



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ALEXANDRE TADACHI MOREY

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE FUMONISINAS POR
Fusarium verticillioides EM MEIO LÍQUIDO**

Londrina
2008

ALEXANDRE TADACHI MOREY

AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE FUMONISINAS POR
***Fusarium verticillioides* EM MEIO LÍQUIDO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Elisabete Yurie Sataque Ono

Londrina
2008

**Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

M845a Morey, Alexandre Tadachi.

Avaliação da produção de fumonisinas por *Fusarium verticillioides*
em meio líquido / Alexandre Tadachi Morey. – Londrina, 2008.
77f. : il.

Orientador: Elisabete Yurie Sataque Ono.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de
Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia, 2008.

Inclui bibliografia.

1. Fumonisinas – Teses. 2. Milho – Fungos – Toxigênicos – Teses.
3. *F. verticillioides* – Milho – Teses. I. Ono, Elisabete Yurie Sataque.
II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas.
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título.

CDU 641:579

ALEXANDRE TADACHI MOREY

AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE FUMONISINAS POR
***Fusarium verticillioides* EM MEIO LÍQUIDO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Elisabete Yurie Sataque Ono
Universidade Estadual de Londrina

Profa. Dra. Elisa Yoko Hirooka
Universidade Estadual de Londrina

Profa. Dra. Tereza Cristina R. M. de Oliveira
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 28 de fevereiro de 2008.

Não apenas essa dissertação do mestrado, mas todas as minhas conquistas profissionais são dedicadas aos meus pais, Mário Yochio Morey e Vanda Alice Galo Morey, que em nenhum momento deixaram de me apoiar. Amo muito vocês!

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dra. Elisabete Yurie Sataque Ono pela disponibilidade, paciência e comentários críticos.

À Universidade Estadual de Londrina, pelas oportunidades e aos professores do programa de Mestrado em Biotecnologia, pelo conhecimento transmitido e dedicação.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro, à Fundação Araucária e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES), pela concessão de Bolsas de Estudo.

À Profa. Dra. Elisa Yoko Hirooka, pelo fornecimento das cepas utilizadas neste trabalho, sugestões, críticas e auxílio em várias atividades realizadas durante este curso.

À Profa. Dra. Maria Josefa Santos Yabe e ao Prof. Dr. Fábio Luiz Melquiades, pelo auxílio, sugestões e comentários críticos.

Ao Prof. Dr. Mario Augusto Ono, pelo auxílio e colaboração.

À Profa. Dra. Tereza Cristina R. M. de Oliveira e à Profa. Dra. Ieda Spacino Scarminio, pelas sugestões e comentários críticos.

Ao Prof. Dr. Édio Vizoni, pelo auxílio na análise dos resultados, sugestões e comentários.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia (CCE/UEL): Nelson Janeiro Rodriguez, Elda Jonas Aguiar, Sílvia B. da Costa Avelino, Sérgio Nascimento Evangelista, Sandra Aparecida Defende, Neusa Zamuner de Souza, e ao funcionário do Departamento de Química (CCE/UEL), Jurandir Pereira Pinto pela colaboração.

Aos colegas de laboratório, pelo auxílio e companheirismo, em especial à Elaine Cunha Moreno, Virgínia Carla de Almeida Falcão, Tatiana de Ávila Miguel, Jakeliny Akemy Y. de Oliveira, Isabela Guarnier Domiciano, Lucas Freitas de Freitas, Daniel Marchetti Maroneze, Luana Neves Vanelli, Carolina Nachi Rossi e Jaqueline Gozzi Bordini. Ao grupo de pesquisa, pelas sugestões, auxílio e colaboração, em especial à Simone Fujii, Luciana Bernd, e à técnica Patrícia Sambatti (CTA/CCA/UEL).

Aos colegas do curso pelo companheirismo e amizade durante as disciplinas e ao longo desses anos, em especial ao Juan Daniel Rivaldi Chavez e à Adriana Pereira da Silva.

Ao meu irmão Mário Yochio Morey Júnior, pela motivação e aos amigos que de forma indireta tenham contribuído para a realização deste trabalho. Em especial ao Márcio Seiji Suganuma, Daniel Santos Pinto Silva, Marisa Emiko Kawaichi, Maurício Nascimento K. Madruga, Paulo Medri, Ivana Abonízio Santinoni, Alexandre Garcia, Flávio José Duran Castilho, Juliana Oliveira Barbino, Fernando Yuldi Ashikaga, Larissa Bettin Pires, Siliane Denise Berté e Carolina Castello Branco pelo companheirismo e bons momentos compartilhados.

A todos que tenham contribuído de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho.

MOREY, Alexandre Tadachi. **Avaliação da produção de fumonisinas por *Fusarium verticillioides* em meio líquido**. 2008. 72f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

RESUMO

Fusarium verticillioides é um patógeno primário de milho e principal produtor de fumonisinas. Este fungo pode causar perdas econômicas significativas para produtores e processadores de grãos, criadores de animais, além de representar sérios riscos à saúde humana e animal. Este trabalho teve como objetivo avaliar a produção de fumonisinas por *F. verticillioides* em diferentes combinações de fontes e concentrações de carboidratos e aminoácidos. Numa primeira fase, a cepa 103F foi cultivada em 3 diferentes meios de cultivo líquido (complexo, definido com fonte orgânica de nitrogênio e definido com fonte inorgânica de nitrogênio) por 15 dias. O meio líquido definido com fonte orgânica de nitrogênio proporcionou maior produção de fumonisinas (4,5 µg/mL) por esta cepa, sendo selecionado para os experimentos posteriores. Três cepas de *F. verticillioides* (103F, 113B e 103BR) foram avaliadas quanto à produção de fumonisinas em 9 diferentes combinações de carboidratos (glucose, frutose e maltose) e aminoácidos (valina, alanina e leucina). Tendo em vista a maior produção de fumonisinas (4,3 µg/mL) pela cepa 103F em meio com maltose e leucina, essa cepa foi selecionada para avaliar a influência e interação de diferentes concentrações de maltose (20 e 40 g/L) e leucina (1 e 2 g/L) na produção de fumonisinas. Maior produção de fumonisinas ocorreu no meio de cultivo que continha 40 e 1 g/L de maltose e leucina, respectivamente. Na segunda fase, a cepa 103F foi cultivada em glucose (20 g/L) e glicina (1 g/L) em dois diferentes períodos de cultivo (15 e 21 dias) para avaliar a influência do tempo de cultivo na produção de fumonisinas. A produção foi significativamente maior (1,35 µg/mL) em 21 dias ($p < 0,05$). Posteriormente, as cepas 103F, 97K e 119B foram utilizadas para avaliar a produção de fumonisinas em diferentes combinações de fontes de carboidratos (glucose, maltose e frutose) e aminoácidos (glicina e alanina). O meio de cultivo, que proporcionou maior produção de fumonisinas (1,64 µg/mL) pelas cepas analisadas, continha glucose e glicina como fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente, diferindo significativamente dos demais meios pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Com o objetivo de avaliar o efeito da concentração de nitrogênio sobre a produção de fumonisinas por *F. verticillioides*, estas 3 cepas foram cultivadas em três diferentes concentrações de glicina (0,5, 1 e 2 g/L). Ocorreu maior produção de fumonisinas (1,56 µg/mL) nos meios que continham 1 g/L de glicina ($p < 0,05$) para as três cepas. Os resultados deste estudo demonstraram que os tipos e as concentrações de nutrientes presentes no meio de cultivo influenciaram a produção de fumonisinas por *Fusarium verticillioides*. A produção desta micotoxina variou conforme a cepa de *F. verticillioides*, concentração e fonte de carbono/nitrogênio presentes no meio líquido.

Palavras chave: *F. verticillioides*. Fumonisinas. Carboidratos. Aminoácidos.

MOREY, Alexandre Tadachi. **Evaluation of fumonisin production by *Fusarium verticillioides* in liquid culture medium.** 2008. 72p. Dissertation (Master's degree in Biotechnology) – State University of Londrina, Londrina, 2008.

ABSTRACT

Fusarium verticillioides is a primary corn pathogen and the main fumonisin producer. This fungus can cause significant economical losses for the farmers, grain processors, animal producers and hazards to human and animal health. The aim of this study was to evaluate fumonisin production by *F. verticillioides* in different combinations of source and concentrations of carbohydrates and amino acids. At the first step, the 103F strain was grown in 3 different liquid culture medium (A, B and C) for 15 days. The medium B, which provided the highest fumonisin production (4.5 µg/ml) by this strain was selected for further experiments. Fumonisin production by three *F. verticillioides* strains (103F, 113B and 103BR) was evaluated in 9 different combinations of carbohydrates (glucose, fructose and maltose) and amino acids (valine, alanine and leucine). The highest fumonisin level (4.3 µg/ml) was produced by the 103F strain in a medium containing maltose and leucine. Therefore, this strain was selected to evaluate the influence and interaction of different maltose concentrations (20 and 40 g/L) and leucine (1 and 2 g/L) on fumonisin production. The highest fumonisin production occurred in the culture medium with 40 and 1 g/L of maltose and leucine, respectively. In the second step, the 103F strain was grown in glucose (20 g/L) and glycine (1 g/L) in two different cultivation periods (15 and 21 days) in order to evaluate the influence of cultivation period on fumonisin production. The highest fumonisin production (1.35 µg/ml) occurred in 21 days ($p < 0.05$). Subsequently, the strains 103F, 97K and 119B were used to evaluate fumonisin production in different combination of carbohydrate (glucose, maltose and fructose) and amino acid (glycine and alanine) sources. The highest fumonisin production (1.64 µg/mL) occurred in culture medium containing glucose and alanine as the carbon and nitrogen sources, respectively, and there was a significant difference from other media by the Tukey test ($p < 0.05$). In order to evaluate the effect of the nitrogen concentration on fumonisin production, these 3 strains were grown in three different glycine concentrations (0.5, 1 and 2 g/L). The highest fumonisin production occurred in culture medium with 1 g/L glycine ($p < 0.05$). This study demonstrated that the nutrient type and concentration in the culture medium influenced the fumonisin production by *F. verticillioides*. The production varied according to *F. verticillioides* strains, concentration and carbon/nitrogen source in the liquid culture medium.

Keywords: *F. verticillioides*. Fumonisins. Carbohydrates. Amino acids.

LISTA DE TABELAS

Meio de cultura complexo	27
Meio de cultura líquido com fonte orgânica de nitrogênio	27
Meio de cultura líquido com fonte inorgânica de nitrogênio	28
Tabela 1 – Meios de cultura com diferentes combinações entre carboidratos e aminoácidos.....	29
Tabela 2 – Produção de biomassa e fumonisina por <i>Fusarium verticillioides</i> 103F em 3 diferentes meios de cultura	33

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química das principais fumonisinas	17
Figura 2 – Estrutura molecular das fumonisinas B ₁ e B ₂ , esfinganina e esfingosina	19
Figura 3 – Mecanismo proposto de ação tóxica das fumonisinas.....	20
Figura 4 – Cromatograma obtido da análise de fumonisinas produzidas por <i>Fusarium verticillioides</i> 103F cultivada no meio líquido com fonte orgânica de nitrogênio por CLAE	34

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 <i>Fusarium verticillioides</i>	14
2.2 FUMONISINAS	15
2.3 MEIOS DE CULTIVO PARA PRODUÇÃO DE FUMONISINAS	21
3 OBJETIVOS	25
3.1 OBJETIVO GERAL.....	25
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
4 MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 CULTURAS FÚNGICAS	26
4.2 MEIOS DE CULTURA	26
4.3 DETERMINAÇÃO DE PH	29
4.4 DETERMINAÇÃO DE BIOMASSA.....	29
4.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES	30
4.6 DETERMINAÇÃO DE FUMONISINAS	30
4.7 CÁLCULO DOS EFEITOS PRINCIPAIS E DE INTERAÇÃO	30
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	31
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1 SELEÇÃO DO MEIO DE CULTURA.....	33
AVALIAÇÃO DE FONTES DE CARBONO E NITROGÊNIO NA PRODUÇÃO DE FUMONISINAS POR <i>F. VERTICILLIOIDES</i> EM MEIO LÍQUIDO DEFINIDO	35
FATORES QUE AFETAM A PRODUÇÃO DE FUMONISINAS POR <i>FUSARIUM VERTICILLIOIDES</i> EM MEIO LÍQUIDO DEFINIDO: TEMPO DE CULTIVO, CARBOIDRATOS E AMINOÁCIDOS	50

6 CONCLUSÕES..... 64

REFERÊNCIAS 65

1 INTRODUÇÃO

Micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos produzidos por várias espécies de diferentes gêneros fúngicos, com estruturas químicas variadas e que ocorrem em uma variedade de substratos, incluindo produtos agrícolas (DIAZ; BOERMANS, 1994). A ingestão destes compostos pode resultar em intoxicações ao homem ou animais (MISLIVEC, 1979).

As micotoxinas não são destruídas pelo processamento comum dos alimentos e podem estar presentes em alimentos processados a partir de produtos contaminados (MUNKVOLD; DESJARDINS, 1997).

Entre os fungos toxigênicos, destacam-se os gêneros *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* e *Myrothecium* (AYRES, 1979), capazes de produzir micotoxinas no campo, durante a colheita, transporte e armazenagem.

Dentre muitas espécies de *Fusarium*, somente um pequeno número contamina cereais no campo e produz micotoxinas. As cinco espécies toxigênicas mais importantes que ocorrem em grãos e rações são: *F. graminearum*, *F. poae*, *F. sporotrichioides*, *F. equiseti* e *F. verticillioides* (ABRAMSON et al., 1998).

As espécies do gênero *Fusarium* são capazes de produzir uma variedade de micotoxinas, citando-se as fumonisinas, as fusarinas, moniliformina, toxina T-2, ácido fusárico, deoxinivalenol, diacetoxiscirpenol e zearalenona (LI et al., 2000)

As fumonisinas causam leucoencefalomalácia em eqüinos (ELEM) (MARASAS et al., 1988), edema pulmonar em suínos (HARRISON et al., 1990) e redução no desenvolvimento e imunodepressão em aves (WEIBKING et al., 1993). Em ratos, foi comprovada a ação hepatocarcinogênica (GELDERBLOM et al., 1992). Em seres humanos, estudos epidemiológicos indicam a associação com câncer esofágico e câncer hepático primário (WANG et al., 1995; GELDERBLOM et al., 1988 e 1992; UENO et al., 1997).

A elevada incidência de fumonisinas em milho brasileiro é preocupante, uma vez que estudos realizados anteriormente por Hirooka et al. (1996) e Ono et al. (1999) revelaram 100% e 99,3% de contaminação em amostras de milho, detectando-se concentrações de até 10,59 µg/g para fumonisina B₁ (FB₁) e 13,46 µg/g para fumonisina B₂ (FB₂). As crescentes exigências dos mercados interno e externo quanto à garantia de qualidade e sanidade de produtos alimentares têm obrigado a implementação de processos de certificação e rastreabilidade. A falta de controle de qualidade na matéria-prima pode levar ao

estrangulamento na demanda do produto, comprometendo toda a linha de exportação, inclusive de produtos de origem animal.

A melhor estratégia para o controle efetivo da contaminação por fumonisinas consiste na prevenção da infecção por *Fusarium* spp. e da produção de fumonisinas no campo e na armazenagem. Portanto, é imprescindível o desenvolvimento de ensaios adequados para a detecção do fungo, visando o controle de qualidade dos produtos destinados ao consumo humano e animal (MEIRELLES, 2005).

A maioria dos estudos sobre toxigenicidade de *Fusarium verticillioides* são realizados em substratos naturais (meios sólidos), porém os processos de extração e purificação de fumonisinas nesses meios requerem muitas etapas e solventes tóxicos, além de dificultarem o estudo das vias biossintéticas e o mecanismo de controle da produção de fumonisinas. Os meios líquidos podem eliminar muitos problemas relacionados à produção de fumonisinas em meio sólido.

Devido ao reduzido número de relatos sobre a influência dos nutrientes presentes no meio na produção de fumonisinas em meio líquido, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a influência de diferentes fontes e concentrações de carboidratos e aminoácidos em meio líquido na produção destas micotoxinas por *Fusarium verticillioides*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Fusarium verticillioides*

Fungos são organismos heterotróficos isentos de clorofila, dependentes exclusivos de uma fonte externa de componentes orgânicos para suprir a necessidade energética. Esta característica confere a muitas espécies necessidade de subsistência com organismos superiores, na forma de parasitas ou saprófitas, constituindo importantes contaminantes em alimentos, que desencadeiam os processos de deterioração dos mesmos (MISLIVEC, 1979).

Os principais danos causados por fungos em milho são a perda de peso, coloração, necrose dos grãos e a produção de micotoxinas, que consiste no fator decisivo na atual liberação de produtos agrícolas no comércio internacional (JULIAN et al., 1995).

Embora existam muitas espécies de *Fusarium*, somente um pequeno número contamina cereais no campo e produz micotoxinas. As cinco espécies toxigênicas mais importantes que ocorrem em grãos e rações são *F. graminearum*, *F. poae*, *F. sporotrichioides*, *F. equiseti* e *F. verticillioides* (ABRAMSON et al., 1998).

F. verticillioides Sacc. Nirenberg (= *F. moniliforme* Sheldon), a fase anamórfica de *Giberella fujikuroi* (Sawada) Wr., é o principal produtor de fumonisinas e comumente associado ao milho destinado ao consumo humano e animal em todo o mundo (MARASAS, 2001). Possui ampla distribuição geográfica, com predominância em regiões de clima tropical úmido e subtropical, e a sua importância, se atribui a prejuízos econômicos causados em milho e outros cereais (BACON; NELSON, 1994).

Desde a sua descrição em 1904, *F. verticillioides* é um dos fungos com maior índice de incidência em milho, estando envolvido em doenças animais e humanas (SHELDON, 1904; NELSON, 1992).

