejar uno afuera. De lo contrario, se lleva a cabo una validación cruzada de k veces cuando se deja fuera un grupo de muestras. Están separados en diferentes grupos (k), k-1 se usa para el entrenamiento de calibración y un grupo restante para el conjunto de prueba. El grupo del conjunto de prueba se cambia hasta que se hayan analizado todas las muestras (Ramírez-Morales et al., 2016). Por lo tanto, para construir un modelo ideal, se necesitan conjuntos grandes y representativos para la correcta calibración y validación del modelo. Esto demostrará la linealidad, especificidad y precisión del mismo para predecir futuras concentraciones de analito (Levasseur-Garcia, 2018).

Parámetros

La precisión de un modelo de calibración y de predicción es importante para seleccionar el de mayor rendimiento. Esto se puede determinar por su desempeño estadístico evaluando diferentes parámetros, los más utilizados son: coeficiente de determinación (R^2), error estándar de calibración o predicción (SEC, SEP), error estándar de validación cruzada

(SECV), error cuadrático medio de calibración o de predicción (RMSEC, RMSEP) y error estándar de predicción (SEP) (Chavez et al., 2013; Hossain & Goto, 2014).

El coeficiente de determinación (R^2) estima la varianza entre los valores de referencia y predichos y los valores de referencia frente a la varianza total. El SEP o SEC determinan la precisión del modelo. Sin embargo, debe corregirse mediante el sesgo, que considera la diferencia entre el valor esperado y su valor real. El RMSEP o RMSEC determinan la precisión de la calibración y está estrechamente relacionado con el SEP/SEC y el sesgo (Bellon-Maurel et al., 2010). El modelo a utilizar debe tener el R^2 más cercano a 1 y el SEP/SEC (corregido por sesgo) y el RMSEP/RMSEC más cercano a 0.

Objetivos

Parte 1.

Determinar la correlación entre la contaminación fúngica y la concentración de micotoxina en muestras de trigo.

- a. Determinar la concentración de ergosterol como marcador fúngico en muestras de granos enteros y granos molidos por HSI-NIR y posterior análisis de referencia por HPLC-UV.
- b. Determinar DON mediante el análisis de muestras de granos enteros y granos molidos por HSI-NIR y posterior análisis de referencia por HPLC-UV.
- c. Analizar la correlación de ambos mediante parámetros de regresión lineal.

Parte 2.

Cuantificar y clasificar de forma directa la concentración de DON en muestras de trigo mediante análisis HSI-NIR.

- a. Determinar DON mediante el análisis de muestras por HSI-NIR y posterior análisis de referencia por HPLC-UV.
- b. Analizar por estadística multivariante para la calibración de un modelo de predicción mediante PLSR de DON en trigo y un modelo de clasificación mediante LDA.

Parte 3.

Cuantificar DON en granos individuales de trigo y clasificar los mismos en base a los niveles máximos establecidos por el reglamento UE de DON (1250 $\mu\text{g}/\text{kg}$) mediante HSI-NIR.

- a. Determinar DON en granos individuales mediante análisis por HSI-NIR y posterior análisis de referencia por HPLC-UV.
- b. Analizar mediante estadística multivariante para la calibración de un modelo de predicción PLSR de DON y un modelo de clasificación LDA

Metodología

Materiales

Reactivos y productos químicos

El agua utilizada en todas las experiencias de laboratorio se obtuvo a partir de un sistema Agua Mili-Q® SP de Millipore Corp (Bruselas, Bélgica). Los químicos tales como el metanol y acetonitrilo (grado HPLC) se compraron de Scharlab (Sentmenat, España). Los estándares tanto de DON como de ergosterol, se compraron de Romer Labs (Tulln, Austria). Las columnas de inmunoafinidad (IAC) para DON (DONPREP®) se adquirieron de R-Biopharm (Rhone LTD Glasgow, Reino Unido). El hexano y el hidróxido de potasio (KOH) utilizados en el análisis de ergosterol se compraron en Scharlab S.L (Sentmenat, España) y VWR™ PROLABO (Leuven, Bélgica) respectivamente.

Métodos

Parte 1

Determinación de la correlación entre contaminación fúngica y DON en muestras de trigo a granel

A. Obtención y manejo de muestras

Una cooperativa agroalimentaria ubicada en la zona de Lleida recolectó muestras de trigo propias de la empresa y cultivadas entre los años 2017-2018. Las mismas fueron tomadas mediante un programa de control de calidad y bajo un sistema de toma de muestras adecuado. La cooperativa previamente ha realizado diversos estudios a las mismas, y proporcionó al grupo de investigación un número de muestras para continuar con otros análisis. Las muestras ingresadas al laboratorio se encontraban en bolsas de entre 200-500 gramos cada una y correctamente etiquetadas.

Para las experiencias propias de la Parte 1 se utilizaron un total de 50 muestras de granos de trigo. En el laboratorio se tomaron 14 gramos de muestra correctamente homogeneizada para el análisis por espectroscopía NIR. Luego, se repartieron en dos partes de 7 gramos cada una. Una parte se analizó por cromatografía HPLC para la detección de DON y la otra para la detección de ergosterol.

B. Determinación del espectro NIR para grano entero y grano molido

Se utilizó un sistema de captura de imágenes hiperespectrales compuesto por una cámara Pika NIR-320 ensamblada en RESONON Inc. (Boezman, MA, EE.UU.). El dispositivo consistía en una cámara de exploración de línea de sensor InGaAS con resolución de 320×256 píxeles, un tamaño de píxel de 30×30 μm , y un espectrógrafo A/D de resolución de 14 bits (Goldeye G-008 SWIR TEC1, Allied Vision Technologies GmbH, Alemania). La resolución espectral fue de 4,9 nm (164 bandas espectrales de 900 a 1700 nm), con 320 píxeles de resolución espacial y una velocidad de fotogramas de 90 fps. El objetivo tiene una distancia focal de 25 mm (F/ 1.4 SWIR, 0,9-1,7 μm , formato de imagen de 21 mm, montura C y está colocado a 220 mm por encima de la superficie de la imagen. La unidad de iluminación estaba compuesta por un sistema de iluminación de cuatro lámparas halógenas con filtros lambertianos fijados en una torre ajustable que se enciende al menos 20 minutos antes de la adquisición de la imagen. El sistema de iluminación funciona con un convertidor de potencia Samplexpower® (SEC-1223CE, Burnaby, BC, V5A 0C6, Canadá) que proporciona un voltaje de CC de salida altamente regulado de 13,8 voltios a 23 amperios con una entrada de CA de 230 voltios, 50 Hz. Finalmente, también se utilizó una plataforma de translación lineal motorizada de 600 mm, que permitió el paso de las muestras por el campo visual de la cámara para un escaneo completo de la imagen. Para controlar las funciones y herramientas del equipo se utilizó el software Spectronon PRO.

Previo al análisis de las muestras, las mediciones de reflectancia requirieron una calibración del instrumento debido a las condiciones de iluminación reales. Para esto, se

captaron imágenes de intensidad de corriente oscura cubriendo la lente de la cámara para eliminar el ruido de corriente oscura. Inmediatamente, se recogieron imágenes a partir del material de referencia PTFE (Spectralon™, SRT-99-120, Labsphere, North Sutton, NH, EE. UU.) el cual posee una intensidad de reflectancia del 99%. Estas dos imágenes obtenidas se aplicaron a las imágenes de cada una de las muestras analizadas posteriormente. Las lecturas de intensidad de cada conjunto de datos de muestra de prueba se transformaron automáticamente en reflectancia mediante la siguiente fórmula:

$$I = \frac{I_0 - I_b}{I_w - I_b}$$

Donde I_0 es la imagen del espectro entero obtenido, I_b es la obtenida a partir del material de referencia blanca y I_w es la obtenida a partir de la corriente oscura. Además de esta calibración, también se ajustaron la saturación de iluminación de píxeles. La velocidad de fotogramas y el tiempo de integración se establecieron de modo que no se saturara ningún píxel en la imagen.

Luego de la calibración del equipo, cada una de las 50 muestras de grano entero se escanearon por triplicado sobre una bandeja negra para reducir el ruido de fondo de la imagen y obtener una selección precisa de píxeles. Las imágenes se ajustaron a 350 bandas para tamaño horizontal y aproximadamente 90 mm de tamaño vertical. Luego, se molieron los granos hasta la consistencia de harina y se colocaron en Placas de Petri. Cada una de las muestras de grano de trigo molido también se escanearon por triplicado bajo el sistema.

Para ajustar los datos brutos obtenidos se aplicaron herramientas de pretratamiento de datos espectrales. La selección de píxeles de cada imagen se realizó mediante la recopilación de reflectancias medias de píxeles de espectro similares por distancia euclidiana que se ajustan mejor a la región de interés (ROI) para eliminar la señal de fondo. Una vez seleccionados las ROI, se seleccionó el espectro medio (Raw Spectra) y el valor de la primera derivada (1ªD) de cada uno. Estos valores obtenidos se registraron como archivo de texto para su posterior exportación al software de análisis espectral.

C. Determinación de la concentración de DON por HPLC

La extracción de DON de las muestras se realizó utilizando columnas de inmovilización específicas (DONPREP®) siguiendo las instrucciones del fabricante, pero con pequeñas modificaciones según Femenias et al. (2020a). En primer lugar, se mezclaron 7 gramos de trigo previamente molido con un molino IKA® A11 Basic (Darmstadt, Alemania) con 43 ml de agua MiliQ en un matraz Erlenmeyer de 250 ml, seguido de 10 minutos de agitación. Luego, las muestras se centrifugaron en tubos falcon de 50 mL durante 10 minutos a 1780 RCF. El sobrenadante se filtró a través de un filtro de papel de microfibras de vidrio de 90 mm de diámetro (Whatman™ GF / A, Maidstone, Reino Unido) y se pasaron 5 ml del filtrado a través de la columna de inmovilización. Luego se lavó la columna con 10 ml de agua bidestilada y se eluyó la toxina con 3 ml de metanol de grado HPLC (los primeros 1,5 ml realizaron retrolavado). Las muestras se evaporaron bajo una corriente baja en nitrógeno a 40°C y se resuspendieron en la fase móvil (acetonitrilo: metanol: agua, 5:5:90, v/v/v). Cada extracto resuspendido se filtró a través de un filtro de nylon (0,4 µm) antes de inyectarse en el sistema UHPLC-DAD.

Previo al análisis de DON, se realizó una curva de calibración. Para ello, se prepararon soluciones de diferentes concentraciones a partir de una solución madre. La concentración de esta solución patrón se verificó mediante espectroscopía UV de acuerdo con los Métodos Oficiales de Análisis de AOAC, Capítulo 49 (AOAC, 2005), obteniendo una concentración de 7,2 mg/kg DON. Las soluciones estándar de DON se prepararon por dilución apropiada de volúmenes conocidos de la solución madre con la fase móvil y se almacenaron a 4°C hasta su posterior medición.

Para la determinación del contenido de DON en cada muestra se utilizó un sistema isocrático de cromatografía líquida de alta resolución (Agilent Technologies 1260 Infinity UHPLC- California, EE.UU) junto con un detector de matriz de diodos Agilent 1260 Infinity II (DAD). Se usó una columna Gemini® C18 de Phenomenex 150×4,6 mm (California, EE.UU) con un tamaño de partícula de 5 µm y un tamaño de poro de 110 Å. La longitud de onda de absorción se ajustó a 220 nm. La fase móvil estaba compuesta de metanol:acetonitrilo:agua (5:5:90, v/v/v) y se ajustó a un caudal de 1 ml/min. La temperatura de la columna fue de 40°C, el volumen de inyección fue de 50 µL y el tiempo de ejecución total fue de 15 min. El desempeño del método para la cuantificación de DON en trigo fue publicado previamente en Femenias et al. (2020a) en el que se consideró que el límite de detección (LOD) era tres veces la señal del blanco (50 µg/kg).

D. Determinación de la concentración de ergosterol por HPLC-UV

La extracción de ergosterol se llevó a cabo mediante el método de extracción por saponificación. Se colocaron 7 gramos de cada muestra de granos de trigo previamente molidos en Enrlenmeyer con 28 mL metanol (10% KOH) y se agitó la solución durante 30 minutos. Luego, se filtraron a través de un filtro de papel de 90 mm de diámetro (WhatmanTM 113/A, Maidstone, Reino Unido) y se pasaron 10 mL del filtrado a tubos Falcon 50 mL para su posterior baño termostático a 55-60°C durante 30 minutos. Pasado dicho tiempo, se agregaron a cada tubo 3 veces 2 mL hexano (a excepción de la primera vez que se agregó también 2 mL H₂O) y se agitó cada vez la solución durante un minuto. El sobrenadante fue colocado en tubos de 15 mL con tapa de rosca. El volumen total obtenido en los tubos se evaporó bajo una corriente baja en nitrógeno a 40°C y el extracto obtenido se resuspendió en la fase móvil (acetonitrilo: metanol: agua, 5:5:90, v/v/v). Por último, cada uno se filtró a través de un filtro de nylon (0,4 µm) antes de inyectarse en el sistema UHPLC-DAD.

Para la curva de calibración, se prepararon soluciones de diferentes concentraciones a partir de una solución madre de ergosterol. La concentración de esta solución patrón se verificó mediante espectroscopía UV de acuerdo con los Métodos Oficiales de Análisis de AOAC, Capítulo 49 (AOAC, 2005), obteniendo una concentración de 190 ppm. Las soluciones estándar se prepararon por dilución apropiada de volúmenes conocidos de la solución madre con la fase móvil y se almacenaron a 4°C hasta su posterior medición.

Para la determinación del contenido de ergosterol en cada muestra se utilizó un sistema isocrático de cromatografía líquida de alta resolución. El equipo consistió en un sistema HPLC Waters 2695, con una columna analítica Waters Spherisorb 5 µm ODS2, 4,6×250 mm, junto con un detector de absorbancia dual λ visible/visible Waters 2487 a 282 nm. La fase móvil estaba compuesta de metanol:acetonitrilo:agua (5: 5: 90, v/v/v) y se ajustó a un caudal de 1 ml/min. La temperatura de la columna fue de 40°C, el volumen de inyección fue de 100 µL y el tiempo de ejecución total fue de 18 min. El desempeño del método para la cuantificación de ergosterol en trigo fue publicado previamente en (Seitz et al., 1979).

E. Análisis de la correlación mediante parámetros de regresión lineal

La evaluación de la correlación de los datos de DON y ergosterol por HPLC obtenidos en cada una de las muestras se llevó a cabo mediante el análisis de datos por regresión lineal, teniendo en cuenta el valor de R como parámetro de correlación y de R^2 como parámetro de ajuste.

F. Análisis multivariante de los datos a partir de espectroscopía NIR

Para conocer si los datos de concentración de ergosterol obtenidos por la técnica de HPLC tienen correlación o pueden ser explicados por los obtenidos a partir de la técnica de espectroscopía NIR se utilizó el Método de Regresión de Mínimos Cuadrados Parciales (PLSR, Partial Least Squares Regression). El análisis se realizó con el programa estadístico Unscrambler versión 7.6 SR1 CAMO (Oslo, Noruega - 2001).

En este estudio la variable independiente X estuvo formada por los diferentes valores de concentración obtenidos por HPLC (método de referencia) y la variable dependiente Y por todos los datos de espectrales pretratados y obtenidos por espectroscopía NIR para cada longitud de onda (893- 1770 nm). Debido al pequeño número de muestras con las que se realizó el análisis, se utilizó el mismo conjunto para calibración como para validación. Se llevó a cabo un procedimiento de validación cruzada en ambos casos.