F. verticillioides causa doenças em todos os estádios do desenvolvimento do milho, infectando raízes, colmo e espigas causando podridão, além de estar entre os fungos comumente associados ou colonizando plantas assintomáticas (MUNKVOLD; DESJARDINS, 1997).

O ciclo de fusariose inicia-se com a sobrevivência do fungo nos resíduos de cultivos anteriores, na forma de hifas capazes de contaminarem sementes no solo, seguida de

disseminação sistêmica para o colmo, até atingir a espiga (MUNKVOLD; DESJARDINS, 1997).

Outra provável via de contaminação é a disseminação de macro e microconídeos pelo ar ou gotículas de chuva, por meio do estigma da espiga. Os conídeos introduzidos nos tecidos por via sistêmica atingem os grãos, porém o estigma constitui a via de inoculação mais direta. Outro processo que favorece a fusariose é a transmissão de conídeos através de insetos vetores, os quais também provocam injúrias na planta, tornando o local adequado para fixação e germinação de conídeos (MUNKVOLD; DESJARDINS, 1997).

Uma vez que o fungo esteja estabelecido, pode se desenvolver muito rapidamente dependendo das condições climáticas. *F. verticillioides* produz uma grande quantidade de esporos que pode infectar grãos de milho, espigas e outras partes sadias da planta. Grãos, sabugo e outras partes da planta contaminadas constituem fonte de inóculo para a safra seguinte. Os esporos podem causar também a contaminação do milho colhido e armazenado devido às misturas de diferentes lotes do produto que ocorrem desde o momento da colheita até o processamento final (LAZZARI, 1997).

A temperatura ótima para o crescimento de *F. verticillioides* situa-se entre 22,5 e 27,5°C, sendo a mínima entre 2,5 e 5,0°C e a máxima entre 32 e 37°C, devendo-se ressaltar que existem variações marcantes entre os isolados, e alguns não crescem abaixo de 6°C e acima de 30°C (BACON; NELSON, 1994).

2.2 FUMONISINAS

As micotoxinas constituem um conjunto complexo de metabólitos secundários produzidos por fungos com efeitos tóxicos relevantes em seres humanos, animais e plantas (BENNETT; RICHARD, 1994; RITIENI et al., 1997). No contexto de segurança alimentar, embora presentes em baixas concentrações, as micotoxinas são responsáveis por grandes perdas econômicas no setor agrícola, pecuário, muitas vezes expondo o consumidor final a riscos inerentes aos efeitos tóxicos destas substâncias (PLACINTA; D'MELLO; MACDONALD, 1999).

A contaminação por micotoxinas atinge 25% do suprimento alimentar mundial, constituindo-se no grupo de compostos tóxicos mais frequentes em cereais e

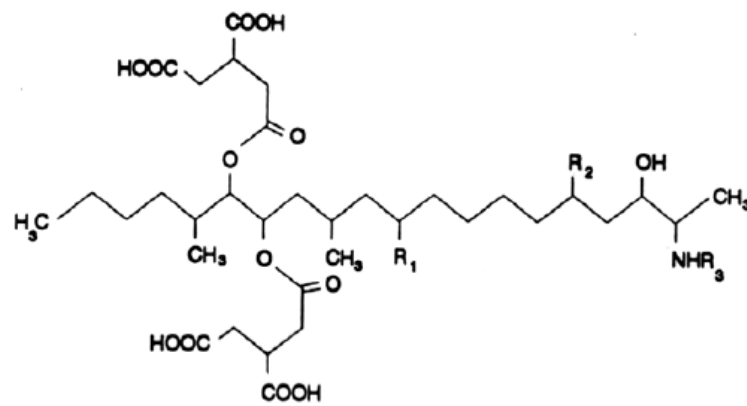
sementes oleaginosas. Os fungos toxigênicos envolvidos na cadeia alimentar pertencem principalmente aos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*. Fumonisinias, aflatoxinas e zearalenona representam as micotoxinas freqüentemente produzidas no campo e/ou na estocagem (ABOUZIED; PESTKA, 1994).

Fumonisinias são metabólitos secundários produzidos principalmente por *F. verticillioides* (GELDERBLOM et al., 1988; BEZUIDENHOUT et al., 1988) e *F. proliferatum* (ROSS et al., 1990). No entanto, outras espécies do gênero *Fusarium* também são produtoras de fumonisinias: *F. proliferatum* (ROSS et al., 1990), *F. nygamai* (THIEL; MARASAS; SYDENHAM, 1992), *F. anthophilum*, *F. dlamini*, *F. napiforme* (NELSON, 1992), *F. subglutinans* (SCOTT, 1993), *F. polyphialidicum* (ABBAS; OCAMB, 1995) e *F. oxysporum* (AH SEO; WON LEE, 1999).

Quimicamente, as fumonisinias são aminopolióis, consistem de diésteres de propano-1-2-3-ácido tricarbóxico e vários 2-amino-12,16-dimetilpoliidroxieicosanos, no qual o grupo hidroxila no C₁₄ e C₁₅ é esterificado com o grupo carboxila terminal do ácido tricarbóxico. Desde sua descoberta em 1988, foram caracterizados 28 análogos que podem ser classificados em quatro principais grupos denominados de fumonisinias das séries A, B, C e P (MUSSER; PLATTNER, 1997; RHEEDER; MARASAS; VISMER, 2002). Dentre os vários análogos, FB₁, FB₂ e FB₃ ocorrem como contaminantes naturais de milho e derivados, sendo a FB₁ a mais tóxica e mais abundante, compreendendo de 60 a 90% das fumonisinias totais encontradas (PIÑEIRO et al., 1997).

As fumonisinias da série A são amidas (Figura 1), enquanto que as da série B têm uma amina livre (LEESON; DIAZ; SUMMERS, 1995).

As fumonisinias são compostos fortemente polares, solúveis em água, apresentando maior solubilidade em acetonitrila-água ou metanol e insolúveis em solventes orgânicos apolares (LEESON; DIAZ; SUMMERS, 1995).



Fumonisina	R ₁	R ₂	R ₃
B ₁	OH	OH	H
B ₂	H	OH	H
B ₃	OH	H	H
B ₄	H	H	H
A ₁	OH	OH	CH ₂ CO
A ₂	H	OH	CH ₂ CO

Figura 1 – Estrutura química das principais fumonisinas.

Fonte: Diaz e Boermans (1994)

Os problemas e os riscos associados à contaminação de alimentos e rações por fumonisinas resultaram no desenvolvimento de metodologias precisas, confiáveis e sensíveis para a determinação dessas micotoxinas em milho e derivados (SHEPHARD, 1998).

Os métodos analíticos para determinação de fumonisinas incluem as técnicas de cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia gasosa / espectrometria de massas (GC/MS) (DIAZ; BOERMANS, 1994).

A análise de fumonisinas por CLAE requer uma etapa de pré-limpeza, com o intuito de remover os contaminantes e concentrar as fumonisinas. Essa etapa pode ser realizada por meio de extração em fase sólida (SPE) sobre fase reversa (C18), coluna de troca aniônica forte (SAX), ou por colunas de imunoafinidade. As colunas SAX proporcionam pré-limpeza superior, quando comparadas às colunas de fase reversa. Entretanto, deve haver monitoramento do pH do extrato e controle cuidadoso da eluição (SHEPHARD, 1998).

O primeiro relato sobre a ocorrência de fumonisinas em rações brasileiras associadas a surtos de micotoxicoses em diversas espécies animais foi realizado por SYDENHAM et al. (1992). A análise de 22 amostras de ração demonstrou positividade para FB₁ em 20 amostras e FB₂ em 18 amostras, em níveis variando de 0,2 a 38,5 µg/g e de 0,1 a 12,0 µg/g, respectivamente.

Yamaguchi et al. (1992) analisaram 39 lotes de milho colhidos na safra de 1990 e 1991, provenientes de quatro regiões produtoras no Estado do Paraná. As FB₁ e FB₂ foram detectadas em 97,4% e 4,8% das amostras, respectivamente, sendo que os níveis variaram, conforme a região, de 0,6 a 12,6 µg/g para FB₁ e não detectado a 10,4µg/g para FB₂.

Hirooka et al. (1996) analisaram 48 amostras de milho do Estado do Paraná e nove do Mato Grosso do Sul e Goiás, colhidas entre 1990 e 1991. As fumonisinas foram detectadas em todas as amostras colhidas no Paraná, com níveis que variavam, de acordo com a região, de 3,25 a 4,79µg/g de FB₁ e 2,34 a 3,45µg/g para FB₂. Com exceção de uma amostra proveniente do Estado de Goiás, as outras provenientes da região Central do Brasil também estavam contaminadas em média com 5,45 de µg/g FB₁ e 5,0µg/g de FB₂.

No Rio Grande do Sul, Mallmann et al. (1997) analisando 169 amostras de alimentos entre os anos de 1996 e 1997 detectaram fumonisinas em 47,1% das amostras de milho, com concentração média de 8,4µg/g.

Estudos realizados por ORSI et al. (2000) mostraram a ocorrência natural de fumonisinas em 195 amostras de híbridos de milho no Estado de São Paulo, sendo 90,2% positivas para FB₁ e 97,4% para FB₂. Os índices médios de contaminação foram de 9,72µg/g de FB₁ e 7,67µg/g de FB₂.

A análise de FB₁ em 315 amostras de cereais e 92 amostras de rações coletadas de diferentes granjas e indústrias agropecuárias do Sul do Brasil demonstraram positividade em 32% das amostras com níveis variando de 0,086 a 78,92 µg/g de FB₁ (MALLMANN et al., 2001).

Fumonisinias ingeridas por meio de ração contaminada podem induzir uma variedade de respostas em animais, incluindo neuro, nefro e hepatotoxicidade, podendo conduzir à morte (NELSON, 1992; GELDERBLUM et al; 1992). Desde a sua identificação, as fumonisinas têm sido associadas principalmente com duas doenças animais, a leucoencefalomalácia eqüina e o edema pulmonar suíno (ROSS et al., 1990). Entretanto, lesões hepáticas graves são observadas em aves, ratos, suínos e eqüinos, assim como lesões pancreáticas em suínos (DIAZ; BOERMANS, 1994). Em seres humanos, estudos epidemiológicos indicam a associação do consumo de milho contaminado com fumonisinas

com o câncer esofágico na África do Sul, China e outros países, onde este cereal constitui o elemento básico da dieta (MARASAS et al., 1981).

Segundo Wang et al. (1991), a FB₁ interfere na biossíntese de esfingolípídeos, devido à similaridade estrutural entre as moléculas de FB₁ com o complexo amino álcool esfingosina, que é constituinte dos trinta ou mais aminoálcoois de cadeia longa encontrados nos esfingolípídeos de várias espécies (figura 2). A fim de testar a hipótese de que a fumonisina age alterando a biossíntese de esfingolípídeos (figura 3), Wang et al. (1991) examinaram os efeitos da FB₁ sobre a capacidade de hepatócitos de ratos converterem serina marcada ¹⁴C em esfingolípídeos. A FB₁ inibiu a biossíntese “de novo” de esfingolípídeos com uma K₅₀ de 0,1 μM, que poderia ser atingida pelo consumo de milho naturalmente contaminado.

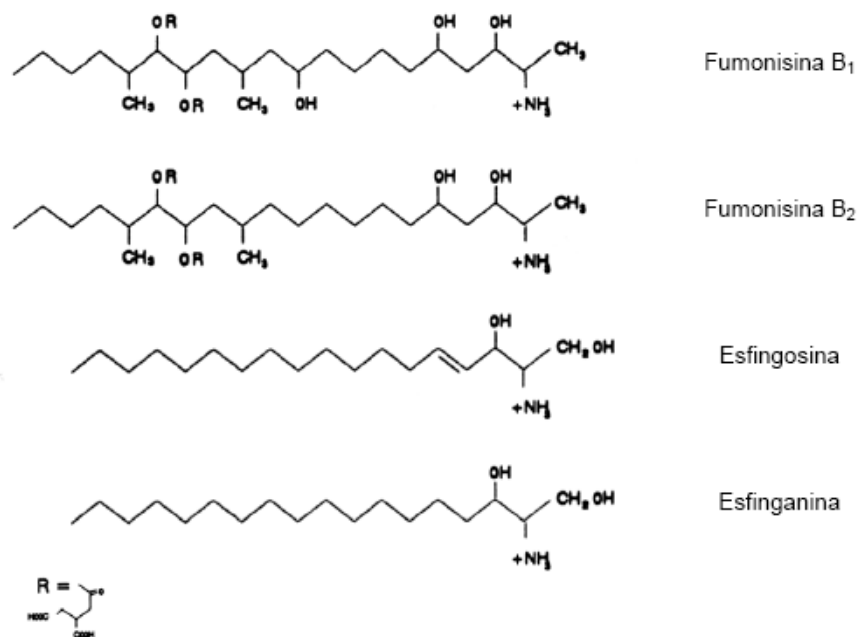


Figura 2 – Estrutura molecular das fumonisinas B₁ e B₂, esfinganina e esfingosina.

Fonte: DIAZ, BOERMANS, 1994.

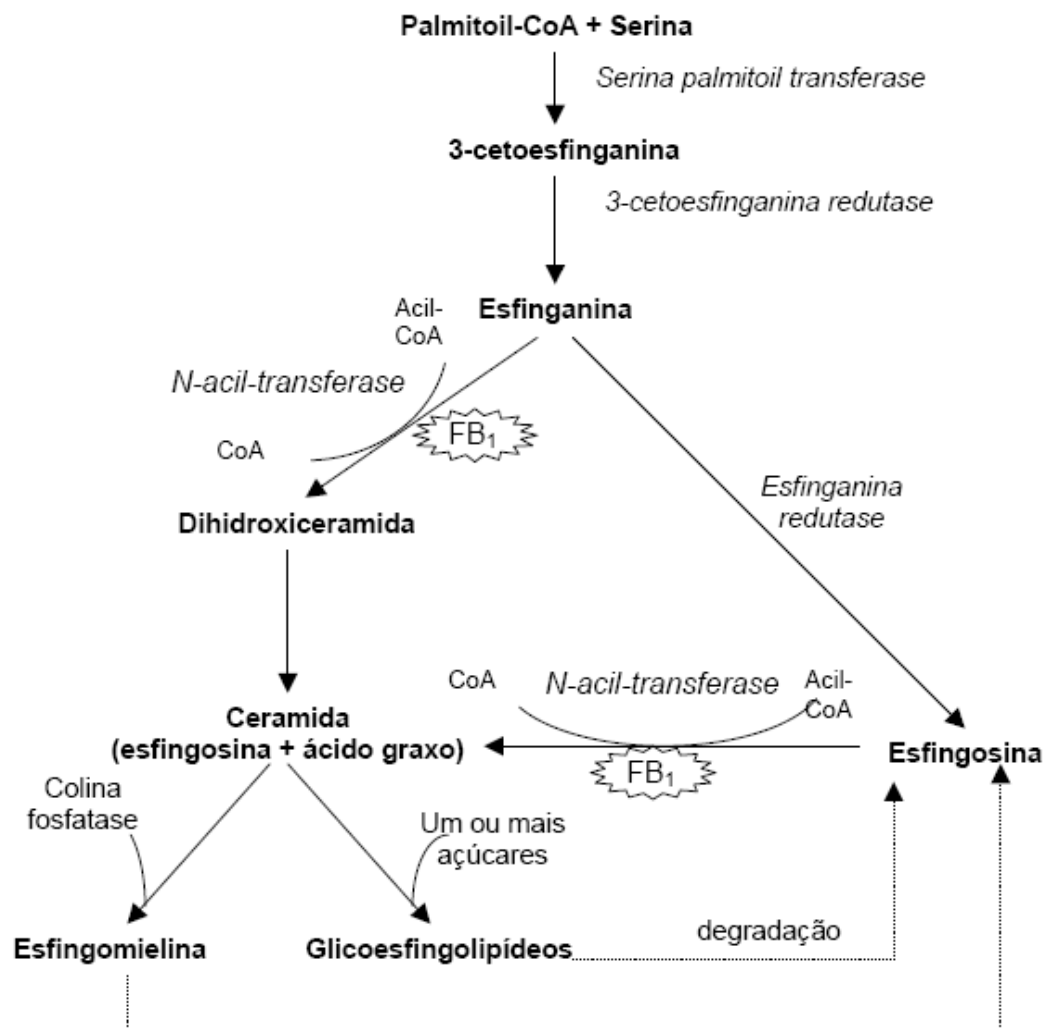


Figura 3 – Mecanismo proposto de ação tóxica das fumonisinas.

Fonte: Diaz e Boermans (1994)

A incubação de hepatócitos de ratos com a FB_1 inibiu a incorporação do ^{14}C marcado na estrutura molecular da esfingosina. Essa mesma inibição também foi observada quando os hepatócitos foram incubados com a FB_2 . Além disso, a FB_1 causou um aumento na concentração da molécula intermediária do ciclo, a esfinganina, sugerindo que a FB_1 inibe a conversão da esfinganina em diidroxiceramida, reação catalisada pela ação da enzima N-acil-transferase. A biossíntese de outros fosfolipídios, que contêm serina não foi afetada pela presença das fumonisinas, indicando que as fumonisinas atuam especificamente na biossíntese de esfingolipídeos (WANG et. al., 1991).

As fumonisinas não são destruídas pelo processamento comum dos alimentos. Além disso, ainda não existem tecnologias disponíveis para assegurar que todos os

alimentos e gêneros alimentícios sejam completamente isentos de fumonisinas (MUNKVOLD; DESJARDINS, 1997).