Para mejorar el rendimiento del análisis y ajustar adecuadamente el modelo a los datos, se tuvieron en cuenta el número de Componentes Principales (PC). El criterio utilizado para seleccionar el número óptimo de PC, fue detectar el mismo donde se producía una ruptura en la curva de la varianza residual de validación o se observaba un mínimo en el error de predicción (RMSEP, Root Mean Square Error of Prediction). Al mismo tiempo que se ajustó el número óptimo de PCs, se quitaron del modelo aquellas muestras "outliers" que se desviaban de la normalidad. Para eliminar estos valores atípicos se representó la gráfica de varianza residual vs *leverage* (o apalancamiento). Se rechazaron aquellos que presentaban valores máximos tanto de *leverage* como varianza residual. Las muestras ideales eran las que presentaban mucho *leverage* pero poca varianza residual. Las mismas poseen mucha influencia en el modelo y se ajustan adecuadamente al mismo, por lo que no fueron eliminadas. Menos del 10% de los espectros originales fueron eliminados.

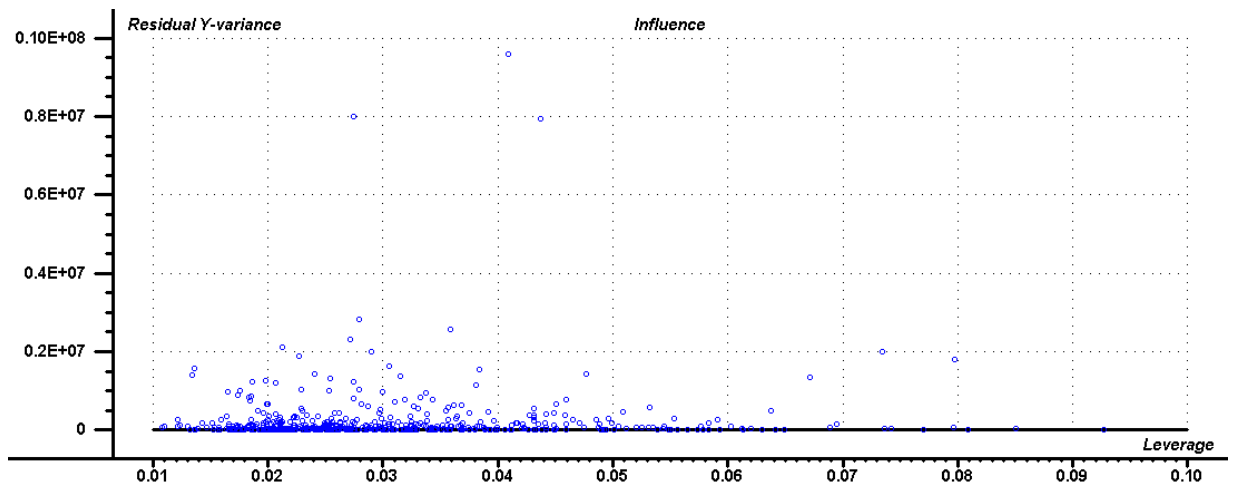


Figura 5. "Influence plot" o Gráfico de influencia en donde se representan cada una de las muestras en función de su varianza residual y leverage.

Para finalizar, el rendimiento del modelo se evaluó mediante diferentes parámetros estadísticos. Los mismos fueron: slope, offset, correlación, R^2 , RMSEP, SEP, RMSECV, RPD, entre otros.

Parte 2

Cuantificación del contenido de DON en muestras de granos de trigo mediante el análisis por HSI-NIR y posterior clasificación de las mismas

A. Obtención y manejo de muestras

Para las experiencias pertinentes a la Parte 2, se utilizaron un total de 165 muestras de granos de trigo proporcionadas por la empresa mencionada anteriormente. Las muestras se encontraban en bolsas de entre 200-500 gramos cada una y correctamente etiquetadas. En el laboratorio se homogeneizaron las muestras y se tomaron 14 gramos de cada una para el análisis de muestra entera por espectroscopía NIR. Luego, estos mismos gramos se molieron para el análisis de muestra de granos de trigo molidos por espectroscopía NIR y posterior detección de DON por cromatografía HPLC.

B. Determinación del espectro NIR para grano entero y grano molido

En la determinación del espectro NIR, se utilizó el mismo sistema NIR-HSI descrito en la Parte 1B, previamente calibrado. Para la obtención de las imágenes hiperspectrales, las mismas se ajustaron a 350 bandas para tamaño horizontal y aproximadamente 90 mm de tamaño vertical. En primer lugar, se colocaron las 165 muestras de granos de trigo entero sobre una bandeja negra y se tomaron las imágenes por triplicado, obteniendo un total de 495 imágenes. Luego, se molió cada muestra hasta llegar a la consistencia de harina, las cuales fueron colocadas en placas de Petri para obtener nuevamente su imagen hiperspectral en el equipo. Se obtuvieron un total de 495 imágenes hiperspectrales de muestras de granos molidos.

Los datos obtenidos se procesaron con el programa Spectronon PRO, en el que se seleccionaron las ROI para cada imagen. Para ajustar los datos brutos obtenidos se aplicaron herramientas de pretratamiento de datos espectrales. Primeramente, se seleccionó el espectro medio (Raw Spectra) y el valor de la 1ªD de cada uno. Estos valores obtenidos se registraron como archivo de texto para su posterior exportación al software de análisis espectral.

C. Determinación de la concentración de DON por HPLC

Para la extracción de DON y posterior cuantificación por HPLC se utilizaron 14 gramos de cada una de las 165 muestras de granos de trigo molidos. El análisis se llevó a cabo de igual manera que en la Parte 1.C. A diferencia del estudio anterior, en este caso se utilizaron 14 gramos de muestra molida para todo el análisis y la prueba de determinación de ergosterol no se hizo.

Vale aclarar que también se realizó, previo al análisis, una curva de calibración. Para ello, se prepararon soluciones de diferentes concentraciones a partir de una solución madre. La concentración de esta solución patrón se verificó mediante espectroscopía UV de acuerdo con los Métodos Oficiales de Análisis de AOAC, Capítulo 49 (AOAC, 2005), obteniendo una concentración de 7,4 mg/kg DON. Las soluciones estándar de DON se prepararon por dilución apropiada de volúmenes conocidos de la solución madre con la fase móvil y se almacenaron a 4°C hasta su posterior medición.

D. Análisis estadístico multivariante por el modelo de predicción PLSR y por el modelo de clasificación de muestras LDA

Para conocer si los datos de concentración de DON, tanto en las muestras de grano entero como de grano molido, tienen correlación con los obtenidos a partir de espectroscopía NIR se llevó a cabo un PLSR como método cuantitativo de análisis multivariante. Dicha técnica se realizó en el software Unscrambler versión 7.6 SR1 CAMO (Oslo, Noruega - 2001) siguiendo los pasos mencionados en la Parte 1.F.

En este caso, debido al mayor número de muestras que se analizaron, se establecieron dos procedimientos de validación. En primer lugar, se realizó una validación cruzada con las 165 muestras para ver cómo se ajustaba el modelo. Luego, estas muestras se separaron en dos grupos o *clusters*, 83 se utilizaron como conjunto de datos para la calibración del modelo y otros 82 para la validación. En la calibración se realizó una validación externa teniendo en cuenta tanto los valores de espectroscopía como los de concentración. En cambio, para la validación del modelo, se llevó a cabo una validación externa sólo con los datos obtenidos de espectroscopía NIR. Al final del análisis, se obtuvieron tanto parámetros de calibración como de validación.

Además del modelo PLSR, que permitió relacionar los datos espectrales y el contenido de toxinas de manera cuantitativa, se realizó un método cualitativo de clasificación de muestras denominado Análisis Discriminante Lineal (LDA). El análisis estadístico LDA se realizó con el software JMP PRO 14.1.0 (SAS Institute Inc., 2018). Se caracterizaron dos clases, según el límite legal establecido de la Unión Europea para DON (1250 µg/kg). En primer lugar, se cargaron al programa los datos de reflectancia para cada longitud de onda obtenidos por espectroscopía NIR. Luego, teniendo en cuenta los datos de concentración obtenidos por cromatografía, las muestras que estaban por encima del límite legal se denominaron C, y las que se encontraban por debajo, B. Se realizó en primer lugar una validación cruzada con la totalidad de las muestras. Luego, de igual manera que en el modelo PLS, se separaron las 165 muestras en dos grupos de 83 y 82 cada uno, un conjunto se utilizó para la calibración del modelo y otro para la validación del mismo respectivamente.

Parte 3

Cuantificación del contenido de DON en muestras de granos individuales de trigo mediante el análisis por HSI-NIR y posterior clasificación de las mismas

A. Obtención y manejo de muestras

Para llevar a cabo las experiencias pertinentes a la Parte 3 se utilizaron muestras proporcionadas por la cooperativa agroalimentaria mencionada anteriormente. En el laboratorio se seleccionaron al azar 50 granos de trigo y se les asignó un número de muestra a cada uno (del 1 al 50). Luego, se registró su peso y se los clasificó en 3 categorías mediante inspección visual de acuerdo a los síntomas típicos causados por la infección por *Fusarium* spp. (por ejemplo, arrugas, marchitamiento, decoloración, menor tamaño). De acuerdo a esto, las categorías fueron *Asintomático* (A), *Medianamente Asintomático* (M) y *Sintomático* (S).

B. Determinación del espectro NIR

Para la determinación de las imágenes hiperespectrales, se utilizó el mismo sistema NIR-HSI descrito en la Parte 1B, previamente calibrado. Se colocaron las 50 muestras de granos individuales de trigo sobre una bandeja negra y en filas con una distancia de 0,5 cm entre cada uno. Las imágenes se ajustaron a 350 bandas para tamaño horizontal y aproximadamente 90 mm de tamaño vertical. Se tomó una misma imagen por triplicado para todos los granos juntos.

Los datos obtenidos se procesaron con el programa Spectronon PRO, en el que se seleccionaron las ROI para cada imagen. Para ajustar los datos brutos obtenidos se aplicaron herramientas de pretratamiento de datos espectrales. Primeramente, se seleccionó el espectro medio (Raw Spectra), luego el valor de la 1ªD de cada uno. Estos valores obtenidos se registraron como archivo de texto para su posterior exportación al software de análisis espectral. Se aplicó también el SNUV como pretratamiento espectral adicional con el programa Unscrambler versión 7.6 SR1 CAMO (Oslo, Noruega - 2001).

C. Determinación de la concentración de DON por HPLC

La extracción de deoxinivalenol y posterior cuantificación por HPLC se realizó en base a las 50 muestras de granos individuales de trigo. El protocolo de trabajo del apartado C de la Parte 1, se adaptó para permitir el análisis de este tipo de muestra.

Para la extracción de DON se molieron cada uno de los granos manualmente con un mortero. El producto de la molienda se colocó en 300 µl de agua MiliQ en tubos Eppendorf, seguido de 10 minutos de agitación. Luego, las muestras se centrifugaron durante 10 minutos a 1780 rpm. El sobrenadante se filtró a través de jeringas que contenían filtros PTFE 0,22 µm 13 mm, y se colocó en viales con tubos insertos antes de inyectarse en el sistema UHPLC-DAD.

Previo al análisis de DON, se realizó una curva de calibración. Para ello, se prepararon soluciones de diferentes concentraciones a partir de una solución madre. La concentración de esta solución patrón se verificó mediante espectroscopía UV de acuerdo con los Métodos Oficiales de Análisis de AOAC, Capítulo 49 (AOAC, 2005), obteniendo una concentración de 7,4 mgr/kg DON. Las soluciones estándar de DON se prepararon por dilución apropiada de volúmenes conocidos de la solución madre con la fase móvil y se almacenaron a 4°C hasta su posterior medición.

D. Análisis estadístico multivariante por el modelo de predicción PLSR y por el modelo de clasificación de muestras LDA

Para comprender si los datos de concentración de DON en las muestras de granos individuales están relacionados con los datos obtenidos del espectro NIR, se realizó el método PLSR con la totalidad del espectro NIR (895,4-1731) y luego sin los extremos (1000-1650). Se utilizaron los datos de la 1ªD, SNUV y luego los dos juntos. El software utilizado fue The Unscrambler (versión 7.6 SR1, CAMO, Oslo, Noruega, 2001). Dado el bajo número de muestras, se realizó una validación cruzada (*leave-one-out*) en el procedimiento de calibración del modelo así como también en la validación. El mismo conjunto de datos se utilizó en las dos etapas. El método estadístico se llevó a cabo para obtener los parámetros de regresión que expliquen de la mejor manera el modelo.

Por otra parte, en el mismo software The Unscrambler, se realizó un modelo de predicción multiespectral. Para ello, teniendo en cuenta la gráfica de coeficientes de regresión vs longitudes de onda resultando de los modelos PLSR anteriores, se seleccionaron aquellas longitudes con valores de coeficientes más alto y se eliminaron las demás sin comprometer el rendimiento del modelo. Este método disminuye el número de PCs con los que se trabaja debido a que se eliminan variables. Se desarrollaron nuevos modelos PLSR para evaluar el rendimiento obtenido en comparación con los modelos hiperespectrales.

Para la clasificación de los granos se llevó a cabo el modelo estadístico LDA con el software JMP PRO 14.1.0 (SAS Institute Inc., 2018). Se realizó este análisis para los datos de las categorías de granos mencionadas anteriormente (A, M y S) y otro para los datos obtenidos de espectroscopia NIR. En ambos casos, se realizó validación cruzada utilizando el mismo conjunto de muestras tanto para la calibración como para la validación del método.

Resultados y Discusión

Parte 1

Determinación de la correlación entre contaminación fúngica y micotoxina en muestras de trigo

A. Análisis de la correlación ergosterol vs DON mediante parámetros de regresión lineal

Tal como se puede observar en la Figura 6, la distribución de ergosterol en las muestras no siguen una distribución normal. En cambio, se encuentra desplazado hacia la izquierda, con valores por debajo de la media. En cuanto a la frecuencia, hay mayor número de muestras con concentraciones bajas, tal como se puede observar en la barra perteneciente al grupo 2-4 y 4-6 mg/kg de ergosterol.

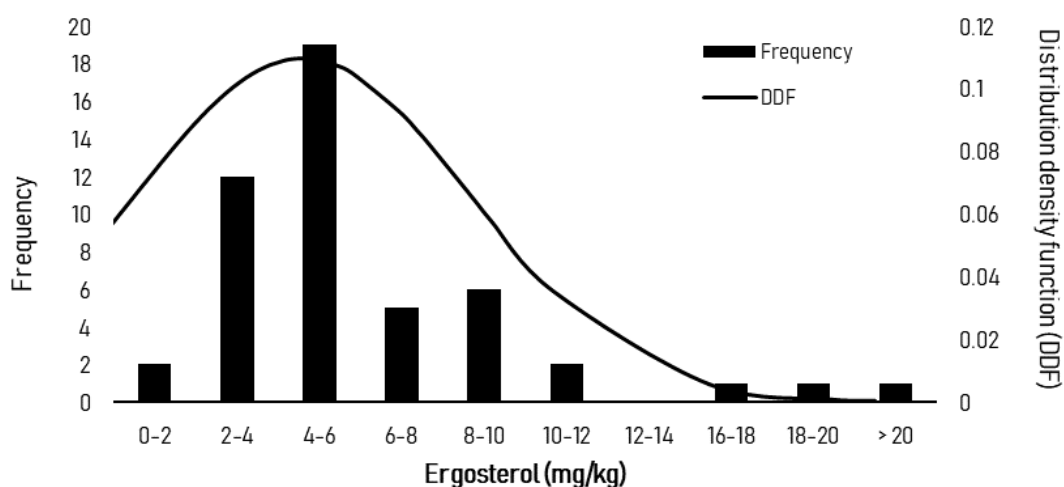


Figura 6. Distribución del contenido de ergosterol en muestras de trigo a granel.

La Figura 7 permite observar si los datos de ergosterol obtenidos a partir de HPLC siguen una relación lineal con respecto a los datos de DON obtenidos a partir de HPLC. Tal como se puede observar en el gráfico, los datos no siguen este modelo sino que se encuentran dispersos, especialmente a concentraciones bajas. A su vez, el parámetro de regresión R^2 , presentó un valor de 0,37, cuando en un modelo lineal óptimo es cercano a 1. Como en este trabajo no se encontró correlación suficiente, se concluye que no se puede estimar el contenido de DON a partir del de ergosterol. A diferencia de esto, los estudios de Abramson et al. (1998) demostraron que sí existe cierta relación entre el contenido de ergosterol y DON, con un coeficiente de correlación lineal de 0,76 en muestras de trigo duro. Sin embargo,

Dowell et al. (1999) en su estudio demostraron que no siempre la biomasa fúngica se correlaciona con el nivel de contaminación de toxinas. En su trabajo, los investigadores observaron que todos los granos identificados con FHB tenían cantidades detectables de DON y ergosterol, siendo cada vez mayores cuando el peso del grano disminuía (este es un parámetro sintomático que se evalúa en granos con FHB). Sin embargo, encontraron cantidades significativas de ergosterol en granos identificados como sanos y en granos con FHB que no contenían DON. Entonces, el hecho de que se detecte la presencia de ergosterol en niveles altos, no es indicativo de contaminación por *Fusarium* spp. o DON. Todos los hongos que se encuentran normalmente en los cereales contienen ergosterol. Por lo tanto, la presencia de ergosterol puede indicar la presencia de otros hongos o que el ergosterol estaba presente antes de que se produjera el DON. Aunque la biomasa fúngica no siempre se correlaciona con el nivel de contaminación por micotoxinas, el ergosterol se puede utilizar específicamente como un buen indicador de la actividad fúngica.

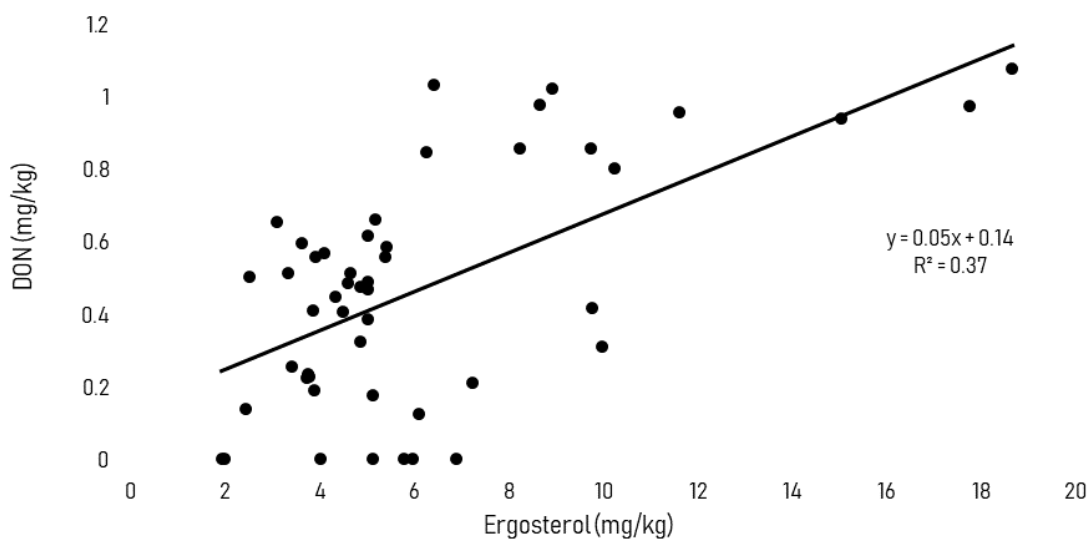


Figura 7. Curva de regresión lineal concentración de DON vs. Concentración de ergosterol en muestras de trigo.

B. Cuantificación de ergosterol en muestras de trigo mediante PLSR

En este paso, se aplicaron modelos PLSR para predecir las concentraciones de ergosterol en muestras de granos de trigo enteras y molidas. El modelo se basó en un conjunto de 150 imágenes (de 50 muestras escaneadas por triplicado) utilizadas para la calibración del modelo. Las muestras introducidas al análisis estaban naturalmente contaminadas y presentaron un rango de contaminación de ergosterol entre 2 - 18,5 mg/kg.

En la Tabla 2 se muestra un resumen de los parámetros PLSR basados en las características espectrales. En general, los modelos a partir de muestras enteras ajustaron el contenido de ergosterol con valores de R^2 más altos que los obtenidos a partir de muestras molidas. A su vez, los valores de los parámetros de regresión tales como el Slope, RMSEP o R^2 fueron mejores cuando se aplicó la 1^{ra}D derivada a los datos. El número óptimo de PC utilizado para el mejor ajuste de la regresión fue 21.

Dowell et al. (1999) evaluaron mediante espectroscopía HSI-NIR muestras de granos de trigo enteros dañados por FHB y mediante análisis PLSR pudieron identificar granos con >50

mg/kg de ergosterol con un R^2 de 0,64 y un RMSEP de 108 mg/kg. Los valores de RMSEP para grano entero en este estudio fueron menores (1,17 mg/kg DON) y esto puede deberse a que el rango de concentraciones utilizado en el análisis fue menor. En los análisis con muestras de alimentos es de suma importancia utilizar muestras representativas y lo más cercanas a la realidad. La diferencia de este trabajo con Dowell et al. (1999), es que los investigadores seleccionaron su conjunto de muestras para PLSR de manera tal que estuvieran todas dañadas por FHB, por eso es que han obtenido un rango tan alto de contaminación.

Tabla 2. Parámetros de rendimiento del modelo de predicción PLSR de ergosterol en muestras de trigo a granel molidas y no molidas.

Muestra	Pretratamiento	Slope	RMSEP (mg/kg)	R^2	Número de PCs
Muestra entera	Espectro sin modificar	0,88	1,35	0,85	20
	1 ^{ra} Derivada	0,92	1,17	0,89	21
Muestra molida	Espectro sin modificar	0,62	2,15	0,57	10
	1 ^{ra} Derivada	0,84	1,57	0,77	23

RMSEP: error cuadrático medio de predicción. R^2 : coeficiente de determinación. PCs: componentes principales.

La Figura 8 representa el gráfico de valores de ergosterol predichos (espectroscopía NIR) versus medidos (HPLC) así como también los parámetros estadísticos de validación del modelo. Tal como se puede observar, los valores siguen un comportamiento de regresión lineal entre lo predicho y lo medido. Se han eliminado 14 “outliers”, correspondientes a un 9,3% del total de datos.

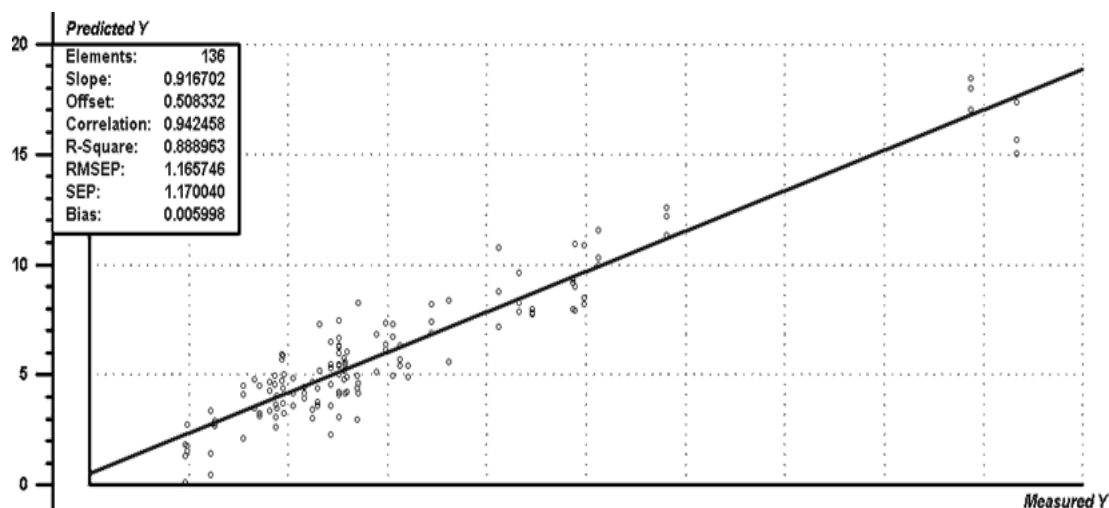


Figura 8. Predicho vs medido para el conjunto de validación en el modelo PLSR, en muestras enteras de granos de trigo aplicando 1^{ra} Derivada como pretratamiento espectral. Número óptimo de PC: 21. N: 150.

Parte 2

Cuantificación del contenido de DON en muestras de trigo mediante el análisis por HSI-NIR y posterior clasificación de las mismas

A. Distribución del contenido de DON en muestras de trigo

La Figura 9 muestra la distribución del contenido de DON en muestras de trigo a granel, teniendo en cuenta la frecuencia y la función de densidad de distribución (DDF). Las barras negras representan el total de muestras, las grises las del conjunto de calibración y las blancas las del conjunto de validación. Las 150 muestras utilizadas en esta experiencia, que estaban naturalmente contaminadas, presentaron un rango de concentración de micotoxina entre $< \text{LOD} - 3300 \mu\text{g}/\text{kg}$. Al comparar este rango con el obtenido por otros investigadores, se observó que es similar al obtenido en el estudio de Girolamo et al. (2009), el cual fue $<50 - 2700 \mu\text{g}/\text{kg}$ de DON en muestras de trigo molido. Sin embargo, los investigadores observaron que en este rango, las muestras (naturalmente contaminadas) presentaban una distribución no homogénea en los niveles de DON, al igual que en este trabajo, su estudio presentó una distribución de datos normal sesgada a la izquierda, con muchos valores pequeños de DON y menos grandes (un 94% de las muestras con niveles $<1.750 \mu\text{g}/\text{kg}$). Por esta razón, los estudios de de Girolamo et al. (2014) propusieron un análisis de DON con un rango mucho más amplio y con una distribución homogénea ($<50 - 16000 \mu\text{g}/\text{kg}$, y naturalmente contaminadas) pero esto conllevó a un aumento en los valores de desviación estándar.

Beyer et al. (2010), establecieron que la espectroscopía de reflectancia difusa (la cual fue utilizada en este trabajo) es capaz de distinguir los niveles de DON con alta sensibilidad, con rangos entre $0,21 \pm 0,03 \mu\text{g}$ a $2,39 \pm 0,12 \mu\text{g}$ por grano de trigo (En este estudio se obtuvieron rangos de $< 0,1 - 79,7 \mu\text{g}$ por cada grano – ver Parte 3.A) La detección de granos con niveles muy altos de DON y muy por encima de los considerados seguros requiere que el equipo abaje muy cerca de sus límites de sensibilidad, lo que dificulta la producción de estimaciones cuantitativas precisas. En este trabajo se consideró que esta distribución de las muestras es representativa debido a que cubre la mayoría de las concentraciones de DON encontradas en las muestras de vigilancia de rutina en las cadenas de suministro de trigo y era apropiado para el alcance del estudio para desarrollar modelos de calibración y clasificación debido a que es cercano a lo que sucede naturalmente. A su vez, el rango obtenido contempla valores tanto por encima como por debajo del límite legal ($1250 \mu\text{g}/\text{kg}$).

Por otra parte, las barras de frecuencia que representan los modelos de calibración y validación son muy similares en la mayoría de los rangos de concentración representados. Esto supone una uniformidad entre las muestras utilizadas en cada uno y es debido a que se han seleccionado las muestras de manera que fueran similares y con el mayor rango posible para cada conjunto.

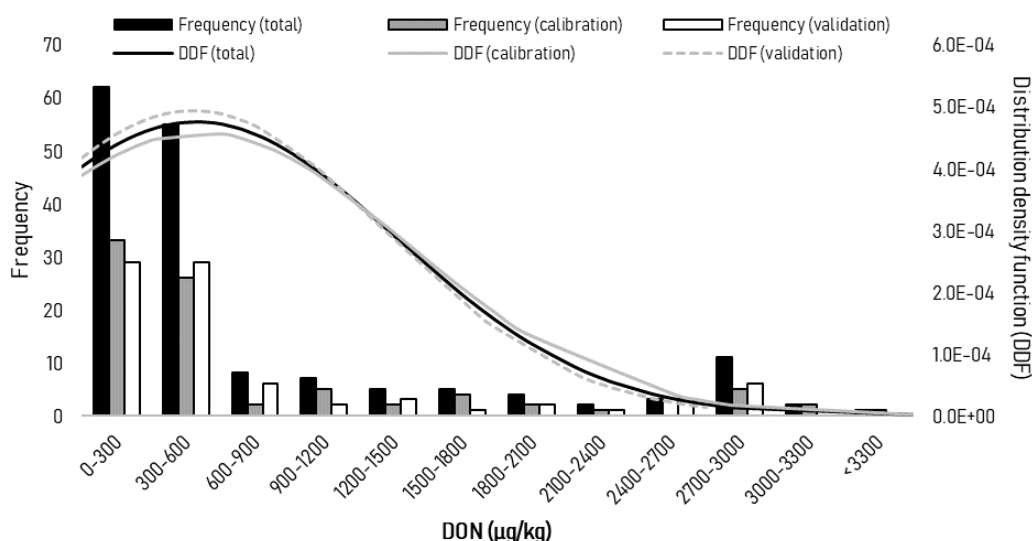


Figura 9. Distribución del contenido total de DON en muestras de trigo a granel, en el conjunto de datos completo utilizado en el presente experimento y por separado para los conjuntos de calibración y validación.

La Tabla 3 muestra los parámetros de regresión obtenidos a partir del análisis estadístico de las muestras de trigo, diferenciando aquellas que se utilizaron para la calibración del modelo PLSR como aquellas que se utilizaron para su validación. Se puede observar que estos parámetros son similares entre los dos conjuntos, aunque el desvío estándar es mayor en el conjunto de calibración. Este resultado es similar al obtenido en de Girolamo et al. (2009) quienes obtuvieron un desvío estándar de 470 µg/kg para un rango de concentración entre 60 – 1990 µg/kg en la validación y un desvío mayor de 590 µg/kg para un rango entre < LOD - 2600 µg/kg en la calibración. Este hecho puede deberse a que mientras mayor es el rango de concentraciones, mayor es el desvío estándar.

Tabla 3. Análisis estadístico de los parámetros de las muestras utilizadas para la construcción de modelos para la predicción del nivel de DON, que muestra conjuntos de calibración y validación de forma independiente.