Embora os limites legais para as fumonisinas não tenham sido estabelecidos, o “Mycotoxin Committee of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians” recomenda os níveis máximos de 5, 10, 50 e 50 µg/g para rações de eqüinos, suínos, bovinos e aves, respectivamente (MUNKVOLD; DESJARDINS, 1997). A Suíça recomenda o limite de 1 µg/g para derivados de milho destinados ao consumo humano (VISCANTI; BOENKE, 1995). A “Food and Drug Administration” (FDA) recomenda o limite máximo de 1, 10, 15, 30 e 50 µg/g para ração de eqüinos, suínos, vacas leiteiras, bovinos e aves, respectivamente e para o consumo humano, o nível máximo de 2,0 µg/g de fumonisinas (FB₁ + FB₂ + FB₃) para farelos de milho, 3,0 µg/g para milho pipoca e 4,0 µg/g para milho destinado à produção de massas (AVANTAGGIATO; QUARANTA; DESIDERIO, 2002).

2.3 MEIOS DE CULTIVO PARA PRODUÇÃO DE FUMONISINAS

A maioria dos estudos relativos à produção de fumonisinas tem sido efetuada em substratos naturais e pouco se conhece sobre a produção de fumonisinas em meios sintéticos ou semi-sintéticos (JIMÉNEZ et al., 2003).

As concentrações de fumonisinas obtidas pelo cultivo de *F. verticillioides* em substratos naturais (meios sólidos) são mais altas. HINOJO et al. (2006) avaliaram a produção de fumonisinas por *F. verticillioides* em culturas de arroz sob diferentes condições de incubação e relataram maior produção de fumonisinas (3550 µg/g de FB₁) pela cepa Gf2 a 28°C e atividade de água (a_w) de 0,98.

Avaliando a interação de condições atmosféricas modificadas com a produção de fumonisinas por cepas de *Fusarium* spp. em milho, Samapundo et al. (2007) verificaram maior produção de fumonisinas em 0,984 de a_w e 0% de CO₂ inicial para *F. proliferatum* (7694 µg/g de FB₁) e *F. verticillioides* (381 µg/g de FB₁).

Marín et al. (1999) avaliando a produção de fumonisinas por *F. verticillioides* e *F. proliferatum* detectaram 2019,2 µg/g, 3,5 µg/g e 1,5 µg/g de FB₁ em cultura de milho, trigo e cevada, respectivamente.

Apesar de a produção de fumonisinas ser mais alta em substratos naturais (meios sólidos), a extração e purificação requerem várias etapas e a utilização de solventes

tóxicos. Além disso, a maioria dos métodos utiliza meios complexos, que dificultam a análise das vias biossintéticas e mecanismos de controle. Os métodos de cultivo líquido podem eliminar muitos dos problemas associados com a produção de fumonisinas em cultura sólida. Os meios de cultivo líquidos apresentam vantagens por reduzirem a necessidade de solventes orgânicos durante a extração e purificação, uma vez que as fumonisinas são encontradas no extrato livre de células. Portanto, o material de cultivo pode ser extraído por filtração e as fumonisinas podem ser analisadas por qualquer método analítico. Adicionalmente, as técnicas de cultivo líquido, particularmente com meio definido, têm a vantagem adicional de prover meios convenientes para o estudo do metabolismo e da bioquímica envolvida na produção de fumonisinas (KELLER; SULLIVAN, 1996).

Os dados relatados na literatura indicam que a qualidade e os níveis dos nutrientes presentes no substrato desempenham um papel importante na produção de fumonisinas por *Fusarium verticillioides* (JIMÉNEZ et al., 2003).

A razão C (carbono)/N (nitrogênio) desempenha um papel importante na regulação da via biossintética de fumonisinas. Alguns autores têm sugerido que o quociente C/N influencia na quantidade de fumonisinas sintetizada (BRANHAM; PLATTNER, 1993), assim como nos níveis de crescimento fúngico. Portanto, um aumento no valor desse quociente leva a uma diminuição na produção da biomassa fúngica e a um aumento na produção de toxina, enquanto que uma diminuição no quociente apresenta um efeito oposto. JIMÉNEZ et al. (2003) demonstraram um aumento na produção de fumonisinas com o aumento da fonte de carbono no meio, independente do açúcar usado e uma diminuição muito acentuada quando o nível dos aminoácidos serina, treonina, ácido glutâmico, valina e alanina foi aumentado de 1 para 10g/L, sendo que nessa última concentração a produção de fumonisina foi praticamente nula.

A adição de um dos aminoácidos ou carboidratos utilizados nesse estudo a um meio de cultivo contendo somente sais minerais e água não induziu crescimento fúngico, independente da concentração e do isolado de *F. verticillioides*, indicando que o extrato de malte, extrato de levedura ou peptona micológica são requeridos no meio de cultivo básico para permitir o crescimento fúngico (JIMÉNEZ et al., 2003).

A respeito da biomassa fúngica há uma clara correlação entre o desenvolvimento do fungo e a concentração de aminoácido presente no meio. Portanto, o meio adicionado de 10 g/L de qualquer aminoácido produziu um melhor desenvolvimento micelial do que aqueles adicionados de 1g/L. Entretanto, baixos níveis de crescimento fúngico estão relacionados à maior produção de fumonisinas, sugerindo que um estado de estresse

produzido pela exaustão de certos nutrientes nitrogenados poderia causar um pico na produção de fumonisinas. Após 14 dias, a biossíntese de FB₁ foi observada só ocasionalmente, mesmo quando o meio líquido era rico em ingredientes nutritivos (JIMÉNEZ et al., 2003).

Experimentos realizados com alanina marcada em vários radicais revelaram que esse aminoácido é incorporado diretamente e não via degradação a outra molécula precursora (PLATTNER; BRANHAM, 1993) e quando adicionada ao meio na concentração de 1g/L forneceu níveis relativamente maiores de FB₁ e FB₂ (BRANHAM; PLATTNER, 1993; JIMÉNEZ et al., 2003).

Plattner e Shackelford (1992) por meio de experimentos com suprimento de isótopos demonstraram que os grupos metil dos carbonos 21 e 22 da FB₁ são derivados do grupo S-metil da metionina e que a adição de metionina e alanina reduziram acentuadamente a produção de FB₁.

Existem poucas informações sobre a influência dos nutrientes presentes no meio de cultura na biossíntese de fumonisina, sendo que, somente a participação de alguns aminoácidos nas etapas de biossíntese de fumonisinas tem sido estudada (PLATTNER; SHACKELFORD, 1992; BRANHAM; PLATTNER, 1993; BLACKWELL; MILLER; SAVARD, 1994).

Keller e Sullivan (1996) avaliando o efeito de níveis de carbono, nitrogênio e fosfato em meio de cultivo líquido definido relataram que a glucose e fosfato não reprimem a produção de FB₁. Keller; Sullivan e Chirtel (1997) demonstraram que o oxigênio é um parâmetro importante e que a limitação de nitrogênio e pH ácido (3,0 – 4,0) pode maximizar a produção de FB₁. Significativamente, a produção de FB₁ está correlacionada com a exaustão do nitrogênio do meio de cultivo (KELLER; SULLIVAN, 1996) sugerindo que a produção de FB₁ é reprimida pelo nitrogênio (SHIM; WOLOSHUK, 1999).

Quando conídios de *G. fujikuroi* foram inoculados em meio líquido definido com 10 mM de fosfato de amônio como única fonte de nitrogênio, a produção de FB₁ foi detectada entre 72 e 120h. Após a adição de fosfato de amônio em culturas de 96h, a concentração de FB₁ (8 µg/mL) não aumentou durante as próximas 50h. Em contraste, a produção de FB₁ nas culturas controle dobrou durante o mesmo período de tempo (SHIM; WOLOSHUK, 1999).

A adição de fosfato de amônio, glicina ou glutamina a culturas de *G. fujikuroi* produzindo ativamente FB₁ reprimiram a posterior produção da micotoxina (SHIM; WOLOSHUK, 1999). Esses dados suportam os dados de Keller e Sullivan (1996) que

mostraram uma correlação entre a exaustão de amônio e o aumento de FB₁ no meio de cultivo. Esses autores também sugeriram que a produção de FB₁ não ocorre até que a concentração de amônio nas culturas diminua abaixo de 35 a 20 mM. Dados de Shim e Woloshuk (1999) indicaram que 10 mM de fosfato de amônio podem reprimir a produção de FB₁ por 75 horas, sugerindo que a diminuição acontece em concentrações muito mais baixas.

A avaliação do efeito do tamanho do inóculo na produção de FB₁ não demonstrou diferença significativa durante o período de 10 dias de incubação. Uma observação interessante desse estudo foi que a adição de fosfato de amônio ao milho inibiu drasticamente (97%) a produção de FB₁ por 3 semanas (SHIM; WOLOSHUK, 1999).

O pH e a aeração mostraram ter um efeito intenso no crescimento fúngico e na produção de fumonisinas. A melhor faixa de pH para a produção de FB₁ foi entre 3,0 e 4,0, podendo exceder 1000 ppm tendo aeração suficiente durante os primeiros períodos de crescimento (KELLER; SULLIVAN; CHIRTEL, 1997).

O grau de aeração durante o estudo de crescimento em frascos agitados afetou não só a produção de fumonisina, mas a biomassa e o consumo de glucose. A produção de biomassa fúngica, estimada por peso seco, é maior em cultivos com pH inicial mais alto e diminui com a diminuição do pH inicial. Os frascos com maior aeração forneceram resultados médios maiores de biomassa e de FB₁ do que aqueles com pouca aeração, entretanto a quantidade de glucose consumida pelas culturas crescidas em frascos com menos aeração foi maior em relação àqueles com muita aeração (KELLER; SULLIVAN; CHIRTEL, 1997).

Branham; Plattner (1993) relataram produção de 20,8 µg/mL de FB₁ em cultivo estático, enquanto sob agitação os níveis de FB₁ alcançaram 159 a 240 µg/mL.

Considerando que as concentrações de fumonisinas obtidas em cultura líquida são relativamente baixas, mais estudos tornam-se fundamentais para o aperfeiçoamento da metodologia (KELLER; SULLIVAN, 1996).

O número reduzido de estudos sobre a influência dos nutrientes na biossíntese de fumonisinas dificulta a compreensão do perfil metabólico dos diferentes isolados em relação à fonte de C e N e suas implicações na biossíntese dessas micotoxinas (JIMÉNEZ et al., 2003).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a produção de fumonisinas em diferentes fontes de carbono e nitrogênio por *Fusarium verticillioides* em meios de cultivo líquido.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a biomassa produzida pelas cepas de *F. verticillioides* nos diferentes meios de cultivo líquidos.
- Determinar a concentração de açúcares redutores no extrato livre de células.
- Quantificar as fumonisinas produzidas pelas cepas de *F. verticillioides* nos diferentes meios de cultivo líquidos.
- Avaliar a produção de fumonisinas por *F. verticillioides* em diferentes concentrações de carbono e nitrogênio.
- Avaliar a influência de diferentes fontes de carbono e nitrogênio combinadas na produção de fumonisinas por *F. verticillioides*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CULTURAS FÚNGICAS

Foram utilizadas cinco cepas de *Fusarium verticillioides* (103F, 103Br, 113B, 97K e 119B), gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Elisa Yoko Hirooka (Depto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Londrina – PR).

4.2 MEIOS DE CULTURA

A melhor condição para a produção de fumonisinas foi determinada a partir do cultivo de *F. verticillioides* 103F em 3 diferentes meios de cultura. Os critérios de seleção desses meios foram: meio líquido complexo, meio líquido definido com fonte principal de nitrogênio orgânica e meio líquido definido com fonte principal de nitrogênio inorgânica. Esta cepa (103F) foi selecionada por ser um dos maiores produtores de fumonisinas em cultivo de milho triturado. Após o cultivo de *F. verticillioides* 103F em ágar batata dextrose (BDA) a 28°C por 7 dias, uma suspensão de esporos (10^7 esporos/mL) foi preparada em solução de Tween 80 0,1% em água destilada estéril (v/v). Alíquotas de 1 mL da suspensão de esporos foram transferidas para Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultura com pH ajustado para 3,7 (KELLER; SULLIVAN; CHIRTEL, 1997). Os cultivos foram incubados a 28°C (HINOJO et al., 2006) em condição agitada (180 rpm) (KELLER; SULLIVAN; CHIRTEL, 1997) por 15 dias. Os cultivos foram filtrados a vácuo em papel de filtro Whatman n.º 1.

4.2.1 Meio de cultura líquido complexo (MORISSEAU et al., 1999).

Constituintes	Concentração
Glucose	20,7 g/L
Glicina	0,75 g/L
NaCl	0,1 g/L
K ₂ HPO ₄	1,31 g/L
CaCl ₂	0,13 g/L
Ácido málico	0,69 g/L
Extrato de levedura	0,5 g/L
MgSO ₄	0,5 g/L

4.2.2 Meio de cultura líquido com fonte orgânica de nitrogênio (KELLER; SULLIVAN; CHIRTEL, 1997).

Constituintes	Concentração
Glucose	90 g/L
Glicina	2 g/L
KH ₂ PO ₄	1 g/L
K ₂ HPO ₄	1 g/L
MnSO ₄	16 mg/L
CaCl ₂	0,4 g/L
MgSO ₄	0,3 g/L
ZnSO ₄	32 mg/L
FeSO ₄	100 mg/L
Tiamina	1 mg/L
Riboflavina	1 mg/L
Pantotenato	1 mg/L
Niacina	1 mg/L
Piridoxina	1 mg/L
Ácido Tiótico	1 mg/L
Ácido Fólico	100 µg/L
Biotina	100 µg/L
B ₁₂	100 µg/L

4.2.3 Meio de cultura líquido com fonte inorgânica de nitrogênio (KELLER; SULLIVAN, 1996).

Constituintes	Concentração
Glucose	90 g/L
(NH ₄)SO ₄	3,5 g/L
KH ₂ PO ₄	0,1 g/L
K ₂ HPO ₄	0,1 g/L
MnSO ₄	16 mg/L
CaCl ₂	0,4 g/L
MgSO ₄	0,3 g/L
Tiamina	1 mg/L
Riboflavina	1 mg/L
Pantotenato	1 mg/L
Niacina	1 mg/L
Piridoxina	1 mg/L
Ácido Tiótico	1 mg/L
Ácido Fólico	100 µg/L
Biotina	100 µg/L
B ₁₂	100 µg/L

O meio de cultura que proporcionou a produção de maior concentração de fumonisinas foi selecionado para avaliação da produção desta micotoxina pelas cepas 103BR, 113B e 103F de *F. verticillioides* em diferentes combinações de fontes de carbono e nitrogênio (Tabela 1) na concentração de 20 g/L e 1 g/L, respectivamente.

Tabela 1 – Meios de cultura com diferentes combinações de fontes de carbono e nitrogênio.

Ensaio	Fonte de C/N
1	glucose/leucina
2	glucose/alanina
3	frutose/leucina
4	frutose/alanina
5	glucose/valina
6	maltose/alanina
7	frutose/valina
8	maltose/leucina
9	maltose/valina

Posteriormente, a cepa que produziu maior concentração de fumonisinas foi selecionada para avaliar a produção desta toxina em diferentes concentrações da combinação da fonte de carbono e nitrogênio selecionada. As concentrações analisadas foram 20 e 40 g/L da fonte de carbono (carboidrato) e 1 e 2 g/L da fonte de nitrogênio (aminoácido).

As cepas 97K, 119B e 103F de *Fusarium verticillioides* foram avaliadas em relação à produção de fumonisinas em diferentes fontes combinadas de carbono (glucose, maltose e frutose) e nitrogênio (alanina e glicina).

4.3 DETERMINAÇÃO DE PH

O pH final do cultivo foi determinado por potenciômetro.

4.4 DETERMINAÇÃO DE BIOMASSA

A determinação de biomassa foi realizada por gravimetria a 70° C até obtenção de peso constante.

4.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES

A concentração de açúcares redutores no extrato livre de células foi determinada segundo a metodologia de SOMOGYI (1945) - NELSON (1944), utilizando glucose como padrão. As leituras foram realizadas a 540 nm em espectrofotômetro (FEMTO 600 plus).

4.6 DETERMINAÇÃO DE FUMONISINAS

O extrato livre de células (1 mL) foi diluído em 1 mL de metanol:água (3:1, v/v) e aplicado em uma coluna de troca aniônica Sep Pak accell plus QMA previamente acondicionada com metanol:água (3:1, 6 mL), seguido de metanol (3 mL), sendo as fumonisinas eluídas com 10 mL de ácido acético 0,5% em metanol. O eluato foi seco sob fluxo de nitrogênio gasoso a 45°C, o resíduo dissolvido em metanol:água (3:1, 800µL) e uma alíquota de 200 µL foi seca em nitrogênio gasoso a 45°C. Essa alíquota foi então derivatizada com 200 µL de reagente O-ftaldialdeído (40 mg de OPA, 1 mL de metanol, 5 mL de borato de sódio 0,1M e 50 µL de 2-mercaptoetanol). As fumonisinas foram analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), sistema isocrático de fase reversa Shimadzu consistindo de bomba 10AT e detector de fluorescência RF 10A XL, utilizando uma coluna Shim-pack CLC-ODS (M) (4,6 x 250mm). Os comprimentos de onda de excitação e emissão foram 335nm e 450nm, respectivamente. A fase móvel consistiu de CH₃OH:NaH₂PO₄ 0,1 mol/L (80:20, v/v) ajustada a pH 3,3 com ácido *o*-fosfórico. O fluxo foi de 1 mL/min (SHEPHARD et al., 1990 modificado por UENO et al., 1993).

4.7 CÁLCULO DOS EFEITOS PRINCIPAIS E DE INTERAÇÃO

O cálculo do efeito principal da concentração de carbono e da concentração de nitrogênio na produção de fumonisinas foi realizado por meio da fórmula:

$EP = [(y^{++} - y^{+-}) + (y^{+-} - y^{--})]/2$, onde y corresponde à média dos efeitos individuais da medida, (+) e (-) corresponde ao nível alto e nível baixo, respectivamente (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2003).