		Número de muestras	Media	Rango	Sdesv	CV (%)
Contenido de DON (µg/kg)	Conjunto de Calibración	83	497,7	<50-3537	873,7	175,5
	Conjunto de Validación	82	467,1	<50-2628,5	807,8	172,9

DON: deoxinivalenol. Sdesv: desvío estándar. CV: coeficiente de variación.

B. Cuantificación de DON en muestras de trigo mediante el modelo PLSR

Se aplicaron modelos PLSR para predecir el contenido de DON en muestras de granos de trigo enteras y molidas. En la Tabla 4 se muestra un resumen de los parámetros PLSR obtenidos en cada caso. En general, todos los modelos ajustaron el contenido de DON con valores muy diferentes.

En comparación con de Girolamo et al. (2009) y Beyer et al. (2010) nuestro modelo de predicción para muestras de trigo no molido con un conjunto de validación externa presentó resultados similares para el ajuste del modelo. En este estudio, se obtuvo un R^2 de 0,61, similar al 0,63 obtenido en de Girolamo et al. (2009) pero mucho menor al obtenido por Beyer et al. (2010) (0,84). Vale aclarar, que en el último trabajo mencionado, los investigadores utilizaron espectroscopia NIR convencional y un rango de concentraciones de DON mucho más grande ($< 0,1 - 100,75 \text{ mg/kg}$). Las pendientes de regresión lineal cercanas (o iguales) a 1 indican que las estimaciones coinciden muy bien con las mediciones medias, ya que este parámetro relaciona el contenido de DON estimado con el medido. Sin embargo, para evaluar la eficacia del modelo además se deben tener en cuenta otros parámetros como el RMSEP. El RMSEP logrado en este modelo ($501,36 \text{ } \mu\text{g/kg}$) fue mayor que el obtenido por de Girolamo et al. (2009) ($348 \text{ } \mu\text{g/kg}$) pero mucho menor al obtenido por los mismos autores en otro estudio, el cual fue de $1,98 \text{ } \mu\text{g/kg}$ (de Girolamo et al., 2014).

En este estudio, el mejor R^2 se logró con el modelo de validación cruzada en muestras no molidas y con pretratamiento de datos, y presentó un valor de 0,73 con un RMSECV de $354,28 \text{ } \mu\text{g/kg}$. Estos valores son mejores que los obtenidos en el modelo de validación cruzada por Dvořáček et al. (2012), quienes presentaron un R^2 ligeramente mayor pero un RMSECV mucho más grande utilizando el mismo rango de concentraciones de DON entre las muestras (R^2 : 0,85, RMSECV $2500 \text{ } \mu\text{g/kg}$)

A su vez, la diferencia en los errores de predicción entre los estudios podría deberse a la gama diferente de concentraciones utilizadas en los estudios mencionados. Para los rangos de concentración más amplios, se espera un RMSEP más alto, ya que las desviaciones estándar en los extremos de la distribución son más altas que en el centro. Por esa razón, para comparar completamente los resultados obtenidos, se tendrían que haber obtenido rangos de contaminación similares.

Nuestro modelo de predicción en ambos tipos de muestras con conjunto de validación externa presentó peores resultados en comparación con el obtenido con el conjunto de validación cruzada, pero esto siempre es así debido a que se calibró con las mismas muestras que se validó. En la validación externa, al validar con muestras completamente distintas, el ajuste es menor porque dichas muestras nuevas que se agregan al modelo poseen características diferentes. Debido a esto, se podrán obtener resultados similares, pero nunca mayores. Por otra parte, se obtuvieron valores de R^2 mejores cuando se trabajó con la 1^{ra}D. Esto se debe a que, al aplicar un pretratamiento a los datos, se eliminan los efectos multiplicativos y aditivos, disminuyendo su variabilidad.

Por último, comparando los dos tipos de muestras, se observa que en el análisis con muestras no molidas se obtiene el mejor ajuste del modelo. Aplicando la 1^{ra}D a los datos y realizando cualquiera de las dos validaciones, se presentan valores de Slope y R^2 mas altos y RMSEP más bajos, para igual o menor número de PCs. En trabajos similares, de Girolamo et al. (2014) utilizó espectroscopía FT-NIR para la predicción de diferentes niveles de DON en muestras de trigo duro y blando molido. Los autores, al igual que el presente estudio, observaron que los modelos se ajustan peor en las muestras de trigo molidas con respecto a las muestras sin moler. El crecimiento de *Fusarium spp.* en granos de trigo, así como la producción de DON, es un proceso dinámico complejo, acompañado de cambios de atributos internos (componentes químicos, estructura física, etc.) y atributos externos (color, morfología, etc.). Zhao et al. (2020) observaron a través de microscopía electrónica de barrido, los cambios estructurales internos en muestras de trigo molidas contaminadas con DON e infectadas con FHB. Los autores pudieron demostrar que la molienda del grano produce gránulos de almidón en diferentes tamaños, y que el DON, que se une a este compuesto, se

distribuye de manera muy heterogénea en la muestra. A su vez, la molienda produce la ruptura de los constituyentes que forman las diferentes partes del grano por lo que el funcionamiento de la espectroscopía NIR junto con el análisis de imágenes hiperspectrales se ve afectado debido a que el grano no conserva su estructura tridimensional original.

Tabla 4. Parámetros de rendimiento de los modelos predictivos PLSR para DON en muestras de trigo molidas y no molidas.

		Validación	Slope	RMSEP ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	R ²	Número de PCs
Muestras no molidas	Espectro sin modificar	cruzada	0,67	252,70	0,62	18
	1 ^{ra} Derivada	cruzada	0,76	354,28	0,73	16
	Espectro sin modificar	externa	0,56	540,19	0,56	15
	1 ^{ra} Derivada	externa	0,59	501,36	0,61	13
Muestras molidas	Espectro sin modificar	cruzada	0,72	483,28	0,62	13
	1 ^{ra} Derivada	cruzada	0,72	403,29	0,69	16
	Espectro sin modificar	externa	0,55	578,68	0,49	7
	1 ^{ra} Derivada	externa	0,55	518,95	0,59	10

RMSEP: error cuadrático medio de predicción. R²: coeficiente de determinación. PCs: componentes principales.

A continuación, se presenta la gráfica del modelo que mejor ajustó el contenido de DON a los datos NIR. La Figura 10 representa el gráfico de valores de DON predichos versus medidos, así como también los parámetros estadísticos de validación del modelo. Tal como se puede observar, los valores siguen un ajuste lineal entre los ejes. Cabe destacar que sólo se han eliminado 7 "outliers", correspondientes a un 2,8% del total de datos. En cuanto al offset, parámetro que relaciona la distancia de cada punto al cero de la gráfica, presentó un valor bastante pequeño (13,03) teniendo en cuenta los valores máximos en los ejes. Sin embargo, aunque el valor del offset sea pequeño, no quiere decir que los valores en la ordenada al origen sean cercanos a cero, sino que, como se puede observar en la gráfica, se encuentran dispersas de igual manera tanto por encima como por debajo del eje Y (+1000 y -1000) lo que hace que la línea de predicho vs medido pase casi por el cero.

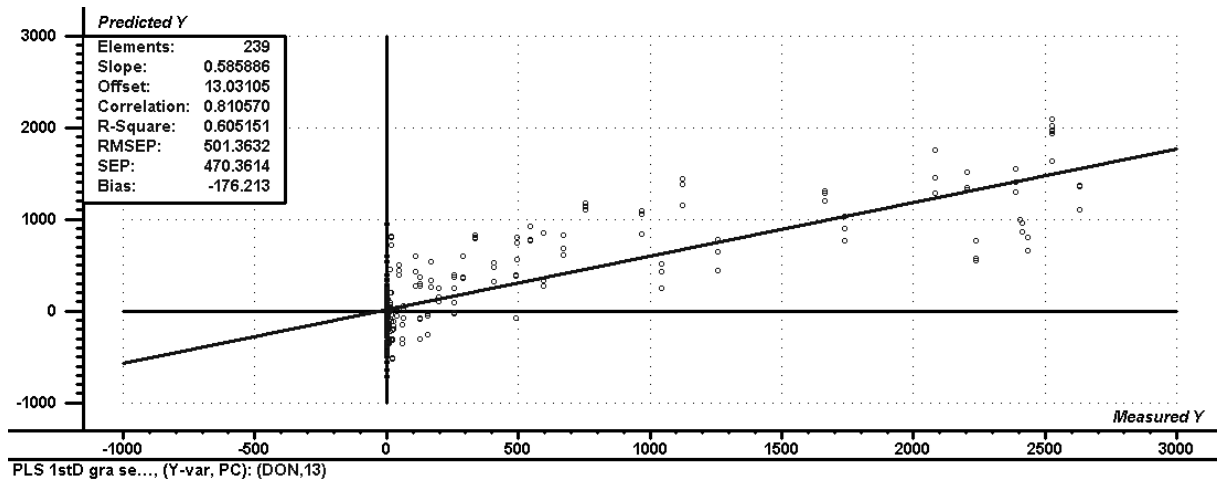


Figura 10. Predicho vs medido para el conjunto de validación en el modelo PLSR, en muestras enteras de granos de trigo aplicando 1^{ra} Derivada como pretratamiento espectral. Número óptimo de PC: 13. N: 246.

C. Clasificación de muestras de trigo según el contenido de DON por LDA

La Tabla 5 muestra los resultados de clasificación obtenidos en el modelo LDA con validación cruzada para los datos de espectro sin modificar y pretratado. Se utilizó un total de 495 imágenes provenientes de 165 muestras de granos de trigo molidas y no molidas.

En muestras no molidas, el porcentaje de muestras clasificadas correctamente fue del 84,65% (419/495) para el espectro sin modificar y del 95,66% (473/495) para la 1ªD. De las muestras clasificadas incorrectamente, sólo un 1,2% y un 0,8%, para espectro sin modificar y 1ªD respectivamente, eran falsos negativos, lo que significa que estaban contaminadas por encima del límite legal, pero se predijo que estaban por debajo del límite.

En muestras molidas, el porcentaje de muestras clasificadas correctamente fue mayor con respecto al caso anterior. La exactitud fue de 94,35% (469/495) para el espectro entero y 97,18% (481/495) para los datos tratados. El porcentaje de falsos positivos en la clasificación de muestra molida también fue menor comparado con los obtenidos en muestra sin moler, presentando un 1,2% para espectro entero y un 0,6% para la 1ªD. Teniendo en cuenta todo esto, el mejor rendimiento del modelo de clasificación con validación cruzada se obtuvo en muestras molidas y aplicando 1ªD a los datos. La exactitud obtenida, del 97,18%, fue un 2,8% - 12,5% más alto que en los otros casos.

Tabla 5. Exactitudes de Análisis Discriminante Lineal (LDA) para el modelo con validación cruzada en muestras molidas y no molidas.

Modelo LDA con validación cruzada					
		Predicho		Exactitud (%)	
		B	C		
Muestras no molidas	Espectro sin modificar	B	341	70	84,65
		C	6	78	
	1ª Derivada	B	393	18	95,66
		C	4	80	
Muestras molidas	Espectro sin modificar	B	389	22	94,35%
		C	6	78	
	1ª Derivada	B	400	11	97,18%
		C	3	81	

B = grupo de muestras por debajo del límite legal (<1250 µg/kg DON); C = grupo de muestras por encima del límite legal (>1250 µg/kg DON). Los valores en verde indican el número de muestras clasificadas correctamente, mientras que los valores en rojo indican las clasificadas erróneamente.

Para la clasificación de muestras no molidas con el método LDA con validación interna, se utilizaron un total de 495 imágenes. Las mismas se dividieron en dos conjuntos, 249 para el conjunto de calibración y 246 para el de validación. La Tabla 6 muestra los resultados de obtenidos en el modelo LDA con validación externa para los datos de espectro sin modificar y pretratado. Cuando se trataron los datos aplicando la 1ªD, se observaron los porcentajes de exactitud más altos. El porcentaje de muestras clasificadas correctamente fue del 97,99% (244/249) para el conjunto de calibración y del 82,93% (205/246) para el conjunto de validación. Esto se traduce como casi un 10% más que el porcentaje de exactitud obtenida en

la calibración con el espectro entero. Aunque para la validación del modelo, el aumento de exactitud no es tan significativo entre los dos casos. De las muestras clasificadas incorrectamente, el error falso negativo en la validación con espectro entero y con 1ªD fue de 3,25% y 2,03% respectivamente. Aunque en la calibración del modelo fue nulo en ambos casos.

Como en este estudio, de Girolamo et al. (2014) también clasificaron muestras de trigo por LDA, logrando un porcentaje de exactitud en la validación mayor (90%) pero también con falsos positivos y negativos mucho mayores (5%). Si bien la predicción en el presente estudio fue mejor, la comparación directa entre ambos estudios no puede realizarse debido a los diferentes conjuntos de muestras y valor de corte en la clasificación.

Femenias et al. (2020), utilizaron espectroscopía NIR con imágenes hiperespectrales para clasificar DON por LDA con validación externa en muestras de trigo naturalmente contaminadas, pero obtuvieron valores menores de exactitud (62,5%) y porcentaje de falsos negativos mayores (19%) en comparación con este estudio, esta precisión más pobre podría explicarse por el menor número de muestras que los autores utilizaron.

Tabla 6. Exactitudes del análisis discriminante lineal (LDA) para conjuntos de calibración y validación en muestras no molidas.

	Conjunto de calibración				Conjunto de validación			
	Predecido		Exactitud (%)	Predecido		Exactitud (%)		
	B	C		B	C			
Espectro sin modificar	B	170	34	86,35	B	172	35	82,52
	C	0	45		C	8	31	
1ª Derivada	B	199	5	97,99	B	170	37	82,93
	C	0	45		C	5	34	

B = grupo de muestras por debajo del límite legal (<1250 µg/kg DON); C = grupo de muestras por encima del límite legal (>1250 µg/kg DON). Los valores en verde indican el número de muestras clasificadas correctamente, mientras que los valores en rojo indican las clasificadas erróneamente.

Para la clasificación de muestras molidas con el método LDA con validación externa, también se utilizaron un total de 495 imágenes las cuales se dividieron en dos conjuntos, 249 para el conjunto de calibración y 246 para el de validación. La Tabla 7 muestra los resultados de obtenidos en el modelo LDA con validación externa para los datos espectrales brutos y pretratados. Cuando se trataron los datos aplicando la 1ªD, se observaron los porcentajes de exactitud más altos. El porcentaje de muestras clasificadas correctamente fue del 99,2% (247/249) para el conjunto de calibración y del 85,37% (200/246) para el conjunto de validación. De las muestras clasificadas incorrectamente, el error falso negativo en la calibración con espectro entero y con 1ªD fue de 1,2% y 0,4% respectivamente. En cambio, en la validación, este error fue mayor siendo 4,9 con espectros brutos y 2,8% con 1ªD.

Pocos estudios han clasificado muestras de trigo molidas según LDA y con criterios de selección similares a este estudio, por lo que la comparación directa de resultados en este caso no es posible. Zhao et al. (2020) han evaluado la tecnología FT-NIR con la adquisición de

imágenes para clasificar DON utilizando como parámetro *correct classification rate* (CCR) logrando 83,08 %CCR.

Tabla 7. Exactitudes de análisis discriminante lineal (LDA) para conjuntos de calibración y validación (umbral 1250 µg/kg) en muestras molidas.

	Conjunto de calibración			Conjunto de validación				
	Predecido		Exactitud (%)	Predecido		Exactitud (%)		
Espectro sin modificar	B	C		B	C			
	B	191	13	93,58	B	176	31	82.53
	C	3	42		C	12	27	
1 ^{ra} Derivada	B	C		B	C			
	B	203	1	99,2	B	188	19	85.37
	C	1	44		C	7	22	

B = grupo de muestras por debajo del límite legal (<1250 µg/kg DON); C = grupo de muestras por encima del límite legal (>1250 µg/kg DON). Los valores en verde indican el número de muestras clasificadas correctamente, mientras que los valores en rojo indican las clasificadas erróneamente.

Aunque las clasificaciones logradas por los modelos LDA fueron bastante precisas, no es recomendable utilizarlas como técnica única. Esto es debido a que los falsos negativos suponen un riesgo mucho mayor que los falsos positivos, porque enviar un lote para un análisis adicional sólo tendrá impactos económicos, pero aprobar un lote contaminado puede tener repercusiones en la salud. Entonces, es factible que estos modelos sean utilizados como parte de un sistema de cribado rápido de lotes de cereales de acuerdo con la contaminación de DON, con la función de seleccionar lotes que requieran un examen químico analítico posterior más detenido.

Parte 3

Cuantificación del contenido de DON en granos individuales de trigo mediante el análisis por HSI-NIR y posterior clasificación de las mismas

A. Distribución del contenido de DON en granos individuales de trigo

La Figura 11 muestra la distribución y las frecuencias del contenido de DON y de los pesos en granos de trigo individuales. Los 50 granos utilizadas en este ensayo, que estaban naturalmente contaminados, presentaron un rango de concentración de DON entre <LOD-80 mg/kg. Este rango obtenido para muestras de grano individual fue mucho mayor que el obtenido a partir de muestras de trigo a granel (<LOD - 3,3 mg/kg DON), el cual surge de una media de todos los granos que la conforman. Como se puede observar en la figura, los valores de DON obtenidos presentan una distribución normal con desplazamiento a la izquierda, en donde un 70% de granos contenían entre <LOD - 10 mg/kg DON. En cuanto al peso del grano, la gráfica de pesos vs frecuencia vs distribución, muestra una distribución normal centrada con un rango entre 10-55 mg. Los pesos de cada una de las muestras se distribuyen con mayor frecuencia entre los valores medios del rango.

La Tabla 8 muestra los estadísticos de descripción obtenidos a partir del análisis de las muestras de trigo. Tanto para el peso del grano como para el contenido de DON, el desvío estándar, la media, e incluso el Coeficiente de Variación presentaron valores muy similares entre los dos conjuntos.

Tabla 8. Análisis estadístico de los parámetros utilizados en el presente estudio.

	Numero de muestras		Media	Rango	SDev	CV (%)
Variable	50	Contenido de DON (mg/kg)	12,9	< 0,1 – 79,7	21,3	163,2
		Peso del grano (mg)	33,0	11,3 – 53,4	11,4	34,6

SDev = desviación estándar. CV = coeficiente de variación.

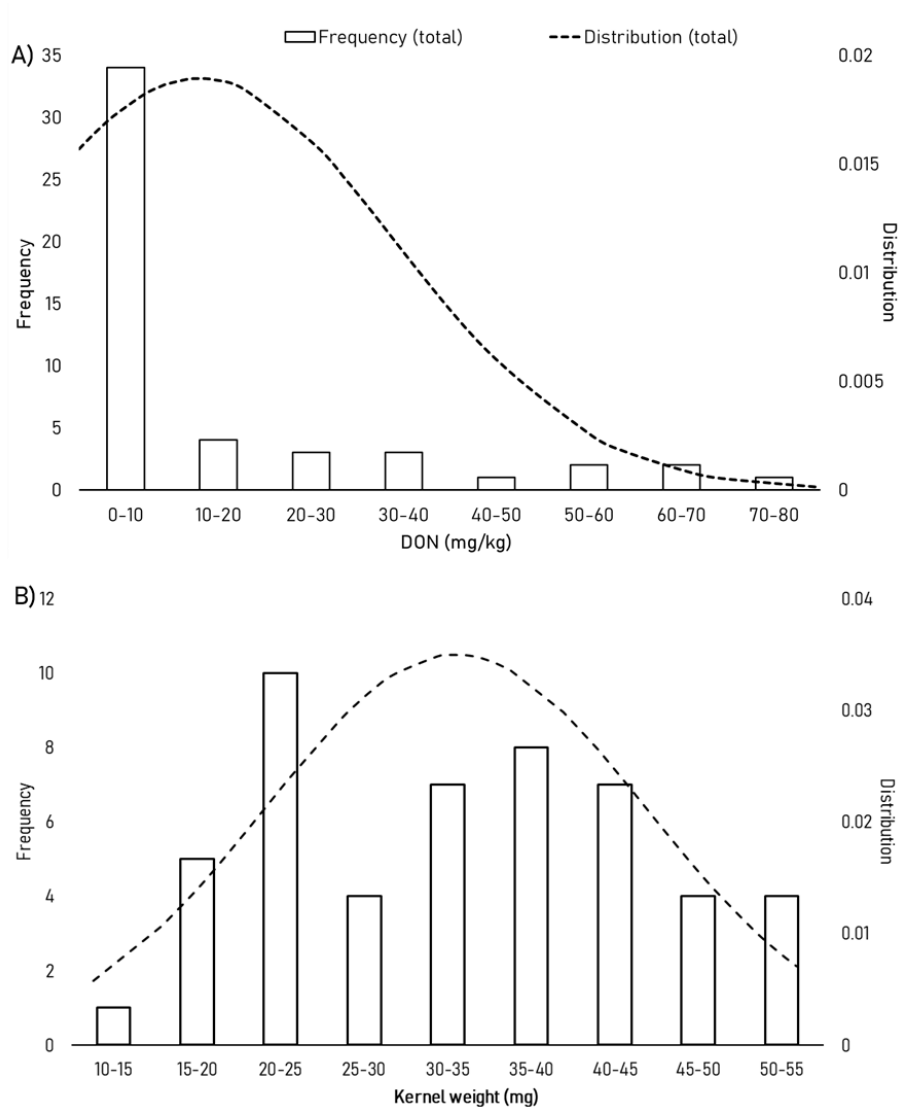


Figura 11. Arriba: Distribución del contenido total de DON en muestras de trigo individuales. Abajo: Distribución del peso del grano de trigo.

B. Cuantificación de DON en granos individuales de trigo mediante PLSR

Se aplicaron modelos PLSR para predecir la concentración de DON exacta en cada grano de trigo aplicando diferentes pretratamientos de datos, tales como SNV, 1^{da} o la combinación de ambos. En la Tabla 9 se muestra un resumen de los parámetros PLSR obtenidos en cada caso. En general, todos los modelos ajustaron el contenido de DON con valores de R^2 próximos a 1, siendo el valor más cercano 0,88 en el caso del modelo PLSR con 1^{da} Derivada y con el espectro sin los extremos. Por otra parte, cuando se utilizó el rango espectral sin extremos (es decir, entre 1000-1650 nm) se obtuvo un mejor rendimiento en todos los casos. Los valores obtenidos de RMSECV y RPD variaron de 5 a 9,1 mg/kg y de 2,3 a 4,2. El modelo de calibración con un valor de RPD superior a 3,0 es suficiente para el control de calidad, mientras que entre 1,5 y 2,0 es aplicable para fines de detección. El mejor modelo obtenido fue cuando se aplicó SNV como pretratamiento y se utilizó el rango espectral acotado.

Tabla 9. Parámetros de rendimiento de regresión PLS para diferentes pretratamientos espectrales.

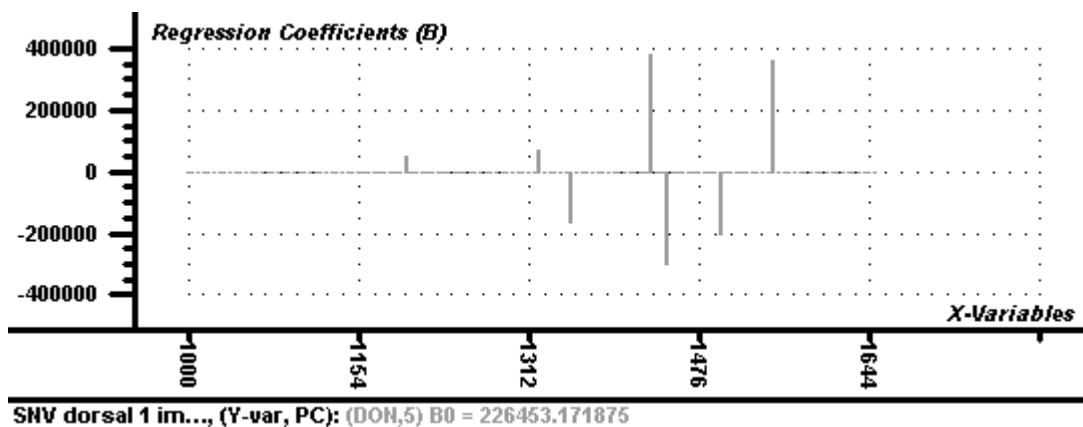
Pre-tratamiento	Rango espectral (nm)	Slope	RMSECV	R ²	SEP	PC	Outliers	RPD
Espectro sin modificar	895,4 – 1731	0,89	7,2	0,85	7,2	16	7	2,9
	1000 – 1650	0,87	6,5	0,86	6,5	11	10	3,2
SNV	895,4 – 1731	0,86	5,2	0,85	5,3	6	12	4,0
	1000 – 1650	0,87	5,0	0,87	5,0	10	15	4,2
1 ^{ra} Derivada	895,4 – 1731	0,89	6,1	0,87	6,2	16	13	3,4
	1000 – 1650	0,89	6,1	0,88	6,1	13	13	3,4
1 ^{ra} D + SNV	895,4 – 1731	0,83	9,1	0,76	9,2	16	6	2,3
	1000 – 1650	0,86	5,7	0,83	5,7	8	15	3,7

SNV: variable normal estándar. RMSECV: error cuadrático medio de calibración. R²: coeficiente de determinación. SEP: error estándar de predicción. PCs: componentes principales. RPD: ratio of performance to deviation.

C. Selección de longitudes óptimas para la detección de DON mediante NIR

Para el análisis de la curva de reflectancia hiperespectral, como las tendencias generales de todos los modelos fueron generalmente similares, a modo de ejemplo, la Figura 12 muestra el comportamiento de los espectros en cuanto a los coeficientes de regresión para el mejor modelo PLSR obtenido anteriormente. La gráfica indica que el comportamiento general de la función de los coeficientes de regresión puede aproximarse por "n" longitudes de onda representadas por picos/bandas. Para este modelo, se seleccionaron 7 bandas, las cuales aparecieron más prominentes que otras (1198, 1322, 1353, 1428, 1445, 1497 y 1549 nm).

Figura 12. Gráfica coeficientes de regresión vs. Longitudes de onda en el espectro NIR en muestras individuales de trigo con SNV como pretratamiento espectral.



Los estudios de Dowell et al. (1999) observaron patrones de absorción determinados por distintos grupos funcionales. Las bandas comprendidas entre la región espectral NIR de 750-950 nm (absorción de O – H) y 1200-1400 nm (absorción de C – H), podrían relacionarse con los efectos de la FHB sobre las proteínas y el almidón y, en consecuencia, la detección indirecta de DON. Además, un estudio de Delwiche & Gaines, (2005) para la clasificación de una sola longitud de onda para el trigo dañado por *Fusarium* indicó que la mejor precisión se obtuvo entre 1450 y 1460 nm. Estos resultados están de acuerdo con algunas de nuestras bandas seleccionadas (1428, 1445, 1497 nm). Sin embargo, las longitudes de onda registradas para estimar DON en altas concentraciones oscilaron entre 1408, 1904 y 1919 nm en Peiris et al. (2009) y entre 570 y 1100 nm en Pettersson & Åberg, (2003). Por otra parte, Barbedo et al. (2017) observaron que su algoritmo se basaba en la longitud de onda 1411, banda que se encuentra en la región espectral de absorción de agua. Lo que podría estar indicando que el algoritmo se basa en las diferencias de humedad entre los granos. Esto puede ser un problema si se utilizan conjuntos de muestras que poseen diferentes condiciones de humedad.

Las infecciones fúngicas de los granos provocan múltiples cambios en la composición del grano (Beyer y Aumann, 2008), por lo que es de esperar la diferencia de resultados entre los autores. En resumen, numerosos autores trataron de identificar las longitudes de onda más relevantes para poder construir un modelo multispectral, asequible para ser implementado en la industria alimentaria, sin embargo, las longitudes de onda identificadas no fueron exactamente las mismas en los diferentes estudios y no son comparables directamente porque se obtuvieron bajo diferentes parámetros.

La Tabla 10 presenta los parámetros de regresión obtenidos a partir de modelos PLSR con diferentes pretratamientos de datos. Algunos de estos modelos basados sólo en longitudes óptimas presentaron mejores rendimientos comparados con los modelos PLSR de espectro NIR-VIS entero. El mejor rendimiento se obtuvo en el modelo PLSR con SNV basado en 7 longitudes de onda, logrando un R^2 de 0,88 y un RMSECV de 4,8. Se observó un rendimiento similar en el modelo SNV con "todas las bandas" ($R^2 = 0,87$, RMSECV= 5). Esto indica que estas 7 longitudes de ondas contenían tanta información como las 167 bandas en el espectro completo entre 1000 y 1650 nm. Por lo tanto, un modelo basado sólo en estas longitudes de ondas podría usarse para la clasificación de granos en cuanto a su contenido de DON.

Tabla 10. Parámetros de rendimiento de PLSR a partir de longitudes de onda óptimas seleccionadas.

Modelo	Longitudes de onda óptimas (nm)	Slope	RMSECV	R^2	SEP	PC	RPD
SNV	1198, 1322, 1353, 1428, 1445, 1497, 1549	0,88	4,8	0,88	4,8	6	4,4
1 ^{ra} Derivada	1112, 1205, 1345, 1401, 1452, 1499, 1525, 1541	0,79	8,1	0,78	8,1	6	2,6
1 ^{ra} D + SNV	1325, 1396, 1406, 1421	0,81	6,1	0,81	6,1	3	3,4

SNV: variable normal estándar. RMSECV: error cuadrático medio de calibración. R^2 : coeficiente de determinación. SEP: error estándar de predicción. PCs: componentes principales. RPD: ratio of performance to deviation.

D. Clasificación de muestras de trigo según el contenido de DON por LDA

La Tabla 11 muestra el resultado del modelo de clasificación LDA aplicado en muestras de granos de trigo individuales según su sintomatología. Se obtuvo un 100% de exactitud en la clasificación cuando se aplicaba pretratamiento a los datos tales como 1^ªD o 1^ªD junto con SNV. Sin embargo, el porcentaje en los demás casos también fue alto. Es de importancia mencionar que el procedimiento de obtención de espectros utilizado en este trabajo se diseñó cuidadosamente para maximizar el contraste entre cada grano y la bandeja, con el objetivo de disminuir el error. Esto explica el número tan bajo de falsos negativos en ambos modelos LDA (según sintomatología y según DON), los cuales pueden provenir de regiones sombreadas en los granos, que en algunos casos se mezclaban con las sombras proyectadas por los demás granos en la bandeja. Sin embargo, Barbedo et al. (2017) indicaron que en las pruebas en las que se sustituyó la segmentación espectral automática por la manual el impacto de los errores es insignificante.