O cálculo do efeito de interação da concentração de carbono com a de nitrogênio na produção de fumonisinas foi realizado por meio da fórmula:

$EI = [(y^{+++} + y^{--}) - (y^{++} + y^{--})]/2$, onde y corresponde a média dos efeitos individuais, (+) e (-) corresponde ao nível alto e nível baixo, respectivamente (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2003).

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A produção de biomassa, fumonisinas, pH final e consumo de açúcar foram submetidos à análise de variância (ANOVA) fatorial e comparação múltipla de médias pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). A análise foi realizada utilizando o software STATISTICA versão 6.1 (Statsoft Inc., Tulsa, USA).

Parte dos resultados deste trabalho está apresentada na forma de artigos científicos, sob os títulos:

“Avaliação de fontes de carbono e nitrogênio na produção de fumonisinas por *F. verticillioides* em meio líquido definido”

O objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de fumonisinas por 3 cepas de *F. verticillioides* em 9 diferentes combinações de fontes de carbono e nitrogênio em cultivos líquidos, assim como o efeito da concentração de carbono, nitrogênio e a interação destes na produção de fumonisinas pela cepa 103F de *F. verticillioides*.

“Fatores que afetam a produção de fumonisinas por *Fusarium verticillioides* em meio líquido definido: tempo de cultivo, carboidratos e aminoácidos”

Neste trabalho foram avaliados o tempo de cultivo, seis diferentes meios de cultivo líquido contendo diferentes combinações de carboidratos e aminoácidos e o efeito da razão C/N na produção de fumonisinas.

Parte dos resultados não foi incluída nos artigos e será discutida a seguir.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 SELEÇÃO DO MEIO DE CULTURA

A cepa 103F de *Fusarium verticillioides* foi submetida à análise da produção de fumonisinas em três diferentes meios de cultura líquidos (complexo, com fonte orgânica de nitrogênio e com fonte inorgânica de nitrogênio) visando selecionar o melhor meio de cultura para produção de fumonisinas.

Na tabela 2 está apresentada a produção de biomassa e fumonisinas por *F. verticillioides* 103F nos três diferentes meios de cultura.

Tabela 2 – Produção de biomassa e fumonisina por *Fusarium verticillioides* 103F em 3 diferentes meios de cultura.

<i>Fusarium verticillioides</i> 103F		
Meio de cultura	Biomassa (g)	FB ₁ (µg/mL)
Complexo	0,52	2,7
Definido com fonte orgânica de nitrogênio	0,34	4,5
Definido com fonte inorgânica de nitrogênio	0,88	1,4

A produção de biomassa variou de 0,34 g a 0,88 g e a produção de fumonisinas de 1,4 µg/mL a 4,5 µg/mL em meios de cultivo definido com fonte inorgânica de nitrogênio e fonte orgânica de nitrogênio, respectivamente, sendo essa produção inversamente proporcional à de biomassa.

O meio com fonte orgânica de nitrogênio proporcionou a produção de maiores concentrações de fumonisinas por *Fusarium verticillioides* 103F, sendo esse meio selecionado para os experimentos posteriores.

Na figura 4 está apresentado um cromatograma obtido da análise de fumonisinas do meio de cultivo B pela cepa 103F por CLAE.

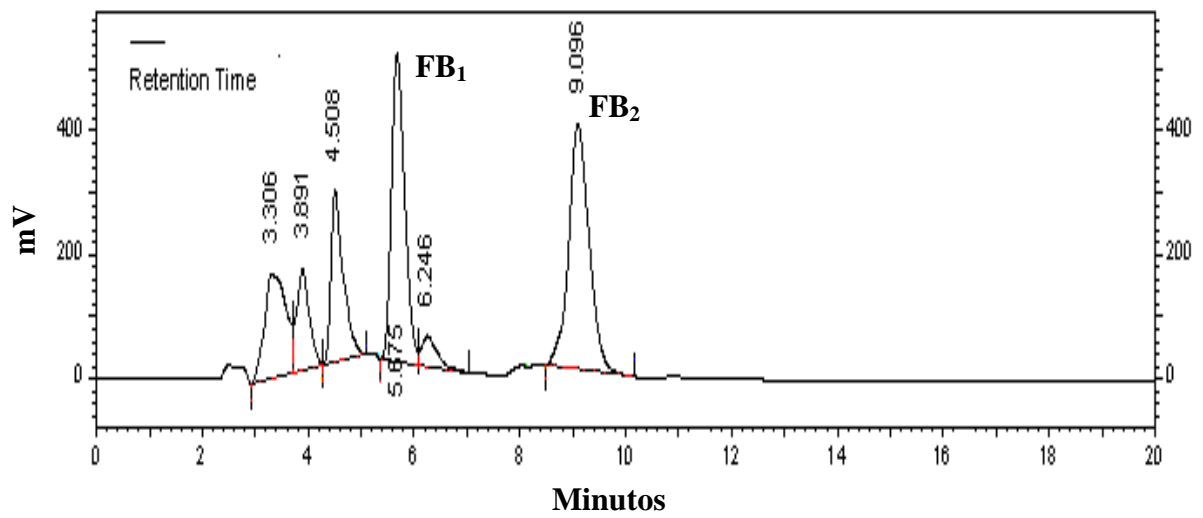


Figura 4 – Cromatograma obtido da análise de fumonisinas produzidas por *Fusarium verticillioides* 103F cultivada no meio líquido definido com fonte orgânica de nitrogênio por CLAE.

Avaliação de fontes de carbono e nitrogênio na produção de fumonisinas por *F. verticillioides* em meio líquido definido

Resumo

Fusarium verticillioides Sacc. Nirenberg (= *F. moniliforme* Sheldon) é um patógeno primário do milho e principal produtor de fumonisinas. Embora a produção de fumonisinas pelo cultivo de *F. verticillioides* em substratos naturais (meios sólidos) seja maior, a extração e purificação requerem várias etapas e utilização de solventes tóxicos. Os meios de cultura líquidos apresentam vantagens por reduzirem a necessidade de solventes orgânicos, além de possibilitar o estudo do metabolismo e do processo biossintético de fumonisinas. Considerando que a qualidade e a concentração de nutrientes no substrato apresentam papel importante na produção de fumonisinas, este trabalho teve como objetivo avaliar a produção de fumonisinas por *F. verticillioides* em cultivo líquido com diferentes fontes de carbono e nitrogênio. Três cepas (103F, 113B e 103BR) foram inoculadas em nove meios de cultivo líquido com diferentes fontes de carbono (glucose, frutose e maltose) na concentração de 20 g/L e nitrogênio (leucina, alanina e valina) na concentração de 1 g/L. Após a seleção da cepa (103F) e fonte de carbono/nitrogênio (maltose/leucina) que proporcionaram maior produção de fumonisinas, foram preparados meios variando as concentrações de maltose e leucina. Fixando a concentração de leucina em 1 g/L e aumentando a concentração de maltose de 20 g/L para 40 g/L ocorreu um aumento na produção de fumonisinas de 3,9 µg/mL para 4,7 µg/mL. Por outro lado, fixando a concentração de maltose em 40 g/L e diminuindo a concentração de leucina em 50% (de 2 g/L para 1 g/L) ocorreu um aumento na produção de fumonisinas de 2,28 µg/mL para 4,7 µg/mL. A produção de fumonisinas variou de acordo com a cepa de *F. verticillioides*, concentração e fonte de carbono/nitrogênio no meio líquido.

Palavras-chave: Fumonisinas. Aminoácidos. Carboidratos. Meio líquido definido.

Abstract

Fusarium verticillioides Sacc. Nirenberg (= *F. moniliforme* Sheldon) is a primary corn pathogen and the main fumonisin producer. Although fumonisin production by *F. verticillioides* on the natural substratum (solid culture) is high, the extraction and purification require several steps and use of toxic solvents. The liquid culture medium has advantages by reducing the need of organic solvents and enabling the study of the metabolism and the biosynthesis of fumonisins. Considering that the nutrient quality and the concentration in the culture medium have important role in fumonisin production, the aim of this study was to evaluate the fumonisin production by *F. verticillioides* in the liquid culture medium with different sources of carbon/nitrogen. Three strains (103F, 113B and 103BR) were inoculated in nine liquid culture media with different carbon sources (glucose, fructose and maltose) in the concentration of 20 g/L and nitrogen (leucine, alanine and valine) in the concentration of 1 g/L. After the selection of the strain (103F) and carbon/nitrogen sources (maltose/leucine) that provided the highest fumonisin production, culture media with different maltose and leucine concentrations were prepared. Keeping the leucine concentration in 1 g/L and increasing the maltose concentration from 20 g/L to 40 g/L, the fumonisin production increased from 3.9 µg/mL to 4.7 µg/mL. On the other hand, keeping the maltose concentration in 40 g/L and decreasing the leucine concentration in 50% (from 2 g/L to 1 g/L) the fumonisin production increased from 2.28 µg/mL to 4.7 µg/mL. Fumonisin production varied according to the *F. verticillioides* strain, concentration and carbon/nitrogen source in the liquid culture medium.

Keywords: Fumonisin. Amino acids. Carbohydrates. Defined liquid culture medium.

Introdução

O Brasil é o terceiro produtor mundial de milho, com uma produção anual de 42,3 milhões de toneladas, sendo que o Estado do Paraná é responsável por 26% da produção nacional (DUARTE, 2006).

O fungo *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg (= *Fusarium moniliforme* Sheldon) é um patógeno primário de milho que produz várias micotoxinas, incluindo fumonisinas, moniliformina, fusariocina C e fusarona C (BULLERMAN, 1996; SHIER; ABBAS; BADRIA, 1997; KERÉNYI et al., 1999; GLENN et al., 2001).

As fumonisinas são metabólitos secundários tóxicos produzidos principalmente por *F. verticillioides* e *F. proliferatum* (GELDERBLOM; JASKIEWICZ; MARASAS, 1988; BEZUIDENHOUT et al., 1988). Embora 28 análogos tenham sido identificados (RHEEDER; MARASAS; VISMER, 2002), apenas as fumonisinas B₁ (FB₁), FB₂ e FB₃ ocorrem em concentrações significativas como contaminantes naturais de milho e derivados, sendo a FB₁ a mais tóxica e abundante, compreendendo de 60 a 90% das fumonisinas detectadas (SYDENHAM et al., 1991; THIEL et al., 1991).

As fumonisinas causam leucoencefalomalácia em eqüinos (MARASAS et al., 1981 e 1988), edema pulmonar em suínos (ROSS et al., 1990) e redução do desenvolvimento e imunossupressão em aves (WEIBKING et al., 1993; NAGARAJ; WU; VESONDER, 1994). Em ratos, foi comprovada a ação hepatotóxica e hepatocarcinogênica (GELDERBLOM et al., 1991).

Em seres humanos, estudos epidemiológicos indicam a associação do milho contaminado com fumonisinas com o câncer esofágico na África do Sul, China e Itália, onde este cereal constitui o elemento básico da dieta (SYDENHAM et al., 1991; CHU; LI, 1994; FRANCESCHI et al., 1990).

As concentrações de fumonisinas obtidas pelo cultivo de *F. verticillioides* em substratos naturais (meios sólidos) são mais altas, mas a extração e purificação requerem várias etapas e a utilização de solventes tóxicos (KELLER; SULLIVAN, 1996). Além disso, os métodos atuais utilizam meios complexos, que dificultam a análise das vias biossintéticas e mecanismos de controle. Por outro lado, os meios de cultura líquidos reduzem a necessidade de solventes orgânicos durante a extração e purificação, uma vez que as fumonisinas são encontradas no extrato livre de células, podendo ser

extraída por simples filtração. Considerando que as concentrações de fumonisinas obtidas em cultura líquida são relativamente baixas, mais estudos tornam-se fundamentais (KELLER; SULLIVAN, 1996).

Existem poucas informações sobre a influência dos nutrientes presentes no meio de cultura na biossíntese de fumonisina, sendo que, somente a participação de alguns aminoácidos nas etapas de biossíntese de fumonisinas tem sido estudada (PLATTNER; SHACKELFORD, 1992; BRANHAM; PLATTNER, 1993; BLACKWELL; MILLER; SAVARD, 1994).

Considerando que a qualidade e a concentração de nutrientes no meio de cultura influenciam na produção de fumonisinas, este trabalho teve como objetivo avaliar a produção de fumonisina por *F. verticillioides* em meios de cultivo líquido, com diferentes combinações de fontes de carbono e nitrogênio.

Material e Métodos

Cultura de fungos

Foram utilizadas as cepas 103F, 113B e 103BR de *F. verticillioides* isoladas a partir de rações envolvidas em intoxicação animal, cedidas gentilmente pela Dra. Elisa Yoko Hirooka (Depto. de Ciência e Tecnologia de Alimentos - UEL).

Produção de fumonisina

Uma suspensão de esporos (10^7 esporos/mL) de três cepas de *F. verticillioides* (103F, 113B e 103BR) cultivadas em ágar batata dextrose (BDA) por 7 dias a 28°C foi inoculada em nove diferentes condições de cultivo líquido a base de sais e vitaminas (50 mL) contendo 1g/L KH_2PO_4 , 1g/L K_2HPO_4 , 0,3 g/L MgSO_4 , 32 mg/mL ZnSO_4 , 100 mg/mL FeSO_4 , 16 mg/L MnSO_4 , 0,4 g/L CaCl_2 , 1 mg/L tiamina, 1 mg/L riboflavina, 1 mg/L pantotenato, 1 mg/L niacina, 1mg/L piridoxamina, 1 mg/L ácido α -lipóico (tiótico), 100 $\mu\text{g/L}$ ácido fólico, 100 $\mu\text{g/L}$ biotina, 100 $\mu\text{g/L}$ vitamina B_{12} (KELLER; SULLIVAN; CHIRTEL, 1997) com pH ajustado para 3,7. Ao meio básico foram adicionadas as fontes de carbono (20 g/L) e nitrogênio (1 g/L) combinados conforme a tabela 1. A incubação foi

realizada a 180 rpm, 28°C por 15 dias. Os meios de cultura foram filtrados em papel Whatman n° 1 sob vácuo.

Após a seleção da cepa e da condição (carbono/nitrogênio) que proporcionaram maior produção de fumonisinas foram preparados meios variando as concentrações de carbono (20 e 40 g/L) e nitrogênio (1 e 2 g/L).

(inserir tabela 1 aqui)

Análise de biomassa

A determinação de biomassa foi realizada por gravimetria a 70° C até obtenção de peso constante.

Determinação de fumonisinas

A extração de fumonisinas foi realizada misturando uma alíquota de 2 mL do filtrado com 2 mL de metanol : água (3:1, v/v). O extrato (1 mL) foi submetido à pré-limpeza em coluna de troca aniônica (Sep Pak acell plus QMA, Waters), eluído com metanol contendo ácido acético (0,5%) e seco sob fluxo de gás nitrogênio a 45°C. Após a dissolução do extrato com acetonitrila : H₂O (1 : 1), a amostra foi derivatizada com o-ftaldialdeído. A determinação de fumonisinas foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), sistema isocrático de fase reversa Shimadzu consistindo de bomba 10AT e detector de fluorescência RF 10A XL, utilizando uma coluna Shim-pack CLC-ODS (M) (4,6 x 250mm). As condições de operação foram: fluxo de 1 mL/minuto, temperatura de 25°C, detector de fluorescência com comprimento de onda de excitação e de emissão de 335nm e 450nm, respectivamente. A fase móvel consistiu de CH₃OH: NaH₂PO₄ (0,1 mol/L, 80:20, v/ v), pH 3,3 (SHEPHARD et al., 1990 modificado por UENO et al. 1993).

Cálculo dos efeitos principais e de interação

O cálculo do efeito principal da concentração de carbono na produção de fumonisinas foi realizado por meio da fórmula:

$EP = [(y^A - y^B) + (y^C - y^D)] / 2$, onde y corresponde a média da produção de fumonisinas nas condições com 40 g/L de maltose e 2 g/L de leucina (y^A), 20 g/L de maltose e 2 g/L de leucina (y^B), 40 g/L de maltose e 1 g/L de leucina (y^C) e 20 g/L de maltose e 1 g/L de leucina (y^D) (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2003).

O cálculo do efeito principal da concentração de nitrogênio na produção de fumonisinas foi realizado por meio da fórmula:

$EP = [(y^A - y^B) + (y^C - y^D)] / 2$, onde y corresponde a média da produção de fumonisinas nas condições com 2 g/L de leucina e 40 g/L de maltose (y^A), 1 g/L de leucina e 40 g/L de maltose (y^B), 2 g/L de leucina e 20 g/L de maltose (y^C) e 1 g/L de leucina e 20 g/L de maltose (y^D) (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2003).

O cálculo do efeito de interação da concentração de carbono com a de nitrogênio na produção de fumonisinas foi realizado por meio da fórmula:

$EP = [(y^A - y^B) - (y^C - y^D)] / 2$, onde y corresponde a média da produção de fumonisinas nas condições com 2 g/L de leucina e 40 g/L de maltose (y^A), 1 g/L de leucina e 20 g/L de maltose (y^B), 2 g/L de leucina e 20 g/L de maltose (y^C) e 1 g/L de leucina e 40 g/L de maltose (y^D) (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2003).

Resultados e Discussão

Na tabela 2 é apresentada a produção de biomassa e fumonisinas por três cepas de *F. verticillioides* em meios de cultivo líquido contendo diferentes fontes de carbono e nitrogênio.

(inserir tabela 2 aqui)

A produção de biomassa variou de 0,14 g a 0,44 g para a cepa 103F nos meios com frutose/alanina e glucose/leucina, respectivamente. Para a cepa 113B, a variação foi de 0,14 g a 0,34 g,

nos meios com frutose/leucina e glucose/valina, respectivamente, enquanto que para a cepa 103BR, a variação foi de 0,07 g a 0,28 g, nas condições maltose/alanina e glucose/valina, respectivamente. Maior produção de biomassa ocorreu em meios contendo glucose como fonte de carbono.