Tabla 11. Precisión de clasificación para diferentes modelos LDA de granos individuales según su sintomatología.

	Espectro sin modificar			SNV			1 ^ª Derivada			1 ^ª D + SNV		
	A	M	S	A	M	S	A	M	S	A	M	S
A	56,2	4,7	0,3	62,5	4,3	0	69	0	0	69	0	0
M	9,3	17,8	10	3,5	20,5	5,5	0	27	0	0	27	0
S	3,5	4,5	43,7	3	2,2	48,5	0	0	54	0	0	54
Exactitud (%)	78,4			87,7			100			100		

A= asintomático; M= levemente sintomático; S= sintomático. Los granos correctamente clasificados corresponden a los números de celdas grises.

Muchos trabajos intentaron clasificar granos de trigo dañados por *Fusarium spp.* (FDK) con de HSI utilizando la inspección visual como método de referencia a partir de características de color y textura (arrugado, decoloración rosada, tiza blanca, pérdida de peso, etc.). Delwiche & Kim (2000) utilizaron un rango espectral de 430-860 nm, obteniendo precisiones de clasificación de 86,8 y 98,4%. Un años más tarde, Delwiche et al. (2010) combinaron dos pares de longitudes de onda, 1199, 1474 nm y 1315, 1474 nm, obteniendo una precisión de clasificación LDA del 82,5% en granos de alto contraste visual. Shahin & Symons, (2011) también realizaron un LDA, utilizando un rango de longitud de onda de 400-1000 nm y la precisión de clasificación fue del 92,25% para el conjunto de validación. El último estudio reportado fue el de Ropelewska & Zapotoczny (2018) que usaron tres longitudes de onda características (550, 710 y 850 nm) obteniendo una precisión del 85-98% de clasificación obtenida en función de los parámetros de textura de los lados ventral y dorsal. En síntesis, todos los modelos presentaron precisiones elevadas y similares a las obtenidas por este trabajo, a pesar de utilizar diferentes rangos espectrales y longitudes de onda específicas.

Bock et al. (2010) realizaron un estudio sobre la eficacia de la detección y clasificación de enfermedades visuales llegando a la misma conclusión que Wegulo & Dowell, (2008). Los autores mencionaron que el sistema de clasificación probado, además de correlacionarse bien

con las mediciones visuales, tiene la ventaja de ser más rápido y más consistente que los operadores humanos. Por lo tanto, los métodos capaces de realizar esta detección automáticamente tienen una gran demanda. A pesar de esto, vale aclarar que todos los granos se evalúan manualmente antes del procesamiento HSI. Esto, que es la referencia para todos los resultados presentados en esta parte, está sujeta a errores que surgen de factores como fatiga, distracciones externas e ilusiones ópticas, y las inconsistencias intra e interevaluador (Nutter et al., 1993). Por tanto, esta referencia siempre introducirá algo de error porque es inevitable, hecho que debe tenerse en cuenta al analizar los resultados.

Durante el análisis de los resultados obtenidos en este trabajo se pudo inferir que, en ciertos casos, a mayor concentración de micotoxina, mayores síntomas. Pero también, pueden existir granos que están contaminados con altos niveles de DON y no presentar sintomatología o que la misma no pueda ser detectada visualmente. Incluso, existir granos que no poseen DON (o poseen cantidades no significativas) pero expresan características visuales ocasionadas por otro factor. Por lo tanto, se considera que la precisión de la evaluación visual del daño por *Fusarium spp* es limitada, y es recomendable integrarlo con el análisis de DON para obtener resultados más sólidos (Barbedo et al., 2015).

La Tabla 12 muestra el resultado del modelo de clasificación LDA aplicado a los granos de trigo individuales según el contenido de DON. El mayor porcentaje de exactitud (98,9%) se obtuvo aplicando 1^{ra}D a los datos, hecho que se correlaciona con el modelo anterior de clasificación según sintomatología. Barbedo et al. (2017) pudieron clasificar muestras de trigo con una precisión menor del 81% con dos clases separadas por el límite legal de la UE (1,25 mg/kg) al igual que en este trabajo. La diferencia es que utilizaron como método de referencia un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima competitivo directo (DC-ELISA) y cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS).

Tabla 12. Precisión de clasificación para los modelos LDA de granos de trigo individuales de acuerdo con los niveles de DON.

	Pretratamientos							
	Espectro sin modificar		SNV		1 ^{ra} Derivada		1 ^{ra} D + SNV	
	B	C	B	C	B	C	B	C
B	65,5	24,3	72,8	12,7	74,5	1,2	73,7	1
C	9,5	50,7	2,2	62,3	0,5	73,8	1,3	74
Exactitud (%)	77,4		90,1		98,9		98,4	

B = grupo de muestras por debajo del límite legal (<1250 µg/kg DON); C = grupo de muestras por encima del límite legal (>1250 µg/kg DON). Los valores en verde indican el número de muestras clasificadas correctamente, mientras que los valores en rojo indican las clasificadas erróneamente.

El trasfondo de la clasificación óptica de cereales comenzó con la espectroscopía Single Kernel-NIR (SK-NIR), en la que se demostraron las aptitudes de clasificación automática. Esta automatización se logró en numerosos casos, proporcionando la división de granos de trigo según la contaminación por DON a un límite de 60 mg/kg en el 96% de los casos (Peiris et al., 2010). Sin embargo este límite está muy lejos de los límites encontrados en muestras contaminadas naturalmente y muy por encima del límite legal. Si se comparan los análisis de clasificación de muestras de grano individual con los realizados en muestras de trigo a granel, podemos inferir que, si bien se puede llegar a una clasificación de grano único, la

caracterización espacial de la muestra (base de HSI) no es posible. En el ingreso de cereales a la industria, los lotes o sus muestras se procesan y analizan en conjunto, por lo que no se puede lograr la selección del espectro de un área específica ni mucho menos, las regiones de interés (ROI) en cada grano del lote. Por tanto, se necesitan sistemas de clasificación masivos y rápidos para lograr discriminaciones de toneladas de grano en pocas horas (Fox & Manley, 2014).

Conclusiones

La capacidad de HSI-NIR de analizar espacialmente los granos y, a través de ello, de detectar DON incluso en granos asintomáticos sin la necesidad de un análisis visual subjetivo, y de clasificar granos contaminados en muestras a granel, ha llevado a que esta técnica sea una alternativa prometedora para su incorporación en la industria agroalimentaria. La implementación de HSI-NIR puede tener un impacto en la gestión de la seguridad alimentaria de los cereales. A su vez, la recepción industrial de grano es un paso crítico en el que las aplicaciones de HSI-NIR serían interesantes para la sustitución de los métodos de análisis clásicos.

Los resultados obtenidos a lo largo de este trabajo se consideran modelos preliminares para futuros sistemas de clasificación aplicados a la industria de trigo, debido a que se ha logrado la clasificación de granos en niveles específicos de DON, con un criterio de separación igual al límite legal establecido, para así poder ser utilizado en aplicaciones reales. Además, los resultados del análisis de cuantificación de DON mostraron buenos resultados, errores de predicción bajos y un límite de detección reducido. Los parámetros evaluados han demostrado resultados positivos para muestras naturalmente contaminadas, y los modelos desarrollados son un punto de partida para futuras mejoras en la gestión de seguridad alimentaria asociado al DON.

Sin embargo, se necesitan más estudios para optimizar la técnica HSI-NIR, teniendo en cuenta la selección de longitudes óptimas de detección, un método de referencia adecuado, la calibración de equipos, el tipo y número de muestras que se requiera analizar, así como también la heterogeneidad que presentan. Todo esto permitirá futuras mejoras en los modelos, a fin de obtener resultados aún más confiables y precisos. A pesar de todo esto, los resultados de este trabajo son alentadores, por lo que se propone la combinación de herramientas de HSI-NIR para la inspección masiva, de rutina y a tiempo real, de muestras de trigo, abriendo así un nuevo campo en la detección de hongos toxigénicos y sus metabolitos con el fin de reducir los riesgos nocivos para la salud.

Referencias

- Abramson, D., Gan, Z., Clear, R. M., Gilbert, J., & Marquardt, R. R. (1998). Relationships among deoxynivalenol, ergosterol and Fusarium exoantigens in Canadian hard and soft wheat. *International Journal of Food Microbiology*, 45(3), 217–224. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(98\)00164-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00164-0)
- Adams, M. L., Lombi, E., Zhao, F. J., & McGrath, S. P. (2002). Evidence of low selenium concentrations in UK bread-making wheat grain. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(10), 1160–1165. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1167>
- Alisaac, E., Behmann, J., Kuska, M. T., Dehne, H. W., & Mahlein, A. K. (2018). Hyperspectral quantification of wheat resistance to Fusarium head blight: comparison of two Fusarium species. *European Journal of Plant Pathology*, 152(4), 869–884. <https://doi.org/10.1007/s10658-018-1505-9>
- Aoki, T., O'donnell, K., & Geiser, D. M. (2014). Systematics of key phytopathogenic Fusarium species: current status and future challenges. *Journal of General Plant Pathology*, 80, 189–201. <https://doi.org/10.1007/s10327-014-0509-3>
- Barbedo, A. J. G., Tibola, S., Imaculada, M., & Lima, P. (2017). *Deoxynivalenol screening in wheat kernels using hyperspectral imaging*. <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2016.12.004>
- Barbedo, J. G. A., Tibola, C. S., & Fernandes, J. M. C. (2015). Detecting Fusarium head blight in wheat kernels using hyperspectral imaging. *Biosystems Engineering*, 131, 65–76. <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2015.01.003>
- Barnes, R. J., Dhanoa, M. S., & Lister, S. J. (1989). Standard normal variate transformation and de-trending of near-infrared diffuse reflectance spectra. *Applied Spectroscopy*, 43(5), 772–777. <https://doi.org/10.1366/0003702894202201>
- Bellon-Maurel, V., Fernandez-Ahumada, E., Palagos, B., Roger, J. M., & McBratney, A. (2010). Critical review of chemometric indicators commonly used for assessing the quality of the prediction of soil attributes by NIR spectroscopy. In *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* (Vol. 29, Issue 9, pp. 1073–1081). <https://doi.org/10.1016/j.trac.2010.05.006>
- Bennett, J. W. (1987). Mycotoxins, mycotoxicoses, mycotoxicology and Mycopathologia. In *Mycopathologia* (Vol. 100, Issue 1, pp. 3–5). Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publishers. <https://doi.org/10.1007/BF00769561>
- Beyer, M., Pogoda, F., Ronellenfisch, F. K., Hoffmann, L., & Udelhoven, T. (2010). Estimating deoxynivalenol contents of wheat samples containing different levels of Fusarium-damaged kernels by diffuse reflectance spectrometry and partial least square regression. *International Journal of Food Microbiology*, 142(3), 370–374. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.07.016>
- Bock, C. H., Poole, G. H., Parker, P. E., & Gottwald, T. R. (2010a). Plant disease severity estimated visually, by digital photography and image analysis, and by hyperspectral imaging. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 29(2), 59–107. <https://doi.org/10.1080/07352681003617285>

- Bock, C. H., Poole, G. H., Parker, P. E., & Gottwald, T. R. (2010b). Plant disease severity estimated visually, by digital photography and image analysis, and by hyperspectral imaging. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 29(2), 59–107. <https://doi.org/10.1080/07352681003617285>
- Boldrini, B., Kessler, W., Rebnera, K., & Kessler, R. W. (2012). Hyperspectral imaging: A review of best practice, performance and pitfalls for in-line and on-line applications. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 20(5), 483–508. <https://doi.org/10.1255/1003>
- Brown, N. A., Urban, M., van de Meene, A. M. L., & Hammond-Kosack, K. E. (2010). The infection biology of *Fusarium graminearum*: Defining the pathways of spikelet to spikelet colonisation in wheat ears. *Fungal Biology*, 114(7), 555–571. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2010.04.006>
- Bullerman, L. B., & Bianchini, A. (2007). Stability of mycotoxins during food processing. *International Journal of Food Microbiology*, 119(1–2), 140–146. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.035>
- CAA. (2019). *CAPITULO III CONDICIONES GENERALES DE LOS PRODUCTOS ALIMENTICIOS. ARTICULO 156 QUATER: LIMITES PARA MICOTOXINAS.*
- Cano-Sancho, G., Valle-Algarra, F. M., Jiménez, M., Burdaspal, P., Legarda, T. M., Ramos, A. J., Sanchis, V., & Marín, S. (2011). Presence of trichothecenes and co-occurrence in cereal-based food from Catalonia (Spain). *Food Control*, 22(3–4), 490–495. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.09.033>
- Castells, M., Marín, S., Sanchis, V., & Ramos, A. J. (2005). Fate of mycotoxins in cereals during extrusion cooking: A review. In *Food Additives and Contaminants* (Vol. 22, Issue 2, pp. 150–157). <https://doi.org/10.1080/02652030500037969>
- Castells, M., Marín, S., Sanchis, V., & Ramos, A. J. (2008). Distribution of fumonisins and aflatoxins in corn fractions during industrial cornflake processing. *International Journal of Food Microbiology*, 123(1–2), 81–87. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.12.001>
- CE. (2006a). *REGLAMENTO (CE) No. 583/2006. Recomendaciones sobre la prevención y la reducción de las toxinas de Fusarium en los cereales y los productos a base de cereales.* <http://ec.europa.eu/>
- CE. (2006b). *REGLAMENTO (CE) No 401/2006. Métodos de muestreo y de análisis para el control oficial del contenido de micotoxinas en los productos alimenticios.* http://europa.eu.int/comm/food/food/chemicalsafety/contaminants/aflatoxin_guidance_es.pdf.
- CE. (2006c). *Contenido Máximo de determinados contaminantes en productos alimenticios. REGLAMENTO (CE) No 1881/2006 DE LA COMISIÓN EUROPEA.* <http://data.europa.eu/eli/reg/2006/1881/oj>
- Cen, H., & He, Y. (2007a). Theory and application of near infrared reflectance spectroscopy in determination of food quality. *Trends in Food Science and Technology*, 18(2), 72–83. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2006.09.003>
- Cen, H., & He, Y. (2007b). Theory and application of near infrared reflectance spectroscopy in determination of food quality. *Trends in Food Science and Technology*, 18(2), 72–83. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2006.09.003>
- Cen, H., Lu, R., Zhu, Q., & Mendoza, F. (2016). Nondestructive detection of chilling