A produção de fumonisinas variou conforme a cepa e fonte de carbono/nitrogênio, de não detectada a 0,2 µg/mL, 0,9 µg/mL e 4,3 µg/mL para as cepas 113B, 103BR e 103F, respectivamente.

Para todas as cepas, a leucina foi a fonte de nitrogênio presente nos meios que apresentaram maior produção de fumonisinas, combinada com maltose, para as cepas 103F e 103BR e, glucose, para a cepa 113B, indicando que a leucina pode ser uma fonte de nitrogênio importante na biossíntese de fumonisina.

Houve uma redução na produção de fumonisina em meios contendo alanina e glucose, pelas três cepas de *F. verticillioides*. Estes resultados foram semelhantes aos de BRANHAM e PLATTNER (1993) que relataram que a adição de alanina em meios de cultivo diminuía a produção de FB₁, pois o aumento na concentração de nitrogênio no meio estimula o crescimento fúngico. Esses mesmos autores demonstraram por meio de alanina marcada ¹⁴C, que esta era incorporada diretamente nas primeiras etapas da biossíntese de fumonisina.

A biossíntese de fumonisina inclui também reações como esterificação, hidroxilação e metilação que possivelmente envolvem, além da alanina, glutarato, serina e metionina (PLATTNER e SHACKELFORD, 1992). Estudos realizados por esses autores também mostraram que a metionina possui efeito semelhante à alanina na produção de fumonisinas.

Em meios de cultivo contendo maltose como fonte de carbono houve maior produção de fumonisinas pelas cepas 103F e 103BR, provavelmente por que a maltose possui mais átomos de carbono numa mesma massa quando comparada às outras fontes utilizadas neste trabalho. Estes resultados estão de acordo com os de JIMÉNEZ et al. (2003) que demonstraram maior produção de fumonisina pelas cepas Gf2 e Gf7 do complexo *Gibberella fujikuroi* em meios contendo maltose.

A produção de fumonisinas foi inversamente proporcional à de biomassa. Embora a produção de biomassa tenha sido alta em glucose/alanina e frutose/valina, não houve detecção de fumonisina. Similarmente, JIMÉNEZ et al. (2003) verificaram que a maior produção de biomassa pela cepa Gf2 resultou em menor produção de fumonisinas.

A cepa 103F produziu maior concentração de fumonisinas (4,3 $\mu\text{g/mL}$) no meio de cultivo contendo maltose como fonte de carbono e leucina como fonte de nitrogênio. Assim, foi conduzido um segundo experimento variando a concentração dessas fontes. A produção de biomassa e fumonisinas são apresentadas na tabela 3.

(inserir tabela 3 aqui)

As concentrações de açúcar e nitrogênio interferem na produção de fumonisinas. Os cálculos dos efeitos principais indicam que a concentração de maltose apresenta um efeito significativo ($p < 0,05$) positivo na produção de fumonisinas ($+0,6 \pm 0,11$). Fixando a concentração de leucina em 2 g/L e aumentando a concentração de maltose de 20 g/L para 40 g/L ocorreu um aumento na produção de fumonisinas de 1,9 $\mu\text{g/mL}$ para 2,3 $\mu\text{g/mL}$ (figura 1).

Pelo cálculo do efeito principal da leucina, esta apresenta um efeito sensível significativo ($p < 0,05$), mas oposto ($-2,2 \pm 0,11$), ou seja, fixando a concentração de maltose em 40 g/L e aumentando a concentração de leucina de 1 g/L para 2 g/L, ocorreu uma diminuição na produção de fumonisinas de 4,7 $\mu\text{g/mL}$ para 2,3 $\mu\text{g/mL}$ (tabela 3 e figura 1).

O efeito da interação da concentração de maltose e leucina na produção de fumonisinas não é significativo ($p < 0,05$) e podem ser interpretados separadamente em razão do baixo valor ($-0,2 \pm 0,11$) de interação entre eles.

(inserir figura 1 aqui)

JIMÉNEZ et al. (2003) observaram um aumento na produção de fumonisinas com o aumento da fonte de carbono no meio, independente do açúcar usado e uma diminuição muito acentuada quando o nível dos aminoácidos serina, treonina, ácido glutâmico, valina e alanina foi aumentado de 1 para 10g/L, sendo que nessa última concentração a produção de fumonisina foi praticamente nula.

A razão C (carbono)/N (nitrogênio) desempenha um papel importante na regulação da via biossintética de fumonisinas. Alguns autores têm sugerido que o quociente C/N influencia na

quantidade de fumonisinas sintetizada (BRANHAM; PLATTNER, 1993), assim como nos níveis de crescimento fúngico. Portanto, um aumento no valor desse quociente leva a uma diminuição na produção da biomassa fúngica e a um aumento na produção de toxina, enquanto que uma diminuição no quociente apresenta um efeito oposto (JIMÉNEZ et al., 2003).

Menor produção de biomassa e maior concentração de fumonisinas foram obtidas nos meios contendo 1 g/L de leucina pela cepa 103F, indicando que a fonte de nitrogênio é um fator determinante no crescimento fúngico.

A produção de fumonisinas variou de acordo com a cepa de *F. verticillioides*, concentração e fonte de carbono/nitrogênio no meio líquido.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação Araucária, CNPq, Fundo Paraná/SETI, PPSUS/Ministério da Saúde e CAPES pelo apoio financeiro.

Referências Bibliográficas

- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 2.ed. Campinas: Unicamp, 2003.
- BEZUIDENHOUT, S. C.; GELDERBLUM, W. C. A.; GORST-ALLMAN, C. P.; HORAK, R. M.; MARASAS, W. F. O.; SPITELLER, G.; VLEGGAAR, R. Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. **Chemical Communications**, v.11, p.743-745, 1988.
- BLACKWELL, B. A.; MILLER, J. D.; SAVARD, M. E. Production of carbon 14-labeled fumonisin in liquid culture. **Journal of Association of Official Analytical Chemists International**. v.77, p.506-511, 1994.
- BRANHAM, B. E.; PLATTNER, R. D. Alanine is a precursor in the biosynthesis of fumonisin B₁ by *Fusarium moniliforme*. **Mycopathologia**. v. 124, n. 2, p. 99-104, 1993.
- BULLERMAN, L. B. Occurrence of *Fusarium* and fumonisins on food grains and in foods. In: JACKSON, L. S.; DEVRIES, J. W.; BULLERMAN, L. B. (Ed.) **Fumonisin in food**. Plenum Press, p. 27-38, 1996.
- CHU, F.S.; LI, G.Y. Simultaneous occurrence of fumonisin B1 and other mycotoxins in moldy corn collected from the People's Republic of China in regions with high incidences of esophageal cancer. **Applied and Environmental Microbiology**. v.60 n.3, p.847-852, 1994
- DUARTE, J. O. Embrapa Milho e Sorgo: sistema de produção1: importância econômica, 2006. Disponível em: < <http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho/importancia.htm> >. Acesso em: 05 mai. 2006.

- FRANCESCHI, S.; BIDOLI, E.; BARON, A. E.; LA VECCHIA, C. Maize and risk of cancer of the oral cavity, pharynx and esophagus in Northeastern Italy. **Journal of the National Cancer Institute**, v.82, p.1407-1411, 1990.
- GELDERBLOM, W. C. A.; KRIEK, N. P. J.; MARASAS, W. F. O.; THIEL, P. G. Toxicity and carcinogenicity of the *Fusarium moniliforme* metabolite, fumonisin B₁ in rats. **Carcinogenesis**, v.12, n.1-2, p.1247-1251, 1991.
- GELDERBLOM, W.C.A., JASKIEWICZ, K., MARASAS, W.F.O. Fumonisin: novel mycotoxin with cancer promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, p.1806-1811, 1988.
- GLENN, A. E.; HINTON, D. M.; YATES, E.; BACON, C. W. Detoxification on corn antimicrobial compounds as the basis for isolating *Fusarium verticillioides* and some other *Fusarium* species from corn. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 7, p. 2973-2981, 2001.
- JIMÉNEZ, M.; MATEO, J. J.; HINOJO, M. J.; MATEO, R. Sugar and amino acids as factors affecting the synthesis of fumonisins in liquid cultures by isolates of the *Gibberella fujikuroi* complex. **International Journal of Food Microbiology**. v. 89, n. 2, p. 185-193, 2003.
- KELLER S.E., SULLIVAN T.M., CHIRTEL S. Factors affecting the growth of *Fusarium proliferatum* and the production of fumonisin B₁ : oxygen and pH. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 19, p. 305-309, 1997.
- KELLER, S. E.; SULLIVAN, T. M. Liquid culture methods for the production of fumonisin. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. v. 392, p. 205 – 212, 1996.
- KERÉNYI, Z.; ZELLER, K.; HORNOK, L.; LESLIE, J. F. Molecular standardization of mating type terminology in the *Gibberella fujikuroi* species complex. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 9, p. 4071 – 4076, 1999.
- MARASAS, W. F. O.; KELLERMAN, T. S.;GELDERBLOM, W. C. A.; COETZER, J. A. W.; THIEL, P. G.; VANDERLUGT, J. J. Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B₁ isolated from *Fusarium moniliforme*. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v.55, n.4, p. 197-203, 1988.
- MARASAS, W. F. O.; WIENER, N. P. J.; VAN RENSBURG, S. J.; VAN SCHALKWYK, D. J. Mycoflora of corn produced in human esophageal cancer areas in Transkei, southern Africa. **Phytopathology**, v. 71, p. 792 – 796, 1981.
- NAGARAJ, R. Y; WU, W.D; VESONDER, R. J. Toxicity of corn culture material of *Fusarium proliferatum* M-7176 and nutritional intervention in chicks. **Poultry Science**, v.73, n.5, p.617-626, 1994.
- PLATTNER, R. D.; SHACKELFORD, D. D. Biosynthesis of labeled fumonisins in liquid cultures of *Fusarium moniliforme*. **Mycopathologia**. v. 117, n. 1-2, p. 17-22, 1992.
- RHEEDER, J. P.; MARASAS, W. F. O.; VISMER,H. F. Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 5, p. 2101-2105, 2002.
- ROSS, P.F.; NELSON, P.E.; RICHARD, J.L.; OSWEILER, G.D.; RICE, L.G.; PLATTNER, R.D.; WILSON, T.M. Production of fumonisins by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* isolates associated with equine leukoencephalomalacia and a pulmonary edema syndrome in swine. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, p. 3225-3226, 1990.

SHEPHARD, G. S.; SYDENHAM, E. W.; THIEL, P. G.; GELDERBLOM, W. C. A. Quantitative determination of fumonisin B₁ and B₂ by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Liquid Chromatography**, v. 13, p. 2077-2087, 1990.

SHIER, T. W.; ABBAS, H. K.; BADRIA, A. F. Structureactivity relationships of the corn fungal toxin fumonisin B₁: Implications for food safety. **Journal of Natural Toxins**, v.6, n.3, p.225-242, 1997.

SYDENHAM, E. W.; GERDERBLOM, W.C. A.; THIEL, P.G.; MARASAS, W. F. O. Evidence for the natural occurrence of fumonisin B₁ a mycotoxin produced by *Fusarium moniliforme* in corn. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 39, p. 2014 - 2018, 1991.

THIEL, P. G., SHEPHARD, G. S., SYDENHAM, E. W., NELSON, P. E.; WILSON, T. M. Levels of fumonisin B₁ and B₂ in feeds associated with confirmed cases of equine leukoencephalomalacia. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 39, p. 109-111, 1991.

UENO, Y.; AOYAMA, S.; SUGIURA, Y.; WANG, D. S.; LEE, U. S.; HIROOKA, E. Y.; HARA, S.; KARKI, T.; CHEN, G.; YU, S. Z. A limited survey of fumonisins in corn and corn-based products in Asian countries. **Mycotoxin Research**, v.9, p.27-34, 1993.

WEIBKING, T; LEDOUX, D. R; BERMUDEZ, A. J.; TURK, J.R.; ROTTINGHAUS, G. E.; WANG, E.; MERRILL, A. H. Effects of feeding *Fusarium moniliforme* culture material, containing known levels of fumonisin B₁, on the young broiler chick. **Poultry Science**, v.72, n.3, p.456-466, 1993.

Tabela 1 – Meios de cultura com diferentes combinações de aminoácidos e carboidratos.

Ensaio	Fonte de C/N
1	glucose/leucina
2	glucose/alanina
3	frutose/leucina
4	frutose/alanina
5	glucose/valina
6	maltose/alanina
7	frutose/valina
8	maltose/leucina
9	maltose/valina

Tabela 2 – Produção de biomassa e fumonisina em diferentes fontes de C/N por *F. verticillioides* 103F, 113B e 103BR.

Fonte de C/N	<i>F. verticillioides</i>					
	103F		113B		103BR	
	Bm (g)	FB ₁ (µg/mL)	Bm (g)	FB ₁ (µg/mL)	Bm (g)	FB ₁ (µg/mL)
glucose/leucina	0,44	ND	0,15	0,2	0,10	ND
glucose/alanina	0,33	ND	0,33	ND	0,25	ND
frutose/leucina	0,23	2,1	0,14	0,1	0,14	0,3
frutose/alanina	0,14	2,1	0,23	0,1	0,13	0,5
glucose/valina	0,35	0,4	0,34	ND	0,28	ND
maltose/alanina	0,31	0,7	0,26	ND	0,07	0,3
frutose/valina	0,32	ND	0,29	ND	0,14	ND
maltose/leucina	0,28	4,3	0,30	ND	0,10	0,9
maltose/valina	0,17	1,7	0,19	0,1	0,12	0,6

Bm: Biomassa,
 FB₁: Fumonisin B₁
 ND: não detectado

Tabela 3 – Produção de biomassa e fumonisina em diferentes concentrações de maltose e leucina por *F. verticillioides* 103F.

Maltose/Leucina (g/L)	Biomassa (g)*	FB₁ (µg/mL)*
20/2	0,33±0,03	1,9±0,02
40/1	0,15±0,011	4,7±0,20
20/1	0,22±0,0005	3,9±0,09
40/2	0,26±0,0025	2,3±0,01

*Médias de duas repetições

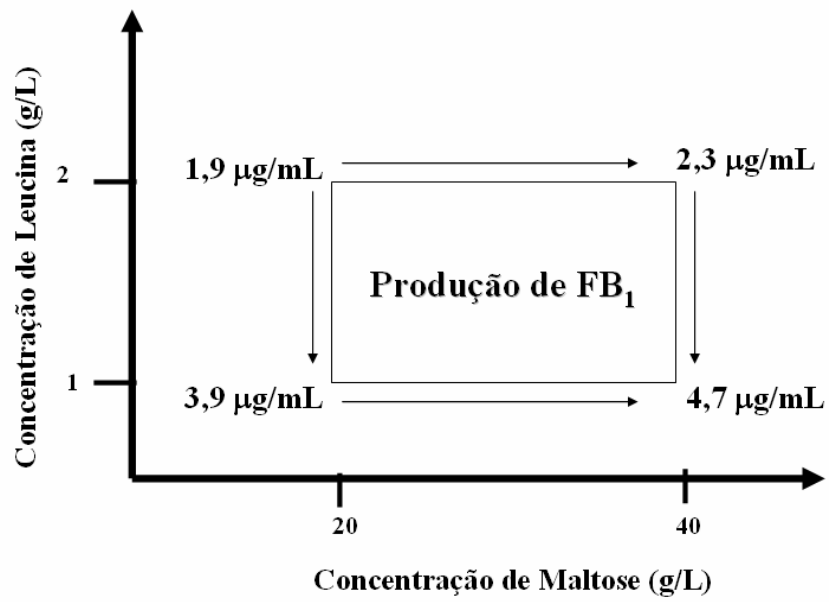


Figura 1 – Produção de FB_1 por *F. verticillioides* 103F em diferentes concentrações de maltose e leucina.

Fatores que afetam a produção de fumonisinas por *Fusarium verticillioides* em meio líquido definido: tempo de cultivo, carboidratos e aminoácidos

Resumo

A produção de fumonisinas por *Fusarium verticillioides* 103F foi avaliada em dois tempos de cultivo (15 e 21 dias). Posteriormente, 3 cepas (103F, 119B e 97K) de *F. verticillioides* foram avaliadas em relação à sua capacidade de produção de fumonisinas e biomassa fúngica em meio de cultura líquido suplementado com diferentes combinações de fonte de carbono (glucose, frutose e maltose) e nitrogênio (alanina e glicina) na concentração de 20 g/L e 1 g/L, respectivamente. A maior produção de fumonisinas pela cepa 103F ocorreu em 21 dias (1,35 µg/mL), sendo este tempo de cultivo selecionado para os experimentos posteriores. O meio de cultivo que proporcionou maior produção de fumonisinas (1,64 µg/mL) pelas cepas analisadas, continha glucose e glicina como fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente, diferindo significativamente dos demais meios pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Avaliando a produção de fumonisinas em meio contendo glucose (20 g/L) e três diferentes concentrações de glicina (0,5, 1,0 e 2,0), houve maior produção significativa ($p < 0,05$) no meio que continha 1,0 g/L de glicina pela cepa 97K. A produção de fumonisinas pelas três cepas foi inversamente proporcional à produção de biomassa. Os resultados deste trabalho indicam que os nutrientes presentes no meio de cultivo desempenham papel importante na produção de fumonisinas por *Fusarium verticillioides*, sendo que a produção depende da cepa e das fontes de carbono e nitrogênio presentes no meio.

Introdução

Determinados fungos contaminantes de produtos agrícolas produzem metabólitos secundários tóxicos denominados micotoxinas, que constituem um grupo heterogêneo de compostos químicos, cuja ingestão resulta em intoxicações ao homem e animais (MISLIVEC, 1979; BENNET; RICHARD, 1994).

Os fungos do gênero *Fusarium* são capazes de produzir várias micotoxinas, tais como as fumonisinas, as fusarinas, moniliformina, toxina T-2, ácido fusárico, deoxinivalenol, diacetoxiscirpenol e zearalenona (LI et al., 2000).

As fumonisinas, micotoxinas produzidas principalmente por *Fusarium verticillioides* e *Fusarium proliferatum*, causam leucoencefalomalácia em eqüinos (MARASAS et al., 1988), edema pulmonar em suínos (HARRISON, et al., 1990) e redução no desenvolvimento e

imunodepressão em aves (WEIBKING et al., 1993). Em ratos, foi comprovada a ação hepatocarcinogênica (GELDERBLOM et al., 1992). Em seres humanos, estudos epidemiológicos indicam a associação com câncer esofágico e câncer hepático primário (WANG et al., 1995; GELDERBLOM et al., 1988 e 1992; UENO et al., 1997).

A maioria dos estudos sobre toxigenicidade de *F. verticillioides* é realizada em substratos naturais (meios sólidos). Nestes substratos a produção de fumonisinas é maior quando comparada com a produção em meios líquidos, porém os processos de extração e purificação de fumonisinas nesses meios requerem solventes tóxicos e necessitam de muitas etapas, além de dificultarem o estudo das vias biossintéticas e do mecanismo de controle da produção de fumonisinas. Os meios líquidos podem eliminar muitos problemas relacionados à produção de fumonisinas em meio sólido (KELLER; SULLIVAN, 1996).

A qualidade e os níveis dos nutrientes presentes no substrato desempenham um papel importante na produção de fumonisinas por *F. verticillioides* (JIMÉNEZ et al., 2003), porém somente a participação de alguns aminoácidos nas etapas de biossíntese de fumonisinas tem sido estudada (PLATTNER; SHACKELFORD, 1992; BRANHAM; PLATTNER, 1993; BLACKWELL; MILLER; SAVARD, 1994).

Considerando o reduzido número de estudos sobre a produção de fumonisinas em meio líquido definido, o presente trabalho teve como objetivo analisar a influência de combinações de carboidratos e aminoácidos na produção dessa toxina por *F. verticillioides*.

Material e Métodos

Cultura de fungos

Foram utilizadas as cepas 103F, 119B e 97K de *F. verticillioides* isoladas a partir de rações envolvidas em intoxicação animal, cedidas gentilmente pela Dra. Elisa Yoko Hirooka (Depto. de Ciência e Tecnologia de Alimentos - UEL).

Produção de fumonisina

Uma suspensão de esporos (10^7 esporos/mL) de *F. verticillioides* 103F cultivada em ágar batata dextrose (BDA) por 7 dias a 28°C foi inoculada em meio líquido a base de sais e vitaminas (50 mL) contendo 1g/L KH_2PO_4 , 1g/L K_2HPO_4 , 0,3 g/L MgSO_4 , 32 mg/mL ZnSO_4 , 100 mg/mL FeSO_4 , 16 mg/L MnSO_4 , 0,4 g/L CaCl_2 , 1 mg/L tiamina, 1 mg/L riboflavina, 1 mg/L pantotenato, 1 mg/L niacina, 1mg/L piridoxamina, 1 mg/L ácido α -lipóico (tiótico), 100 $\mu\text{g/L}$ ácido fólico, 100 $\mu\text{g/L}$ biotina, 100 $\mu\text{g/L}$ vitamina B_{12} (KELLER; SULLIVAN;

CHIRTEL, 1997) com pH ajustado para 3,7. Ao meio básico foram adicionadas glucose (20 g/L) e glicina (1 g/L). A incubação foi realizada a 180 rpm, 28°C por 15 e 21 dias. Selecionado o melhor tempo de cultivo para produção de fumonisinas, as cepas 103F, 119B e 97K foram cultivadas a 28°C, 180 rpm, em 6 diferentes meios de cultivo líquido básico contendo 20 g/L de fonte de carbono e 1 g/L de fonte de nitrogênio combinados conforme a Tabela 1. Posteriormente, essas 3 cepas foram avaliadas quanto a produção de fumonisinas em 3 diferentes concentrações de fonte de nitrogênio (0,5, 1,0 e 2,0 g/L). Os meios de cultura foram filtrados em papel Whatman nº 1 sob vácuo e o filtrado foi utilizado para a determinação de fumonisinas e açúcares redutores.

Tabela 1 – Meios de cultura com diferentes combinações de fonte de carbono e nitrogênio.

Ensaio	Fonte de C/N
1	Maltose/glicina (M/G)
2	Maltose/alanina (M/A)
3	Frutose/glicina (F/G)
4	Frutose/alanina (F/A)
5	Glucose/glicina (G/G)
6	Glucose/alanina (G/A)

Análise de biomassa

A determinação de biomassa foi realizada por gravimetria a 70°C até obtenção de peso constante.

Consumo de açúcar

O consumo de açúcar foi determinado segundo a metodologia de SOMOGYI (1945)-NELSON (1944), utilizando glucose como padrão. As leituras foram realizadas a 540 nm em espectrofotômetro (FEMTO 600 plus).

Determinação de fumonisinas

A extração de fumonisinas foi realizada misturando uma alíquota de 2 mL do filtrado com 2 mL de metanol : água (3:1, v/v). O extrato (1 mL) foi submetido à pré-limpeza em coluna de troca aniônica (Sep Pak accell plus QMA, Waters), eluído com metanol contendo ácido acético (0,5%) e seco sob fluxo de gás nitrogênio a 45°C. Após a dissolução do extrato

com acetonitrila:H₂O (1 : 1), a amostra foi derivatizada com ortoftaldialdeído. A determinação de fumonisinas foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), consistindo de bomba 10AT e detector de fluorescência RF 10A XL (Shimadzu), sistema isocrático de fase reversa, utilizando coluna Shim-pack CLC-ODS (M) (4,6 x 250 mm). As condições de operação foram fluxo de 1 mL/minuto, temperatura de 25°C, detector de fluorescência com comprimento de onda de excitação e de emissão de 335nm e 450nm, respectivamente. A fase móvel consistiu de CH₃OH: NaH₂PO₄ (0,1 mol/L, 80:20, v/v), pH 3,3 (SHEPHARD et al., 1990 modificado por UENO et al., 1993).

Análise estatística

A produção de biomassa, fumonisinas, pH final e consumo de açúcar foram submetidos à análise de variância (ANOVA) fatorial e comparação múltipla de médias pelo teste de Tukey (p<0,05). A análise foi realizada utilizando o software STATISTICA versão 6.1 (Statsoft Inc., Tulsa, USA).

Resultados e Discussão

Na tabela 2 são apresentados o consumo de açúcar, pH final, produção de biomassa e fumonisinas por *F. verticillioides* 103F em 2 tempos de cultivo líquido contendo glucose e glicina como fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente.

Tabela 2 – Consumo de açúcar, pH final, produção de biomassa e fumonisina por *F. verticillioides* 103F em meio de cultura com 20 g/L de glucose e 1 g/L de glicina em dois tempos de cultivo.

Tempo de cultivo (dias)	Consumo de açúcar (g/L)	pH Final	Biomassa (g)	Fumonisinas totais (µg/mL)
15	14,0 ^b ±0,15	3,2 ^b ±0,04	0,31 ^a ±0,004	0,35 ^b ±0,02
21	15,3 ^a ±0,01	3,4 ^a ±0,02	0,34 ^a ±0,006	1,35 ^a ±0,83

Médias seguidas da mesma letra não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey (p<0,05)

O consumo de açúcar e produção de biomassa foram maiores no cultivo de 21 dias pela cepa 103F de *F. verticillioides*, ocorrendo um declínio no pH para 3,2 e 3,4 para o cultivo de 15 e 21 dias, respectivamente.

A produção de fumonisinas foi maior (1,35 µg/mL) no cultivo de 21 dias em relação ao de 15 dias (0,35 µg/mL), havendo uma diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Esses resultados (Tabela 2) estão de acordo com os relatados por JACKSON e BENNETT (1990) que demonstraram uma maior produção de fumonisinas por *F. verticillioides* em tempos maiores de cultivo.

Tendo em vista a maior produção de fumonisinas em 21 dias, este tempo de cultivo foi selecionado para os experimentos posteriores.

Na figura 1 são apresentadas as médias da produção de fumonisinas pelas 3 cepas.

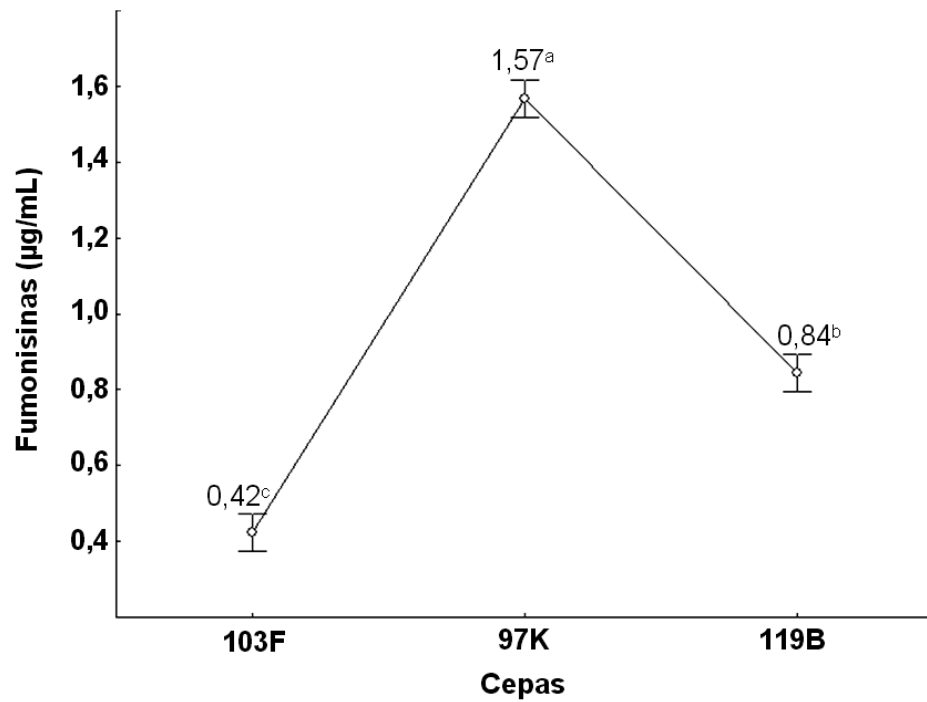


Figura 1 – Médias da produção de fumonisinas pelas cepas de *F. verticillioides* 103F, 97K e 119B. Médias seguidas da mesma letra não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

A cepa 97K produziu maior nível de fumonisinas (1,57 µg/mL), diferindo significativamente das demais cepas (figura 1).

Na figura 2 são apresentadas as médias da produção de fumonisinas nas diferentes fontes de carbono/nitrogênio.

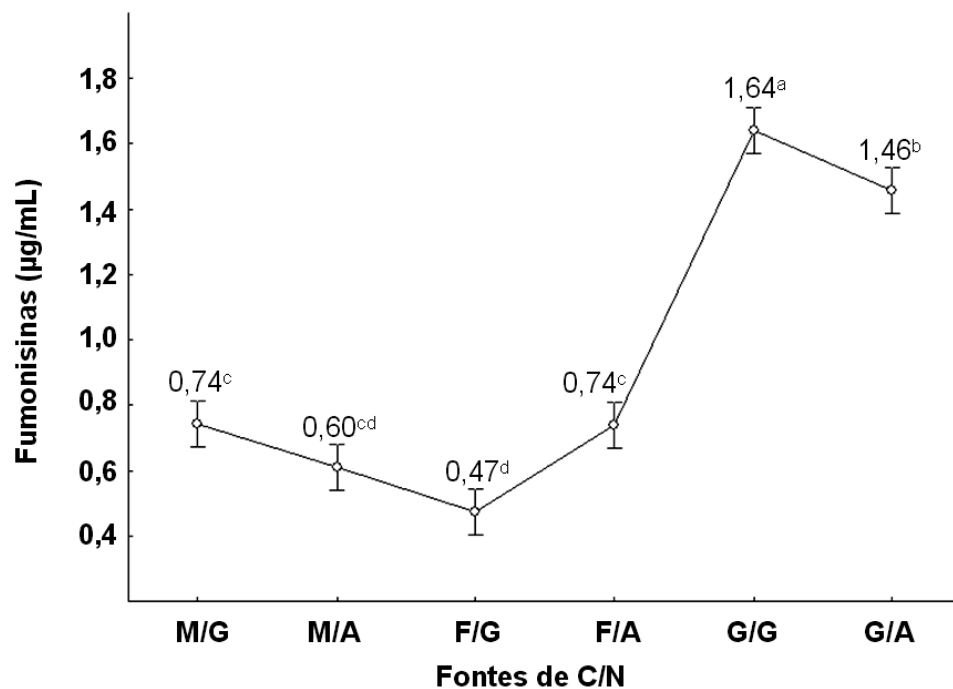


Figura 2 – Médias da produção de fumonisinas nas diferentes fontes de C/N pelas 3 cepas de *F. verticillioides*. M/G: Maltose/Glicina, M/A: Maltose/Alanina, F/G: Frutose/Glicina, F/A: Frutose/Alanina, G/G: Glucose/Glicina e G/A: Glucose/Alanina. Médias seguidas da mesma letra não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

O meio de cultivo que proporcionou maior produção de fumonisinas (1,64 µg/mL) pelas cepas analisadas, continha glucose e glicina como fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente (figura 2), diferindo significativamente dos demais meios pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Resultados semelhantes foram obtidos por JIMÉNEZ et al. (2003) com a cepa Gf7 do complexo *Gibberella fujikuroi* que apresentou maior produção de fumonisinas (1,6 µg/mL) em meio contendo glucose como fonte de carbono. Diferentemente destes autores, que analisaram separadamente o efeito de 6 fontes de carbono e 10 fontes de nitrogênio na produção de fumonisinas por cepas do complexo *Gibberella fujikuroi*, neste trabalho foi avaliado o efeito da combinação de fontes de carbono e nitrogênio na produção desta toxina por *F. verticillioides*.

As médias das interações das 3 cepas de *F. verticillioides* em diferentes fontes de carbono e nitrogênio para a produção de biomassa, fumonisinas, consumo de açúcar e o pH final dos cultivos são apresentadas na tabela 3.

Tabela 3 – Médias das interações de diferentes cepas de *F. verticillioides* em diferentes fontes de carbono/nitrogênio para o consumo de açúcar, pH final, produção de biomassa e fumonisinas.

<i>F. verticillioides</i>	Fonte de C/N (20:1 g/L)	C. A. (g/L) DP ($\pm 0,16$)	pH Final DP ($\pm 0,08$)	BM (g) DP ($\pm 0,005$)	FB totais ($\mu\text{g/mL}$) DP ($\pm 0,06$)
103F	Maltose/Glicina	17,1 ^{ab}	3,2 ^{ab}	0,36 ^a	ND ^j
	Maltose/Alanina	17,3 ^{ab}	3,1 ^{ab}	0,31 ^b	0,2 ^{ij}
	Frutose/Glicina	13,7 ^{ef}	3,1 ^{ab}	0,29 ^b	0,5 ^{ghi}
	Frutose/Alanina	13,1 ^f	3,2 ^{ab}	0,24 ^c	0,8 ^{efg}
	Glucose/Glicina	12,9 ^{fg}	3,3 ^{ab}	0,12 ^{gh}	1,1 ^e
	Glucose/Alanina	13,4 ^f	3,5 ^a	0,17 ^{def}	ND ^j
97K	Maltose/Glicina	16,6 ^{bc}	2,6 ^{de}	0,12 ^{gh}	2,0 ^c
	Maltose/Alanina	17,2 ^{ab}	2,4 ^e	0,16 ^{def}	0,7 ^{fgh}
	Frutose/Glicina	15,8 ^c	2,4 ^e	0,19 ^d	0,5 ^{ghi}
	Frutose/Alanina	14,7 ^d	2,6 ^{de}	0,14 ^{fgh}	1,0 ^{ef}
	Glucose/Glicina	11,6 ^h	3,0 ^{bcd}	0,08 ⁱ	2,4 ^b
	Glucose/Alanina	12,9 ^{fg}	3,3 ^{ab}	0,11 ^{hi}	2,8 ^a
119B	Maltose/Glicina	17,8 ^a	3,0 ^{abc}	0,24 ^c	0,3 ^{ij}
	Maltose/Alanina	16,7 ^{bc}	2,6 ^{cde}	0,17 ^{de}	0,9 ^{ef}
	Frutose/Glicina	16,0 ^c	2,5 ^e	0,23 ^c	0,4 ^{hi}
	Frutose/Alanina	15,8 ^c	2,4 ^e	0,22 ^c	0,5 ^{ghi}
	Glucose/Glicina	14,5 ^{de}	3,0 ^{ab}	0,15 ^{efg}	1,5 ^d
	Glucose/Alanina	12,2 ^{gh}	3,2 ^{ab}	0,11 ^{hi}	1,6 ^d

Médias seguidas da mesma letra não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). C. A.: consumo de açúcar, BM: biomassa e FB: fumonisinas.

O consumo de açúcar variou conforme a cepa e fonte de C e N, de 11,6 g/L pela cepa 97K cultivada em glucose/glicina a 17,8 g/L pela cepa 119B em maltose/glicina. Em geral, os menores e maiores consumos de açúcar ocorreram nas condições que continham glucose e maltose como fontes de açúcar para as três cepas, respectivamente (tabela 3).

A produção de biomassa variou de 0,08 g pela cepa 97K em glucose/glicina a 0,36 g pela cepa 103F em maltose/glicina.

A produção de fumonisina variou conforme a cepa e a fonte de carbono/nitrogênio (tabela 5) de 0,2 $\mu\text{g/mL}$ pela cepa 103F (maltose/alanina) a 2,8 $\mu\text{g/mL}$ pela cepa 97K

(glucose/alanina). Não houve detecção de fumonisinas em maltose/glicina e glucose/alanina cultivadas com a cepa 103F.