- injury in cucumber fruit using hyperspectral imaging with feature selection and supervised classification. *Postharvest Biology and Technology*, 111, 352–361. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.09.027>
- Chavez, P.-F., De Bleye, C., Sacré, P.-Y., Rozet, E., Hubert, P., & Ziemons, E. (2013). *Validation methodologies of near infrared spectroscopy methods in pharmaceutical applications European Pharmaceutical Review IN-DEPTH FOCUS* (Vol. 18, Issue 1). www.europeanpharmaceuticalreview.com
- Chelladurai, V., Jayas, D. S., & White, N. D. G. (2010). Thermal imaging for detecting fungal infection in stored wheat. *Journal of Stored Products Research*, 46(3), 174–179. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2010.04.002>
- Cleveland IV, T. E., Hussey, D. S., Chen, Z. Y., Jacobson, D. L., Brown, R. L., Carter-Wientjes, C., Cleveland, T. E., & Arif, M. (2008). The use of neutron tomography for the structural analysis of corn kernels. *Journal of Cereal Science*, 48(2), 517–525. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2007.12.003>
- Codex Alimentarius. (2003). *CÓDIGO DE PRÁCTICAS PARA PREVENIR Y REDUCIR LA CONTAMINACIÓN DE LOS CEREALES. CAC/RCP 51-2003*.
- Codex Alimentarius. (2012). *Código de prácticas para prevenir y reducir la contaminación de los cereales por micotoxinas*, (Vol. 9, Issue c).
- Dale, L. M., Thewis, A., Rotar, I., Fernandez Pierna, J. A., Boudry, C., Vidican, R. M., & Baeten, V. (2012). Chemometric Tools for NIRS and NIR Hyperspectral Imaging. *Bulletin UASVM Agriculture*, 69(1).
- de Girolamo, A., Cervellieri, S., Visconti, A., & Pascale, M. (2014). Rapid analysis of deoxynivalenol in durum wheat by FT-NIR spectroscopy. *Toxins*, 6(11), 3129–3143. <https://doi.org/10.3390/toxins6113129>
- de Girolamo, A., Lippolis, V., Nordkvist, E., & Visconti, A. (2009). Rapid and non-invasive analysis of deoxynivalenol in durum and common wheat by Fourier-Transform Near Infrared (FT-NIR) spectroscopy. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 26(6), 907–917. <https://doi.org/10.1080/02652030902788946>
- Delwiche, R., & Kim, M. S. (2000). Hyperspectral imaging for detection of scab in wheat. In J. A. DeShazer & G. E. Meyer (Eds.), *Biological Quality and Precision Agriculture II* (Vol. 4203, pp. 13–20). SPIE. <https://doi.org/10.1117/12.411752>
- Delwiche, S. R., & Gaines, C. S. (2005). Wavelength selection for monochromatic and bichromatic sorting of Fusarium Damaged Wheat. *Applied Engineering in Agriculture*, 21(4), 681–688. <https://doi.org/10.13031/2013.18557>
- Delwiche, S. R., Kim, M. S., & Dong, Y. (2010). Damage and quality assessment in wheat by NIR hyperspectral imaging. In M. S. Kim, S.-I. Tu, & K. Chao (Eds.), *Sensing for Agriculture and Food Quality and Safety II* (Vol. 7676, p. 767607). SPIE. <https://doi.org/10.1117/12.851150>
- Delwiche, S. R., Rodriguez, I. T., Rausch, S. R., & Graybosch, R. A. (2019). Estimating percentages of fusarium-damaged kernels in hard wheat by near-infrared hyperspectral imaging. *Journal of Cereal Science*, 87(September 2018), 18–24. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2019.02.008>
- Douglas, L. M., & Konopka, J. B. (2014, September 8). Fungal membrane organization: The eisosome concept. *Annual Review of Microbiology*, 68(1), 377–393.

<https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091313-103507>

- Dowell, F. E., Ram, M. S., & Seitz, L. M. (1999). Predicting scab, vomitoxin, and ergosterol in single wheat kernels using near-infrared spectroscopy. *Cereal Chemistry*, 76(4), 573–576. <https://doi.org/10.1094/CCHEM.1999.76.4.573>
- Dvořáček, V., Prohasková, A., Chrpová, J., & Štočková, L. (2012). *Dvoracek_2012_NIR_spectroscopy_DON_estimation_wheat*. 2012(Mesterházy 1995), 196–203.
- Dweba, C. C., Figlan, S., Shimelis, H. A., Motaung, T. E., Sydenham, S., Mwadzingeni, L., & Tsilo, T. J. (2017). Fusarium head blight of wheat: Pathogenesis and control strategies. In *Crop Protection* (Vol. 91, pp. 114–122). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.10.002>
- Edite Bezerra da Rocha, M., Freire, F. da C. O., Erlan Feitosa Maia, F., Izabel Florindo Guedes, M., & Rondina, D. (2014). Mycotoxins and their effects on human and animal health. In *Food Control* (Vol. 36, Issue 1, pp. 159–165). <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.08.021>
- Edwards, S. G., & Jennings, P. (2018). *Impact of agronomic factors on fusarium mycotoxins in harvested wheat*. <https://doi.org/10.1080/19440049.2018.1543954>
- EFSA. (2013a). Deoxynivalenol in food and feed: occurrence and exposure. *EFSA Journal*, 11(10). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2013.3379>
- EFSA. (2013b). Statement on the risks for public health related to a possible increase of the maximum level of deoxynivalenol for certain semi-processed cereal products. *EFSA Journal*, 11(12). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2013.3490>
- EFSA. (2014). Evaluation of the increase of risk for public health related to a possible temporary derogation from the maximum level of deoxynivalenol, zearalenone and fumonisins for maize and maize products. *EFSA Journal*, 12(5). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3699>
- EIMasry, G., Kamruzzaman, M., Sun, D. W., & Allen, P. (2012). Principles and Applications of Hyperspectral Imaging in Quality Evaluation of Agro-Food Products: A Review. In *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* (Vol. 52, Issue 11, pp. 999–1023). <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.543495>
- EIMasry, G., & Sun, D. W. (2010). Principles of Hyperspectral Imaging Technology. In *Hyperspectral Imaging for Food Quality Analysis and Control* (pp. 3–43). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374753-2.10001-2>
- Eriksen, G. S., & Pettersson, H. (2004). Toxicological evaluation of trichothecenes in animal feed. *Animal Feed Science and Technology*, 114(1–4), 205–239. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2003.08.008>
- Esteki, M., Shahsavari, Z., & Simal-Gandara, J. (2018). Use of spectroscopic methods in combination with linear discriminant analysis for authentication of food products. In *Food Control* (Vol. 91, pp. 100–112). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.03.031>
- FAO/OMS. (1995). Norma del Codex para el trigo y el trigo duro. *Codex Standard 199-1995*, 1–3. <https://doi.org/1020-2579>
- FAO/OMS. (2003). Manual Sobre la Aplicación del Sistema de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control (APPCC) en la Prevención y Control de

Micotoxinas. *Estudio FAO Alimentación Nutrición*, 73, 136.

FAO/OMS. (2020). *FAO Food Price Index*. <https://doi.org/10.4060/ca9509en>

FAO. (1977). *Micotoxinas*.

FAO. (2020). *Perpesctivas de cosechas y situación alimentaria - Informe trimestral mundial Nro. 2*. <https://doi.org/10.4060/ca9803es>

Femenias, A., Gatus, F., Ramos, A. J., Sanchis, V., & Marín, S. (2020a). Standardisation of near infrared hyperspectral imaging for quantification and classification of DON contaminated wheat samples. *Food Control*, 111(December 2019). <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.107074>

Femenias, A., Gatus, F., Ramos, A. J., Sanchis, V., & Marín, S. (2020b). Use of hyperspectral imaging as a tool for Fusarium and deoxynivalenol risk management in cereals: A review. *Food Control*, 108(July 2019), 106819. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106819>

Feng, Y. Z., & Sun, D. W. (2012). Application of Hyperspectral Imaging in Food Safety Inspection and Control: A Review. In *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* (Vol. 52, Issue 11, pp. 1039–1058). <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.651542>

Ferrigo, D., Raiola, A., & Causin, R. (2016). Fusarium toxins in cereals: Occurrence, legislation, factors promoting the appearance and their management. *Molecules*, 21(5), 627. <https://doi.org/10.3390/molecules21050627>

Fox, G., & Manley, M. (2014). Applications of single kernel conventional and hyperspectral imaging near infrared spectroscopy in cereals. In *Journal of the Science of Food and Agriculture* (Vol. 94, Issue 2, pp. 174–179). <https://doi.org/10.1002/jsfa.6367>

Frac, M., Gryta, A., Oszust, K., & Kotowicz, N. (2016). *Fast and Accurate Microplate Method (Biolog MT2) for Detection of Fusarium Fungicides Resistance/Sensitivity*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00489>

Gilbert, J., & Haber, S. (2013). Overview of some recent research developments in fusarium head blight of wheat. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 35(2), 149–174. <https://doi.org/10.1080/07060661.2013.772921>

Gong, Y., Hounsa, A., Egal, S., Turner, P. C., Sutcliffe, A. E., Hall, A. J., Cardwell, K., & Wild, C. P. (2004). Postweaning exposure to aflatoxin results in impaired child growth: A longitudinal study in Benin, West Africa. *Environmental Health Perspectives*, 112(13), 1334–1338. <https://doi.org/10.1289/ehp.6954>

Gourama, H., & Bullerman, L. B. (1995). Detection of molds in foods and feeds: Potential rapid and selective methods. *Journal of Food Protection*, 58(12), 1389–1394. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-58.12.1389>

Gowen, A. A., O'Donnell, C. P., Cullen, P. J., Downey, G., & Frias, J. M. (2007). Hyperspectral imaging - an emerging process analytical tool for food quality and safety control. *Trends in Food Science and Technology*, 18(12), 590–598. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.06.001>

Greene, R. V., Gordon, S. H., Jackson, M. A., Bennett, G. A., McClelland, J. F., & Jones, R. W. (1992). Detection of Fungal Contamination in Corn: Potential of FTIR-PAS and-DRS+. In *Food Chem* (Vol. 40).

<https://pubs.acs.org/sharingguidelines>

- Hazel, C. M., & Patel, S. (2004). Influence of processing on trichothecene levels. *Toxicology Letters*, 153(1), 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2004.04.040>
- Hossain, M. ., & Goto, T. (2014). Near- and mid-infrared spectroscopy as efficient tools for detection of fungal and mycotoxin contamination in agricultural commodities. *World Mycotoxin Journal*, 7(4), 507–515.
- Hussein, H. S., & Brasel, J. M. (2001). Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. In *Toxicology* (Vol. 167, Issue 2, pp. 101–134). [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(01\)00471-1](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(01)00471-1)
- IARC. (2012). Mycotoxins and human health. *IARC Scientific Publications. International Agency for Research on Cancer (IARC)*, 158, 87–104.
- Klamer, M., & Bååth, E. (2004). Estimation of conversion factors for fungal biomass determination in compost using ergosterol and PLFA 18:2ω6,9. *Soil Biology and Biochemistry*, 36(1), 57–65. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2003.08.019>
- Kreuzberger, M., Limsuwan, S., Eggert, K., Karlovsky, P., & Pawelzik, E. (2015). Impact of *Fusarium* spp. infection of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) on composition and quality of flour in association with EU maximum level for deoxynivalenol. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 88, 177–185. <https://doi.org/10.5073/JABFQ.2015.088.025>
- Krska, R., & Molinelli, A. (n.d.). *Rapid test strips for analysis of mycotoxins in food and feed*. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-2424-y>
- Kumar, N., Bansal, A., Sarma, G. S., & Rawal, R. K. (2014). Chemometrics tools used in analytical chemistry: An overview. In *Talanta* (Vol. 123, pp. 186–199). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.02.003>
- Kumar, P., Yadava, R. K., Gollen, B., Kumar, S., Verma, R. K., & Yadav, S. (2011). Nutritional Contents and Medicinal Properties of Wheat: A Review. In *Life Sciences and Medicine Research* (Vol. 2011). <http://astonjournals.com/lsmr>
- Kushiro, M. (2008). Effects of milling and cooking processes on the deoxynivalenol content in wheat. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 9, Issue 11, pp. 2127–2145). <https://doi.org/10.3390/ijms9112127>
- Lattanzio, V. M. T., Pascale, M., & Visconti, A. (2009). Current analytical methods for trichothecene mycotoxins in cereals. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 28(6), 758–768. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2009.04.012>
- Leslie, J. F., & Summerell, B. A. (2006). *The Fusarium Laboratory Manual* (First Edit). Blackwell Publishing. https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=Yu3cBAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR3&ots=3K7c3ORd0o&sig=gAEAHrIOALqB53FFt_DkpJhMPQM#v=onepage&q&f=false
- Levasseur-Garcia, C. (2018). Updated overview of infrared spectroscopy methods for detecting mycotoxins on cereals (corn, wheat, and barley). In *Toxins* (Vol. 10, Issue 1, p. 38). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/toxins10010038>
- Lewis, L., Onsongo, M., Njapau, H., Schurz-Rogers, H., Lubber, G., Kieszak, S., Nyamongo, J., Backer, L., Dahiye, A. M., Misore, A., DeCock, K., Rubin, C., Nyikal, J., Njuguna, C., Langat, A., Kilei, I. K., Tetteh, C., Likimani, S., Oduor, J.,

- ... Gupta, N. (2005). Aflatoxin contamination of commercial maize products during an outbreak of acute aflatoxicosis in eastern and central Kenya. *Environmental Health Perspectives*, 113(12), 1763–1767. <https://doi.org/10.1289/ehp.7998>
- Liang, K., Liu, Q. X., Xu, J. H., Wang, Y. Q., Okinda, C. S., & Shena, M. X. (2018). Determination and Visualization of Different Levels of Deoxynivalenol in Bulk Wheat Kernels by Hyperspectral Imaging. *Journal of Applied Spectroscopy*, 85(5), 953–961. <https://doi.org/10.1007/s10812-018-0745-y>
- Liu, Y., & Rayens, W. (2007). PLS and dimension reduction for classification. *Computational Statistics*, 22, 189–208. <https://doi.org/10.1007/s00180-007-0039-y>
- Ma, J., Sun, D. W., Qu, J. H., Liu, D., Pu, H., Gao, W. H., & Zeng, X. A. (2016). Applications of Computer Vision for Assessing Quality of Agri-food Products: A Review of Recent Research Advances. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(1), 113–127. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.873885>
- Manley, M. (2014). Near-infrared spectroscopy and hyperspectral imaging: Non-destructive analysis of biological materials. In *Chemical Society Reviews* (Vol. 43, Issue 24, pp. 8200–8214). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/c4cs00062e>
- Maragos, C., Busman, M., & Sugita-Konishi, Y. (2006). Production and characterization of a monoclonal antibody that cross-reacts with the mycotoxins nivalenol and 4-deoxynivalenol. *Food Additives and Contaminants*, 23(8), 816–825. <https://doi.org/10.1080/02652030600699072>
- Martens, H. (2001). Reliable and relevant modelling of real world data: A personal account of the development of PLS Regression. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 58(2), 85–95. [https://doi.org/10.1016/S0169-7439\(01\)00153-8](https://doi.org/10.1016/S0169-7439(01)00153-8)
- Martens, H., Nielsen, J. P., & Engelsen, S. B. (2003). Light scattering and light absorbance separated by extended multiplicative signal correction. Application to near-infrared transmission analysis of powder mixtures. *Analytical Chemistry*, 75(3), 394–404. <https://doi.org/10.1021/ac020194w>
- McMullen, M., Bergstrom, G., De Wolf, E., Dill-Macky, R., Hershman, D., Shaner, G., & Van Sanford, D. (2012). A unified effort to fight an enemy of wheat and barley: Fusarium head blight. *Plant Disease*, 96(12), 1712–1728. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-12-0291-FE>
- Mcmullin, D., Mizaikoff, B., & Krska, R. (2005). Advancements in IR spectroscopic approaches for the determination of fungal derived contaminations in food crops. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407, 653–660. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-8145-5>
- Meneely, J. P., & Elliott, C. T. (2014). Rapid surface plasmon resonance immunoassays for the determination of mycotoxins in cereals and cereal-based food products. In *World Mycotoxin Journal* (Vol. 7, Issue 4, pp. 491–505). Wageningen Academic Publishers. <https://doi.org/10.3920/WMJ2013.1673>
- Mille-Lindblom, C., Von Wachenfeldt, E., & Tranvik, L. J. (2004). Ergosterol as a measure of living fungal biomass: Persistence in environmental samples after fungal death. *Journal of Microbiological Methods*, 59(2), 253–262. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2004.07.010>

- Montgomery, H. J., Monreal, C. M., Young, J. C., & Seifert, K. A. (2000). Determination of soil fungal biomass from soil ergosterol analyses. *Soil Biology and Biochemistry*, 32(8–9), 1207–1217. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)00037-7](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00037-7)
- Muthomi, J. W., Ndung'u, J. K., Gathumbi, J. K., Mutitu, E. W., & Wagacha, J. M. (2008). The occurrence of *Fusarium* species and mycotoxins in Kenyan wheat. *Crop Protection*, 27(8), 1215–1219. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2008.03.001>
- Nagy, C. M., Fejer, S. N., Berek, L., Molnar, J., & Viskolcz, B. (2005). Hydrogen bondings in deoxynivalenol (DON) conformations - A density functional study. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 726(1–3), 55–59. <https://doi.org/10.1016/j.theochem.2005.02.079>
- Narvankar, D. S., Singh, C. B., Jayas, D. S., & White, N. D. G. (2009). Assessment of soft X-ray imaging for detection of fungal infection in wheat. *Biosystems Engineering*, 103(1), 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2009.01.016>
- Nutter, F. W., Gleason, M. L., Jenco, J. H., & Christians, N. C. (1993). Assessing the Accuracy, Intra-rater Repeatability, and Inter-rater Reliability of Disease Assessment Systems. *Phytopathology*, 83(8), 806. <https://doi.org/10.1094/phyto-83-806>
- O'Donnell, K., Ward, T. J., Geiser, D. M., Kistler, H. C., & Aoki, T. (2004). Genealogical concordance between the mating type locus and seven other nuclear genes supports formal recognition of nine phylogenetically distinct species within the *Fusarium graminearum* clade. *Fungal Genetics and Biology*, 41(6), 600–623. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2004.03.003>
- OMS. (2007). *Cereales, Legumbres, Leguminosas y Productos Proteínicos Vegetales* (First Edit).
- Osborne, L. E., & Stein, J. M. (2007). Epidemiology of *Fusarium* head blight on small-grain cereals. *International Journal of Food Microbiology*, 119(1–2), 103–108. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.032>
- Ozaki, Y., McClure, W. F., & Christy, A. A. (2007). *Near-Infrared Spectroscopy in Food Science and Technology* (John Wiley and Sons (ed.)). Hoboken. [https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=wsk7SPMOuJAC&oi=fnd&pg=PR5&dq=Ozaki,+Y.,+Morita,+S.+and+Du,+Y.,+2007.+Spectral+analysis.+In:+Ozaki,+Y.,+McClure,+W.F.+and+Christy,+A.A.+\(eds.\)+Near-infrared+spectroscopy+in+food+science+and+technology.+John+Wiley+and+Sons,+Hoboken,+NJ,+USA,+pp.+43-72.&ots=ZnX931WYDI&sig=25vsTVYUGIONVNMaeSMrPMB-Blk#v=onepage&q&f=false](https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=wsk7SPMOuJAC&oi=fnd&pg=PR5&dq=Ozaki,+Y.,+Morita,+S.+and+Du,+Y.,+2007.+Spectral+analysis.+In:+Ozaki,+Y.,+McClure,+W.F.+and+Christy,+A.A.+(eds.)+Near-infrared+spectroscopy+in+food+science+and+technology.+John+Wiley+and+Sons,+Hoboken,+NJ,+USA,+pp.+43-72.&ots=ZnX931WYDI&sig=25vsTVYUGIONVNMaeSMrPMB-Blk#v=onepage&q&f=false)
- Paollesse, R., Alimelli, A., Martinelli, E., Natale, C. Di, D'Amico, A., D'Egidio, M. G., Aureli, G., Ricelli, A., & Fanelli, C. (2006). Detection of fungal contamination of cereal grain samples by an electronic nose. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 119(2), 425–430. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2005.12.047>
- Parry, D. W., Jenkinson, P., & McLeod, L. (1995). *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals—a review. *Plant Pathology*, 44(2), 207–238. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1995.tb02773.x>
- Pasquini, C. (2003). Near infrared spectroscopy: Fundamentals, practical aspects and analytical applications. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 14(2), 198–219.

<https://doi.org/10.1590/S0103-50532003000200006>

- Pasquini, C. (2018). Near infrared spectroscopy: A mature analytical technique with new perspectives – A review. In *Analytica Chimica Acta* (Vol. 1026, pp. 8–36). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.04.004>
- Peiris, K. H. S., Pumphrey, M. O., Dong, Y., Maghirang, E. B., Berzonsky, W., & Dowell, F. E. (2010). Near-infrared spectroscopic method for identification of Fusarium head blight damage and prediction of deoxynivalenol in single wheat kernels. *Cereal Chemistry*, *87*(6), 511–517. <https://doi.org/10.1094/CCHEM-01-10-0006>
- Peiris, K. H. S., Pumphrey, M. O., & Dowell, F. E. (2009). NIR absorbance characteristics of deoxynivalenol and of sound and Fusarium-damaged wheat kernels. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, *17*, 213–221. <https://doi.org/10.1255/jnirs.846>
- Pestka, J. J., & Smolinski, A. T. (2005). Deoxynivalenol: Toxicology and potential effects on humans. In *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews* (Vol. 8, Issue 1, pp. 39–69). <https://doi.org/10.1080/10937400590889458>
- Pettersson, H., & Åberg, L. (2003). Near infrared spectroscopy for determination of mycotoxins in cereals. *Food Control*, *14*(4), 229–232. [https://doi.org/10.1016/S0956-7135\(03\)00011-2](https://doi.org/10.1016/S0956-7135(03)00011-2)
- Ramírez-Morales, I., Rivero, D., Fernández-Blanco, E., & Pazos, A. (2016). Optimization of NIR calibration models for multiple processes in the sugar industry. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, *159*, 45–57. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2016.10.003>
- Ramos, A. J. (2011). *Micotoxinas y micotoxicosis. 1ra Edición* (AMV Edicio).
- Ran, R., Wang, C., Han, Z., Wu, A., Zhang, D., & Shi, J. (2013). Determination of deoxynivalenol (DON) and its derivatives: Current status of analytical methods. In *Food Control* (Vol. 34, Issue 1, pp. 138–148). <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.04.026>
- Reddy, K. R. N., Salleh, B., Saad, B., Abbas, H. K., Abel, C. A., & Shier, W. T. (2010). An overview of mycotoxin contamination in foods and its implications for human health. In *Toxin Reviews* (Vol. 29, Issue 1, pp. 3–26). <https://doi.org/10.3109/15569541003598553>
- Ribichich, K. F., Lopez, S. E., & Vegetti, A. C. (2000). Histopathological spikelet changes produced by Fusarium graminearum in susceptible and resistant wheat cultivars. *Plant Disease*, *84*(7), 794–802. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.7.794>
- Ropelowska, E., & Zapotoczny, P. (2018). Classification of Fusarium-infected and healthy wheat kernels based on features from hyperspectral images and flatbed scanner images: a comparative analysis. *European Food Research and Technology*, *244*(8), 1453–1462. <https://doi.org/10.1007/s00217-018-3059-7>
- Ruan, R., Ning, S., Song, A., Ning, A., Jones, R., & Chen, P. (1998). Estimation of Fusarium scab in wheat using machine vision and a neural network. *Cereal Chemistry*, *75*(4), 455–459. <https://doi.org/10.1094/CCHEM.1998.75.4.455>
- Schaafsma, A. W., Savard, M. E., Clear, R., & Dexter, J. (2004). Methods and issues

- regarding detection of deoxynivalenol, Fusarium-damaged kernels, and Fusarium spp. in commercial grain in Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 26(4), 443–452. <https://doi.org/10.1080/07060660409507164>
- Seitz, L. M., Sauer, D. B., Burroughs, R., Mohr, H. E., & Hubbard, J. D. (1979). Ergosterol as a Measure of Fungal Growth. *Phytopathology*, 69(11), 1202. <https://doi.org/10.1094/phyto-69-1202>
- Sendin, K., Williams, P. J., & Manley, M. (2018). Near infrared hyperspectral imaging in quality and safety evaluation of cereals. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(4), 575–590. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1205548>
- Shahin, M. A., & Symons, S. J. (2011). Detection of Fusarium damaged kernels in Canada Western Red Spring wheat using visible/near-infrared hyperspectral imaging and principal component analysis. *Computers and Electronics in Agriculture*, 75(1), 107–112. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2010.10.004>
- Simsek, S., Burgess, K., Whitney, K. L., Gu, Y., & Qian, S. Y. (2012). Analysis of Deoxynivalenol and Deoxynivalenol-3-glucoside in wheat. *Food Control*, 26(2), 287–292. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.01.056>
- Singh, V. K., Devi, A., Pathania, S., Kumar, V., Kumar Tripathi, D., Sharma, S., Chauhan, D. K., Singh, V. K., & Zorba, V. (2016). *Spectroscopic investigation of wheat grains (Triticum aestivum) infected by wheat seed gall nematodes (Anguina tritici)*. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.11.005>
- Sobrova, P., Adam, V., Vasatkova, A., Beklova, M., Zeman, L., & Kizek, R. (2010). Deoxynivalenol and its toxicity. In *Interdisciplinary Toxicology* (Vol. 3, Issue 3, pp. 94–99). <https://doi.org/10.2478/v10102-010-0019-x>
- Šramková, Z., Kraic, F., Jurovatá, J., Gregová, E., & Šturdíka, E. (2009). View of Chemometric analysis of nutritional and bread-making quality attributes of wheat cultivars. *Acta Chimica Slovaca*, 2, 139–146. <https://ojs.fchpt.stuba.sk/ojs/index.php/ACS/article/view/370/322>
- Sugita-Konishi, Y., Park, B. J., Kobayashi-Hattori, K., Tanaka, T., Chonan, T., Yoshikawa, K., & Kumagai, S. (2006). Effect of cooking process on the deoxynivalenol content and its subsequent cytotoxicity in wheat products. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 70(7), 1764–1768. <https://doi.org/10.1271/bbb.50571>
- Sulyok, M., Berthiller, F., Krska, R., & Schuhmacher, R. (2006). Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of 39 mycotoxins in wheat and maize. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 20(18), 2649–2659. <https://doi.org/10.1002/rcm.2640>
- Tkachuk, R., Dexter, J. E., Tipples, K. H., & Nowicki, T. W. (1991). Removal by specific gravity table of tombstone kernels and associated trichothecenes from wheat infected with Fusarium head blight. *Cereal Chemistry Journal*, 68, 428–431.
- Topping, D. (2007). Cereal complex carbohydrates and their contribution to human health. *Journal of Cereal Science*, 46(3), 220–229. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2007.06.004>
- Trail, F. (2009). For blighted waves of grain: Fusarium graminearum in the postgenomics era. In *Plant Physiology* (Vol. 149, Issue 1, pp. 103–110). <https://doi.org/10.1104/pp.108.129684>

- Trombete, F., Barros, A., Vieira, M., Saldanha, T., Venâncio, A., & Fraga, M. (2016). Simultaneous Determination of Deoxynivalenol, Deoxynivalenol-3-Glucoside and Nivalenol in Wheat Grains by HPLC-PDA with Immunoaffinity Column Cleanup. *Food Analytical Methods*, 9, 2579–2586. <https://doi.org/10.1007/s12161-016-0450-5>
- Tsai, F., & Philpot, W. (1998). Derivative analysis of hyperspectral data. *Remote Sensing of Environment*, 66(1), 41–51. [https://doi.org/10.1016/S0034-4257\(98\)00032-7](https://doi.org/10.1016/S0034-4257(98)00032-7)
- Vidal, A., Sanchis, V., Ramos, A. J., & Marín, S. (2016). The fate of deoxynivalenol through wheat processing to food products. In *Current Opinion in Food Science* (Vol. 11, pp. 34–39). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2016.09.001>
- Vidal, A., Sanchis, V., Ramos, A. J., & Marín, S. (2018). Stability of DON and DON-3-glucoside during baking as affected by the presence of food additives. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 35(3), 529–537. <https://doi.org/10.1080/19440049.2017.1401741>
- Visconti, A., Haidukowski, E. M., Pascale, M., & Silvestri, M. (2004). Reduction of deoxynivalenol during durum wheat processing and spaghetti cooking. *Toxicology Letters*, 153(1), 181–189. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2004.04.032>
- Waalwijk, C., Van Der Heide, R., De Vries, I., Van Der Lee, T., Schoen, C., Costrel-De Corainville, G., Häuser-Hahn, I., Kastelein, P., Rgen, J., Ko“hl, K., Lonnet, P., Demarquet, T., & Kema, G. H. J. (2004). Quantitative detection of Fusarium species in wheat using TaqMan. *European Jou*, 110, 481–494.
- Wagacha, J. M., & Muthomi, J. W. (2008a). Mycotoxin problem in Africa: Current status, implications to food safety and health and possible management strategies. *International Journal of Food Microbiology*, 124(1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.01.008>
- Wagacha, J. M., & Muthomi, J. W. (2008b). Mycotoxin problem in Africa: Current status, implications to food safety and health and possible management strategies. In *International Journal of Food Microbiology* (Vol. 124, Issue 1, pp. 1–12). <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.01.008>
- Weete, J. D. (1989). Structure and Function of Sterols in Fungi. In *Advance and Lipids Research Vol. 23* (pp. 115–167). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-024923-7.50007-8>
- Wegulo, S. N., & Dowell, F. E. (2008). Near-infrared versus visual sorting of Fusarium-damaged kernels in winter wheat. *Canadian Journal of Plant Science*, 88(6), 1087–1089. <https://doi.org/10.4141/CJPS08053>
- Westad, F., Bevilacqua, M., & Marini, F. (2013). Regression. In *Data Handling in Science and Technology* (Vol. 28, pp. 127–170). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59528-7.00004-1>
- Wold, S., Sjöström, M., & Eriksson, L. (2001). PLS-regression: A basic tool of chemometrics. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 58(2), 109–130. [https://doi.org/10.1016/S0169-7439\(01\)00155-1](https://doi.org/10.1016/S0169-7439(01)00155-1)
- Xing, F., Yao, H., Liu, Y., Dai, X., Brown, R. L., & Bhatnagar, D. (2019). Recent developments and applications of hyperspectral imaging for rapid detection of

mycotoxins and mycotoxigenic fungi in food products. In *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* (Vol. 59, Issue 1, pp. 173–180). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1363709>

Zain, M. E. (2011). Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society*, 15(2), 129–144. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2010.06.006>

Zhao, T., Chen, M., Jiang, X., Shen, F., He, X., Fang, Y., Liu, Q., & Hu, Q. (2020). Integration of spectra and image features of Vis/NIR hyperspectral imaging for prediction of deoxynivalenol contamination in whole wheat flour. *Infrared Physics and Technology*, 109(June), 103426. <https://doi.org/10.1016/j.infrared.2020.103426>