Considerando que o meio de cultivo contendo glucose e glicina como fontes de carbono e nitrogênio proporcionou maior produção média de fumonisinas ($p < 0,05$) pelas 3 cepas de *F. verticillioides* (figura 2), foi conduzido um terceiro experimento utilizando 20 g/L de glucose como fonte de carbono e 3 diferentes concentrações de glicina (0,5, 1,0 e 2,0 g/L) como fonte de nitrogênio.

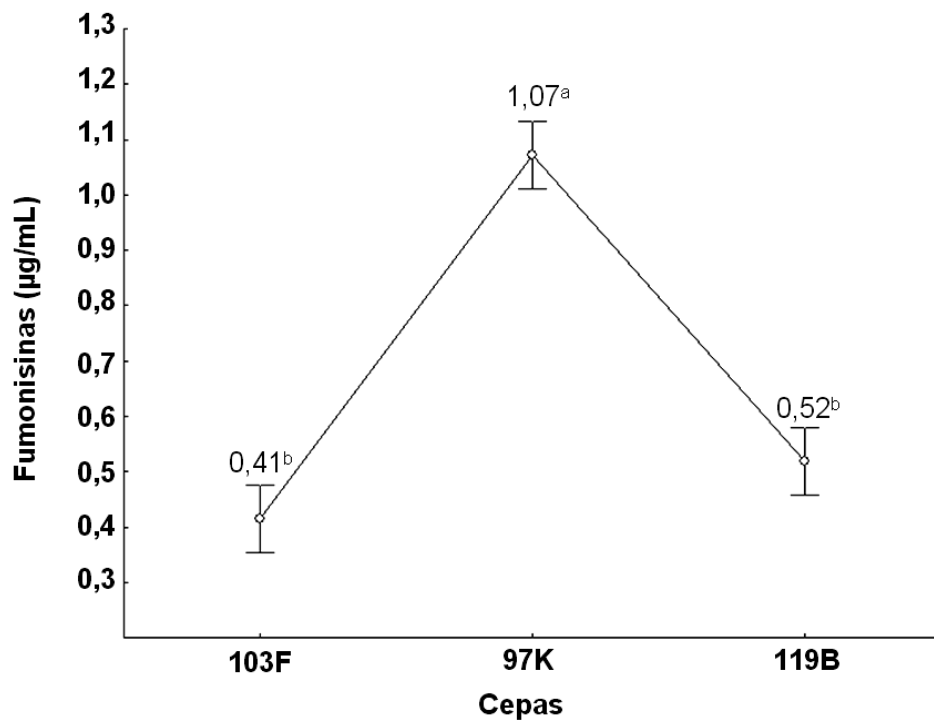


Figura 3 – Médias da produção fumonisinas pelas cepas de *F. verticillioides* 103F, 97K e 119B em diferentes razões de C/N.

Médias seguidas da mesma letra não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

A cepa 97K apresentou maior produção de fumonisinas (1,07 µg/mL) nas 3 diferentes razões de C/N analisadas (figura 3), diferindo significativamente das demais cepas ($p < 0,05$).

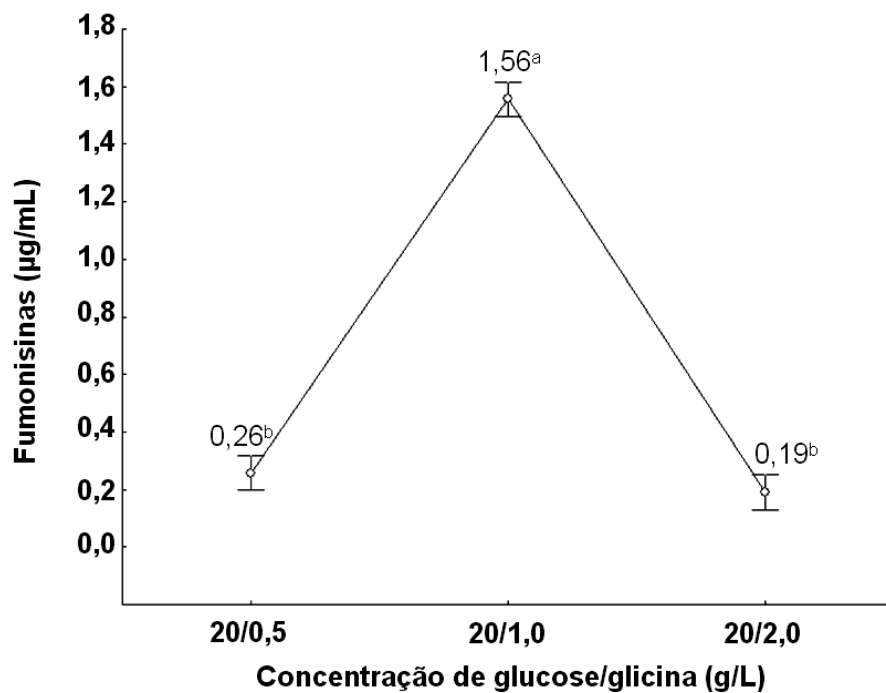


Figura 4 – Médias da produção de fumonisinas nas diferentes razões de C/N pelas 3 cepas de *F. verticillioides*.

Médias seguidas da mesma letra não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

Os meios de cultivo com glicina na concentração de 1,0 g/L como fonte de nitrogênio proporcionaram maior produção significativa ($p < 0,05$) de fumonisinas, independente da cepa analisada. Nos meios de cultivo com 0,5 e 2,0 g/L de glicina foram observados as menores produções de fumonisinas (figura 4).

Na tabela 4 são apresentadas as médias das interações das três cepas de *F. verticillioides* em diferentes razões de C/N para a produção de biomassa, fumonisinas, consumo de açúcar e o pH final dos cultivos.

Tabela 4 – Média das interações de diferentes cepas de *F. verticillioides* em diferentes razões de C/N para o consumo de açúcar, pH final, produção de biomassa e fumonisinas.

<i>F. verticillioides</i>	Glucose/Glicina (g/L) DP ($\pm 0,09$)	C. A. (g/L) DP ($\pm 0,09$)	pH Final DP ($\pm 0,06$)	BM (g) DP ($\pm 0,003$)	FB totais ($\mu\text{g/mL}$) DP ($\pm 0,05$)
103F	20/0,5	17,4 ^f	2,7 ^c	0,2 ^e	ND ^e
	20/1,0	18,0 ^{de}	3,15 ^{ab}	0,21 ^{de}	0,87 ^c
	20/2,0	18,6 ^c	2,95 ^{abc}	0,26 ^b	0,37 ^d
97K	20/0,5	17,7 ^{ef}	3,1 ^{ab}	0,11 ^g	0,64 ^c
	20/1,0	18,5 ^{cd}	3,25 ^a	0,16 ^f	2,57 ^a
	20/2,0	19,4 ^a	2,7 ^c	0,22 ^d	ND ^e
119B	20/0,5	18,0 ^{de}	2,85 ^{bc}	0,24 ^c	0,13 ^{de}
	20/1,0	18,8 ^{bc}	3,25 ^a	0,26 ^{ab}	1,22 ^b
	20/2,0	19,3 ^{ab}	2,95 ^{abc}	0,28 ^a	0,2 ^{de}

Médias seguidas da mesma letra não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). C. A.: consumo de açúcar, BM: biomassa e FB: fumonisinas.

Observando a tabela 4, verifica-se que o consumo de açúcar variou conforme a cepa e concentração de glicina analisada, sendo que houve menor e maior consumo de açúcar nas concentrações de 0,5 e 2,0 g/L de glicina pelas três cepas, respectivamente. Maiores produções de biomassa estão relacionadas com maiores consumos de açúcar.

A produção de fumonisinas variou conforme a cepa e a concentração de glicina, sendo detectada maior produção de fumonisinas (2,57 $\mu\text{g/mL}$) pela cepa 97K na concentração de 1,0 g/L de glicina ($p < 0,05$). Não houve detecção de fumonisinas na concentração de 0,5 g/L de glicina pela cepa 103F e na concentração de 2,0 g/L pela cepa 97K.

O aumento na concentração de glicina diminuiu a produção de fumonisinas (tabela 7). JIMÉNEZ et al. (2003) observaram uma diminuição muito acentuada quando o nível dos aminoácidos serina, treonina, ácido glutâmico, valina e alanina foi aumentado de 1 para 10 g/L, sendo que nessa última concentração a produção de fumonisina foi praticamente nula.

A razão C (carbono)/N (nitrogênio) desempenha um papel importante na regulação da produção de fumonisinas. O quociente C/N influencia na quantidade de fumonisina sintetizada, assim como nos níveis de crescimento fúngico (BRANHAM; PLATTNER, 1993). Portanto, um aumento no valor desse quociente leva a uma diminuição na produção da biomassa fúngica e a um aumento na produção de toxina, enquanto que uma diminuição no

quociente apresenta um efeito oposto (JIMÉNEZ et al., 2003). Em altos quocientes da razão C/N, como 20 g/L de glucose e 0,5 g/L de glicina, houve uma diminuição acentuada na produção de fumonisinas (tabela 7), diferindo significativamente ($p < 0,05$) da razão C/N intermediária (20 g/L de glucose e 1,0 g/L de glicina) e não diferindo ($p < 0,05$) do menor quociente (20 g/L de glucose e 2,0 g/L de glicina).

Em geral, maiores consumos de açúcar pelas cepas proporcionaram maior produção de biomassa. Esses resultados estão de acordo com KELLER; SULLIVAN; CHIRTEL (1997) que relataram maior produção de biomassa por *Fusarium proliferatum* em condições onde houve maior consumo de açúcar.

O pH final diminuiu em relação ao inicial em todas as condições analisadas, havendo uma tendência das maiores produções de fumonisinas proporcionarem menores variações de pH (Tabelas 3 e 4), estando de acordo com KELLER; SULLIVAN; CHIRTEL (1997), que, avaliando a produção de fumonisinas por *F. proliferatum*, demonstraram uma diminuição no pH final (3,0) em relação ao inicial (3,7) após 20 dias de cultivo.

A produção de fumonisinas pelas três cepas foi inversamente proporcional à produção de biomassa (Tabelas 3 e 4). Similarmente, JIMÉNEZ et al. (2003) relataram maior produção de biomassa por *Gibberella fujikuroi* Gf2 em meios de cultivo onde houve menor produção de fumonisinas.

Os resultados deste trabalho indicam que os nutrientes presentes no meio de cultivo desempenham papel importante na produção de fumonisinas por *Fusarium verticillioides*, sendo que a produção depende da cepa e das fontes de carbono e nitrogênio presentes no meio.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação Araucária, CNPq, Fundo Paraná/SETI, PPSUS/Ministério da Saúde e CAPES pelo apoio financeiro.

Referências Bibliográficas

BENNET, G. A.; RICHARD, J. L. Liquid chromatographic method for analysis of the naphthalene dicarboxialdehyde derivative if fumonisins. **Journal of the Association of Official Analytical Chemistry International**, v.77., n.2, p.501-506, 1994.

BLACKWELL, B.A.; MILLER, J.D.; SAVARD, M.E. Production of carbon 14-labeled fumonisin in liquid culture. **Journal of Association of Official Analytical Chemists International**. v.77, p.506–511, 1994.

- BRANHAM, B.E.; PLATTNER, R.D. Alanine is a precursor in the biosynthesis of fumonisin B₁ by *Fusarium moniliforme*. **Mycopathologia** 124, 99– 104., 1993.
- GELDERBLOM, W.C.A.; JASKIEWICZ, K.; MARASAS, W.F.O.; THIEL, P.G.; HORAK, R. M.; VLEGGAR, R.; KRIEK, N. P. J. Fumonisin – novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. **Applied and Environmental Microbiology**. v.54, n.7, p.1806-1811, 1988.
- GELDERBLOM, W. C. A.; SEMPLE, E.; MARASAS, W. F. O; FARBER, E. The cancer initiating potential of the fumonisin B mycotoxins. **Carcinogenesis**. v 13, p. 433-43, 1992.
- HARRISON, L. R.; COLVIN, B. M.; GREEN, J. T.; NEWMAN, L. E.; COLE, J. R. Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B₁, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v.2 p.217-221, 1990.
- JACKSON, M. A.; BENNETT, G. A. Production of Fumonisin B₁ by *Fusarium moniliforme* NRRL 13616 in Submerged Culture. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 56, n° 8, p. 2296-2298, 1990.
- JIMÉNEZ, M.; MATEO, J. J.; HINOJO, M. J.; MATEO, R. Sugar and amino acids as factors affecting the synthesis of fumonisins in liquid cultures by isolates of the *Gibberella fujikuroi* complex. **International Journal of Food Microbiology**. v. 89, p. 185 – 193, 2003.
- KELLER, S. E.; SULLIVAN, T. M.; CHIRTEL, S. Factors affecting the growth of *Fusarium proliferatum* and the production of fumonisin B₁: oxygen and pH. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**. v. 19, p. 305-309, 1997.
- KELLER, S. E.; SULLIVAN, T. M. Liquid culture methods for the production of fumonisin. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. v.392, p.205 – 212, 1996.
- LI, Y. C.; LEDOUX, D. R.; BERMUDEZ, A. J.; FRITSCH, K. L.; ROTTINGHAUS, G. E. Individual and combined effects of fumonisin B₁ and moniliformin on performance and selected immune parameters in turkey poults. **Poultry Science**., v.79, n.6, p.871-878, 2000.
- MARASAS, W. F. O.; KELLERMAN, T. S.; GELDERBLOM, W. C. A.; COETZER, J. A. W.; THIEL, P. G.; van der LUGT, J. J. Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B₁ isolated from *Fusarium moniliforme*. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v.55, p.197-203, 1988.
- MISLIVEC, P. B. Specific requirements and physical factors affecting fungal growth and multiplication. In: RHODES, M. E. ed. **Food Mycology**, Boston G. K. Hall & Co., p.20-28, 1979.
- NELSON, N.A. Colorimetric adaptation of the Somogyi method for determination of glucose. **Journal of Biochemistry**, v.153, p.376-380, 1944.
- PLATTNER, R. D.; SHACKELFORD, D. D. Biosynthesis of labeled fumonisins in liquid cultures of *Fusarium moniliforme*. **Mycopathologia**. V.117, p.17-22, 1992
- SHEPHARD, G. S.; SYDENHAM, E. W.; THIEL, P. G.; GELDERBLOM, W. C. A. Quantitative determination of fumonisin B₁ and B₂ by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Liquid Chromatography**, v.13, p.2077-2087, 1990.
- SOMOGYI, M. A.. A new reagent for determination of sugars, **Journal of Biological Chemistry**. v.160, p.61-68, 1945.

UENO, Y.; AOYAMA, S.; SUGIURA, Y.; WANG, D. S.; LEE, U. S.; HIROOKA, E. Y.; HARA, S.; KARKI, T.; CHEN, G.; YU, S. Z. A limited survey of fumonisins in corn and corn-based products in Asian countries. **Mycotoxin Research**, v.9, p.27-34, 1993.

UENO, Y.; IJIMA, K.; WANG, S. D.; SUGIURA, Y.; SEKIJIMA, M.; TANAKA, T.; CHEN, C.; YU, S. Z. Fumonisin as a possible contributory risk factor for primary liver cancer. A 3-year study of corn harvested in Haimen, China, by HPLC and ELISA. **Food and Chemical Toxicology**, v.35, p.1143-1150, 1997.

WANG, D.S; LIANG, Y.X; IJIMA, K; SUGIURA, Y.; TANAKA, T.; CHEN, G.; YU, S. Z.; UENO, Y. Co-contamination of mycotoxins in corn harvested in Haimen, a high risk area of primary liver cancer in China. **Mycotoxins**. v.41, p.67-70, 1995.

WEIBKING, T; LEDOUX, D. R; BERMUDEZ, A. J.; TURK, J.R.; ROTTINGHAUS, G. E.; WANG, E.; MERRILL, A. H. Effects of feeding *Fusarium moniliforme* culture material, containing known levels of fumonisin B₁, on the young broiler chick. **Poultry Science**, v.72, n.3, p.456-466, 1993.

6 CONCLUSÕES

O meio de cultivo com fonte de nitrogênio orgânica proporcionou maior produção de fumonisinas pela cepa 103F de *Fusarium verticillioides*.

Dentre as cepas 103F, 113B e 103BR, a primeira apresentou maior produção de fumonisinas na condição que continha maltose e leucina como fonte de carbono e nitrogênio, respectivamente.

A produção de fumonisinas foi maior em altas concentrações de carboidratos (40 g/L) e baixas concentrações de aminoácidos (1 g/L).

O cultivo de *F. verticillioides* em 21 dias proporcionou maior produção significativa ($p < 0,05$) de fumonisinas em meio líquido.

Dentre as cepas 103F, 97K e 119B, a segunda apresentou maior produção de fumonisinas nos meios de cultivos analisados ($p < 0,05$).

A combinação glucose (20 g/L) e glicina (1 g/L) proporcionou maior produção de fumonisinas pelas cepas 103F, 97K e 119B ($p < 0,05$).

O meio de cultivo com 1 g/L de glicina proporcionou maior produção de fumonisinas pelas cepas 103F, 97K e 119B ($p < 0,05$).

REFERÊNCIAS

ABBAS, H.T., OCAMB, C.M. First report of fumonisin B₁ *Fusarium polyphialidicum* collected from seeds of *Pinus strobes*. **Plant Disease**, v.79, p.642-645, 1995.

ABOUZIED, M.M., PESTKA, J.J. Simultaneous screening of fumonisin B₁, aflatoxin b₁ and zearalenone by line immunoblot: A computer assisted multianalyte assay system. **Journal of the Association of Official Analytical Chemistry International**, v.77, n.2, p. 495-500, 1994.

ABRAMSON, D.; GAN, Z.; CLEAR, R.M.; GILBERT, J.; MARQUARDT, R. R. Relationships among deoxynivalenol, ergosterol and *Fusarium* exoantigens in Canadian hard and soft wheat. **International Journal of Food Microbiology**, v. 45, p. 217-224, 1998.

AH SEO, J., WON LEE, Y. Natural occurrence of the C series of fumonisins in moldy corn. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.1331-1334, 1999.

AVANTAGGIATO, G.; QUARANTA, F.; DESIDERIO, E. Fumonisin contamination of maize hybrids visibly damaged by *Sesamia*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 83, p. 13-18, 2002.

AYRES, J. C. Significance of food mycology – an overview. In: RHODES, M. E. **Food Mycology**, Massachusetts: G. K. Hall & Co., p. 3-10, 1979.

BACON, C. W.; NELSON, P. E. Fumonisin production in corn by toxigenic strains of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum*. **Journal of Food Protection**, v. 57, n. 6, p. 514-521, 1994.

BARROS NETO, B., SCARMINIO, I. S., BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 2.ed. Campinas: Unicamp, 2003.

BENNET, G. A.; RICHARD, J. L. Liquid chromatographic method for analysis of the naphthalene dicarboxialdehyde derivative of fumonisins. **Journal of the Association of Official Analytical Chemistry International**, v. 77., n. 2, p. 501-506, 1994.

BEZUIDENHOUT, S. C.; GELDERBLUM, W. C. A.; GORST-ALLMAN, C. P.; HORAK, R. M.; MARASAS, W. F. O.; SPITELLER, G.; VLEGGAAR, R. Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. **Journal of Chemical Society Communications**, London, v.11, p.743-745, 1988.

BLACKWELL, B. A.; MILLER, J. D.; SAVARD, M. E. Production of carbon 14-labeled fumonisin in liquid culture. **Journal of Association of Official Analytical Chemists International**. Arlington, v.77, p.506- 511, 1994.

BLACKWELL, B.A.; MILLER, J.D.; SAVARD, M.E. Production of carbon 14-labeled fumonisin in liquid culture. **Journal of Association of Official Analytical Chemists International**. v.77, p.506– 511, 1994.

BRANHAM, B. E.; PLATTNER, R. D. Alanine is a precursor in the biosynthesis of fumonisin B₁ by *Fusarium moniliforme*. **Mycopathologia**. v. 124, n. 2, p. 99-104, 1993.

BULLERMAN, L. B. Ocurrência de *Fusarium* e fumonisinas em grãos de alimentos e em alimentos. In: JACKSON, L. S.; DEVRIES, J. W.; BULLERMAN, L. B. (Ed.) **Fumonisin in food**. New York: Plenum Press, p. 27-38, 1996.

CHU, F.S.; LI, G.Y. Simultaneous occurrence of fumonisin B₁ and other mycotoxins in moldy corn collected from the People's Republic of China in regions with high incidences of esophageal cancer. **Applied and Environmental Microbiology**. v.60 n.3, p.847-852, 1994.

DIAZ, G. J.; BOERMANS, H. J. Fumonisin toxicosis in domestic animals: a review. **Veterinary & Human Toxicology**. v. 36, n. 6, p. 548-555, 1994.

DUARTE, J. O. **Embrapa Milho e Sorgo**. Sistema de produção: importância econômica, 2006. Disponível em: < <http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho/importancia.htm> >. Acesso em: 05 mai. 2006.

FRANCESCHI, S.; BIDOLI, E.; BARON, A. E.; LA VECCHIA, C. Maize and risk of cancer of the oral cavity, pharynx and esophagus in Northeastern Italy. **Journal of the National Cancer Institute**, Bethesda, v.82, p.1407-1411, 1990.

GELDERBLOM, W. C. A.; KRIEK, N. P. J.; MARASAS, W. F. O.; THIEL, P. G. Toxicity and carcinogenicity of the *Fusarium moniliforme* metabolite, fumonisin B₁ in rats. **Carcinogenesis**, Oxford, v.12, n.1-2, p.1247-1251, 1991.

GELDERBLOM, W. C. A.; SAMPLE, E.; MARASAS, W. F. O.; FARBER, E. The cancer initiating potential of the fumonisin B mycotoxins. **Carcinogenesis**. v 13, p. 433-43, 1992.

GELDERBLOM, W.C.A.; JASKIEWICZ, K.; MARASAS, W.F.O., THIEL, P.G.; HORAK, R. M.; VLEGGAR. R. KRIEK, N. P. J. Fumonisin: novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 54, n. 7, p. 1806-1811, 1988.

GLENN, A. E.; HINTON, D. M.; YATES, E.; BACON, C. W. Detoxification on corn antimicrobial compounds as the basis for isolating *Fusarium verticillioides* and some other *Fusarium* species from corn. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 7, p. 2973-2981, 2001.

HARRISON, L. R.; COLVIN, B. M.; GREEN, J. T.; NEWMAN, L. E.; COLE, J. R. Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B₁, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v.2 p.217-221, 1990.

HINOJO, M. J.; MEDINA, A.; VALLE-ALGARRA, F. M.; GIMENO-ADELANTADO, J. V.; JIMÉNEZ, M.; MATEO, R. Fumonisin production in rice cultures of *Fusarium verticillioides* under different incubation conditions using an optimized analytical method. **Food Microbiology**, v.23, p. 119-127, 2006.

HIROOKA, E. Y.; YAMAGUCHI, M. M.; AOYAMA, S.; SUGIURA, Y.; UENO, Y. Natural occurrence of fumonisins in Brazilian corn kernels. **Food Additives and Contaminants**, v. 13, n. 2, p. 173-183, 1996.

JACKSON, M. A., BENNETT, G. A. Production of Fumonisin B₁ by *Fusarium moniliforme* NRRL 13616 in Submerged Culture. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 56, n° 8, p. 2296-2298, 1990.

JIMÉNEZ, M.; MATEO, J. J.; HINOJO, M. J.; MATEO, R. Sugar and amino acids as factors affecting the synthesis of fumonisins in liquid cultures by isolates of the *Gibberella fujikuroi* complex. **International Journal of Food Microbiology**. v. 89, p. 185 – 193, 2003.

JULIAN, A.M., WAREING, P.W., PHILLIPS, S.I., MEDLOCK, V.F.P., MACDONALD, M.V., RIO, L.E. Fungal contamination and selected mycotoxins in pre and post-harvest maize in Honduras. **Mycopathologia**, v.129, p.5-16, 1995.

KELLER, S. E., SULLIVAN, T. M., CHIRTEL, S. Factors affecting the growth of *Fusarium proliferatum* and the production of fumonisin B₁: oxygen and pH. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**. v. 19, p. 305-309, 1997.

KELLER, S. E.; SULLIVAN, T. M. Liquid culture methods for the production of fumonisin. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. v.392, p.205 – 212, 1996.

KERÉNYI, Z.; ZELLER, K.; HORNOK, L.; LESLIE, J. F. Molecular standardization of mating type terminology in the *Gibberella fujikuroi* species complex. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 9, p. 4071 – 4076, 1999.

LAZZARI, F. A. **Umidade, Fungos e Micotoxinas na Qualidade de Sementes, Grãos e Rações**. 2^a edição, 148 p. Editora do autor. Curitiba, 1997.

LEESON, D. R.; DIAZ, G. J.; SUMMERS, J. D. In: _____. **Poultry metabolic disorders and mycotoxins**. Guelph: University Books, 1995.

LI, Y. C.; LEDOUX, D. R.; BERMUDEZ, A. J.; FRITSCHKE, K. L.; ROTTINGHAUS, G. E. Individual and combined effects of fumonisin B₁ and moniliformin on performance and selected immune parameters in turkey poults. **Poultry Science**, v.79, n.6, p.871-878, 2000.

MALLMANN, C. A.; SANTURIO, J. M.; ALMEIDA, C. A. A.; DILKIN, P. Fumonisin B₁ levels in cereals and feeds from southern Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.68, n. 1, p. 41-45, 2001.

MALLMANN, C., SANTURIO, J.M., DILKIN, P.; ALMEIDA, C. A. A.; MARQUES, R. R. STEFANON, E. B. C. Incidência de fumonisina B₁ em milho e rações no Brasil. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE MICOTOXICOLOGIA, 7, 1997, Maracay, Venezuela. **Anais do II Congresso Latinoamericano de Micotoxicologia**, 1997. p.73.

MARASAS, W. F. O.; KELLERMAN, T. S.; GELDERBLUM, W. C. A.; COETZER, J. A. W.; THIEL, P. G.; van der LUGT, J. J. Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B₁ isolated from *Fusarium moniliforme*. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 55, p. 197-203, 1988.

MARASAS, W. F. O.; WIENER, N. P. J.; VAN RENSBURG, S. J.; VAN SCHALKWYK, D. J. Mycoflora of corn produced in human esophageal cancer areas in Transkei, southern Africa. **Phytopathology**, v. 71, p. 792 – 796, 1981.

MARASAS, W.F.O. Discovery and occurrence of the fumonisins: A historical perspective. **Environmental Health Perspectives**, v.109, n.2,p.239-243, may 2001.

MARÍN, S.; MAGAN, N.; SERRA, J.; RAMOS, A. J.; CANELA, R.; SANCHIS, V. Fumonisin B₁ production and growth of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum*

on maize, wheat, and barley grain. **Food Microbiology and Safety**, v. 64, n.5, p. 921-924, 1999.

MEIRELLES, P. G. ***Fusarium verticillioides*: Caracterização molecular e detecção em milho através de ensaio imunoenzimático**. 2005. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, 160 p.

MISLIVEC, P. B. Specific requirements and physical factors affecting fungal growth and multiplication. In: RHODES, M. E. ed. **Food Mycology**, Boston G. K. Hall & Co., p. 20-28, 1979.

MORISSEAU, C.; WARD, B. L.; GILCHRIST, D. G.; HAMMOCK, B. D. Multiple Epoxide Hydrolases in *Alternaria alternate* f. sp. *lycopersici* and Their Relationship to Medium Composition and Host-Specific Toxin Production. **Applied and Environmental Microbiology**. v.65, n.6, p.2388-2395, 1999.

MUNKVOLD, G. P.; DESJARDINS, A. E. Fumonisin in maize: can we reduce their occurrence?, **Plant Disease**, v.81, n.6, p.556-565, 1997.

MUSSER, S. M.; PLATTNER, R. D. Fumonisin composition in cultures of *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum* and *Fusarium nygamai*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. V. 45, p. 1169-1173, 1997.

NAGARAJ, R. Y.; WU, W.D; VESONDER, R. J. Toxicity of corn culture material of *Fusarium proliferatum* M-7176 and nutritional intervention in chicks. **Poultry Science**, Campaign, v.73, n.5, p.617-626, 1994.

NELSON, N.A. Colorimetric adaptation of the Somogyi method for determination of glucose. **Journal of Biochemistry**, v. 153, p. 376-380, 1944.

NELSON, P.E. **Taxonomy and biology of *Fusarium moniliforme*** *Mycopathologia*, v.117,p.29-36,1992.

ONO, E. Y. S.; SUGIURA, Y.; HOMECHIN, M.; KAMOGAE, M.; VIZZONI, E.; UENO, Y.; HIROOKA, E.Y. Effect of climatic conditions on natural mycoflora and fumonisins in freshly harvested corn of the State of Paraná, Brazil. **Mycopathologia**, v.147, p. 139-148, 1999.

ORSI, R. B., CORRÊA, B., POSSI, C.R., SCHAMMASS, E. A.; NOGUEIRA, J. R.; DIAS, S. M. C.; MALOZZI, M. A. B. Mycoflora and occurrence of fumonisins in freshly harvested and stored hybrid maize. **Journal of Stored Products Research**. v.36, p. 75-87, 2000.

PIÑEIRO, M. S.; SILVA, G. E.; SCOTT, P. M.; LAWRENCE, A. L.; STACK, M. E. Fumonisin levels in Uruguayan corn products. **J. Assoc. off Anal. Chem.**, v. 80, p. 825 – 828, 1997.

PLACINTA, C. M., D'MELLO, J. P. F., MACDONALD, A. M. C. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* micotoxins. **Animal Feed Science and Technology**. V. 78, p. 21-37, 1999.

PLATTNER, R. D., SHACKELFORD, D. D. Biosynthesis of labeled fumonisins in liquid cultures of *Fusarium moniliforme*. **Mycopathologia**. V. 117, p. 17-22, 1992.

RHEEDER, J. P.; MARASAS, W. F. O.; VISMER, H. F. Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 5, p. 2101-2105, 2002.

RITIENI, A., MORETTI, A., LOGRIECO, A., BOTTALICO, A., RANDAZZO, G., MONTI, S.M., FERRACANE, R., FOGLIANO, V. Occurrence of fusaproliferin, fumonisin B1 and beauverecin in maize from Italy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n.45, p. 4011-4016, 1997.

ROSS, P.F.; NELSON, P.E.; RICHARD, J.L.; OSWEILER, G.D.; RICE, L.G.; PLATTNER, R.D.; WILSON, T.M. Production of fumonisins by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* isolates associated with equine leukoencephalomalacia and a pulmonary edema syndrome in swine. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, p. 3225-3226, 1990.

SAMAPUNDO, S.; DE MEULENAER, B.; ATUKWASE, A.; DEBEVERE, J.; DEVLIEGHERE, J. The influence of modified atmospheres and their interaction with water activity on the radial growth and fumonisin B₁ production of *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum* on corn. Part I: The effect of initial headspace carbon dioxide concentration. **Internacional Journal of Food Microbiology**. v. 114, p. 160-167, 2007.

SCOTT, P.M. Fumonisin. **Inst. Journal of Microbiology**, v.18, p.257-270, 1993.

SHELDON, J.L.. A corn mold. In: **Annual Rep. Agric. Exp. Stn. Nebraska**. v.17, p.23-32, 1904.

SHEPHARD, G. S. Chromatography determination of the fumonisin mycotoxins. Review. **Journal of Chromatography A**. v.815, p. 31-39, 1998.

SHEPHARD, G. S.; SYDENHAM, E. W.; THIEL, P. G.; GELDERBLUM, W. C. A. Quantitative determination of fumonisin B₁ and B₂ by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Liquid Chromatography**, v. 13, p. 2077-2087, 1990.

SHIER, T. W.; ABBAS, H. K.; BADRIA, A. F. Structureactivity relationships of the corn fungal toxin fumonisin B₁: Implications for food safety. **Journal of Natural Toxins**, Fort Collins, v.6, n.3, p.225-242, 1997.

SHIM W., WOLOSHUK, C. P. Nitrogen repression of fumonisin B₁ biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*. **FEMS Microbiology Letters**. v. 177, p. 109-116, 1999.

SOMOGYI, M. A.. A new reagent for determination of sugars, **Journal of Biological Chemistry**. v.160, p.61-68, 1945.

SYDENHAM, E. W., GERDERBLUM, W.C. A., THIEL, P.G., MARASAS, W. F. O. Evidence for the natural occurrence of fumonisin B₁ a mycotoxin produced by *Fusarium moniliforme* in corn. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 39, p. 2014 - 2018, 1991.

SYDENHAM, E.W; MARASAS, W.F.O; SHEPHARD, G.S; THIEL, P.G; HIROOKA, E.Y. Fumonisin concentration in Brazilian feeds associated with field outbreaks of animal micotoxiosis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 40, p. 994-997, 1992.

THIEL, P. G.; SHEPARD, G. S.; SYDENHAM, E. W.; NELSON, P. E.; WILSON, T. M. Levels of fumonisin B₁ and B₂ in feeds associated with confirmed cases of equine leukoencephalomalacia. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 39, p. 109-111, 1991.

THIEL, P.G., MARASAS, W.F.O., SYDENHAM, E.W. The implications of naturally occurring levels of fumonisins in corn human and animal health. **Mycopathology**, v.117, p.3-9, 1992.

UENO, Y.; AOYAMA, S.; SUGIURA, Y.; WANG, D. S.; LEE, U. S.; HIROOKA, E. Y.; HARA, S.; KARKI, T.; CHEN, G.; YU, S. Z. A limited survey of fumonisins in corn and corn-based products in Asian countries. **Mycotoxin Research**, v. 9, p. 27-34, 1993.

- UENO, Y.; IJIMA, K.; WANG, S. D.; SUGIURA, Y.; SEKIJIMA, M.; TANAKA, T.; CHEN, C.; YU, S. Z. Fumonisin as a possible contributory risk factor for primary liver cancer. A 3-year study of corn harvested in Haimen, China, by HPLC and ELISA. **Food and Chemical Toxicology**, v.35, p.1143-1150, 1997.
- VISCONTI, A., BOENKE, A. Improvement of the determination of fumonisins (FB₁ and FB₂) in maize and maize-based feeds, **European Commission BCR Information – Chemical Analysis**. Brussels, Belgium, 1995.
- WANG, D.S.; LIANG, Y.X.; IJIMA, K.; SUGIURA, Y.; TANAKA, T.; CHEN, G.; YU, S. Z.; UENO, Y. Co-contamination of mycotoxins in corn harvested in Haimen, a high risk area of primary liver cancer in China. **Mycotoxins**. v.41, p.67-70, 1995.
- WANG, E.; NORRED, W. P.; BACON, C. W.; RILEY, R. T.; MERRILL Jr., A. H. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. Implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 22, p. 14486-14490, 1991.
- WEIBKING, T.; LEDOUX, D. R.; BERMUDEZ, A. J.; TURK, J.R.; ROTTINGHAUS, G. E.; WANG, E.; MERRILL, A. H. Effects of feeding *Fusarium moniliforme* culture material, containing known levels of fumonisin B₁, on the young broiler chick. **Poultry Science**, Champaign, v.72, n.3, p.456-466, 1993.
- YAMAGUCHI, M.M., HIROOKA, E.Y., SHIBATA, T.M.M. Fumonisin em milho no Estado do Paraná. In: ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS, 7, São Paulo, 1992. **Anais do 7º Encontro Nacional de Micotoxinas**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1992. p.27.