



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

VIRGÍNIA CARLA DE ALMEIDA FALCÃO

Fusarium verticillioides:

AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE FUMONISINAS,
SUSCETIBILIDADE A FUNGICIDAS E DA EFICÁCIA DE
ADSORVENTES INORGÂNICO E ORGÂNICO NA REMOÇÃO
DE FUMONISINA B₁

Londrina
2009

VIRGÍNIA CARLA DE ALMEIDA FALCÃO

Fusarium Verticillioides:

AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE FUMONISINAS,
SUSCETIBILIDADE A FUNGICIDAS E DA EFICÁCIA DE
ADSORVENTES INORGÂNICO E ORGÂNICO NA REMOÇÃO
DE FUMONISINA B₁

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Biotecnologia, do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como um dos requisitos para a obtenção do Título de mestre.

Orientador (a): Prof^ª Dr^ª. Elisabete Yurie Sataque Ono.

Londrina
2009

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

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

F178f Falcão, Virgínia Carla de Almeida.

Fusarium verticillioides: avaliação da produção de fumonisinas, suscetibilidade a fungicidas e da eficácia de adsorventes inorgânico e orgânico na remoção de fumonisina B₁ / Virgínia Carla de Almeida Falcão. – Londrina, 2009.
76 f. : il.

Orientador: Elisabete Yurie Sataque Ono.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2009.
Inclui bibliografia.

1. *Fusarium verticillioides* – Teses. 2. Micotoxinas – Teses. 3. Milho – Produtividade – 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

VIRGÍNIA CARLA DE ALMEIDA FALCÃO

Fusarium Verticillioides:

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE FUMONISINAS, SUSCETIBILIDADE A
FUNGICIDAS E DA EFICÁCIA DE ADSORVENTES INORGÂNICO E
ORGÂNICO NA REMOÇÃO DE FUMONISINA B₁**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Biotecnologia, do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como um dos requisitos para a obtenção do Título de mestre.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Elisabete Yurie Sataque Ono
UEL – Londrina – PR

Prof^ª. Dr^ª. Elisa Yoko Hirooka
UEL – Londrina – PR

Prof^ª. Dr^ª. Tereza Cristina Rocha M. de Oliveira
UEL – Londrina – PR

Londrina, 13 de julho de 2009.

DEDICATÓRIA

Dedico esta obra aos meus queridos pais
Genilda Rodrigues de Almeida Falcão e José
Jailton Falcão Noberto pelo amor, apoio,
confiança, fé e incentivo constantes, sem os
quais nada poderia conquistar.

AGRADECIMENTOS

A Prof^a Dr^a Elisabete Yurie Sataque Ono pela orientação, paciência e ensinamentos fundamentais para realização deste trabalho.

Ao CNPq, Fundação Araucária, Fundo Paraná/SETI, PPSUS/Ministério da Saúde, CNPq/MAPA, CAPES pelo apoio financeiro.

A prof^a Dr^a Elisa Yoko Hirooka pela disponibilidade dos fungos do gênero *Fusarium*.

Aos docentes do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia pelos ensinamentos valiosos durante todo o curso.

Ao Prof Dr. Antônio Sérgio de Oliveira pela oportunidade e disponibilidade dos materiais adsorventes para realização deste trabalho.

A Prof^a Dr^a Tereza Cristina Rocha Moreira de Oliveira pelas sugestões e críticas construtivas.

Aos Professores Dr. Martim Homechin e Dr^a Débora Cristina Santiago pela colaboração.

A Prof^a Dr^a Célia Guadalupe Tardeli de Jesus Andrade e o técnico Osvaldo Capello do Laboratório de Microscopia e Microanálise (UEL) pela colaboração na obtenção das imagens de *F.verticillioides* e adsorventes.

A Prof^a Dr^a Sandra Garcia pela colaboração.

A Syngenta Proteção de Cultivos LTDA pelo fornecimento do fungicida Maxim XL.

Ao técnico do Departamento de Bioquímica Nelson Janeiro Rodriguez pela amizade e auxílio técnico indispensáveis.

A Elaine Cunha Moreno pela sua ajuda indispensável do começo ao fim no desenvolvimento deste trabalho e pela amizade.

A Tatiana Ávila Miguel por todo trabalho na obtenção das imagens de *F.verticillioides*.

Aos colegas de laboratório e estagiários Gervásio Hitoshi Saito, Jaqueline Bordini Gozzi pelo carinho, amizade e colaboração na realização deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia (CCE/UEL): Elda Jonas Aguiar, Sílvia Borba da Costa Avelino, Sérgio Nascimento Evangelista, Sandra Aparecida Defende, Neusa Zamuner de Souza e colegas de laboratório pela amizade, colaboração e auxílio.

A funcionária do Departamento de Ciências e Tecnologia de Alimentos (CCA/UEL) Patrícia Sambatti pela colaboração.

Aos colegas de Mestrado em Biotecnologia pela amizade e companheirismo durante as práticas e disciplinas do curso.

A todos os alunos da Prof^a Dr^a Elisa Yoko Hirooka pela colaboração.

Ao Fr Gilberto Hickmann pelo apoio, carinho e incentivos constantes nos momentos difíceis.

A Josana Maria Messias pela amizade e carinho

A todos que contribuíram de todas as formas para que este trabalho fosse finalizado.

“Saber não é suficiente; temos que aplicar.
Ter vontade não é suficiente: temos que
implementá-la” (Goethe).

FALCÃO, Virgínia Carla de Almeida. *Fusarium verticillioides*: avaliação da produção de fumonisinas, suscetibilidade a fungicidas e da eficácia de adsorventes inorgânico e orgânico na remoção de fumonisina B₁. 2009. 76 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

RESUMO

Fusarium verticillioides é um fungo predominante em milho e principal produtor de fumonisinas, um grupo de micotoxinas que causam sérias perdas econômicas, além de riscos à saúde humana e animal. O objetivo deste estudo foi avaliar a produção de fumonisinas de 16 cepas de *F. verticillioides*, o efeito dos fungicidas quintozeno e Maxim-XL (fludioxonil + metalaxil-M) no crescimento micelial *in vitro*, assim como o efeito de fludioxonil + metalaxil-M na morfologia micelial e produção de fumonisinas em meio de cultura líquido definido. Paralelamente, a eficácia do aluminossilicato de sódio e cálcio hidratado (HSCAS), β-glucana e glucomanano modificado (produto comercial) na adsorção de fumonisina B₁ em milho triturado inoculado com *F. verticillioides* 103F foi avaliado. Todas as cepas de *F. verticillioides* produziram FB₁ e FB₂ com concentrações que variaram de 2,41 a 3996,36 µg/g e 1,18 a 1209,91 µg/g, respectivamente. As concentrações de fumonisinas totais (FB₁ + FB₂) variaram de 3,59 a 5119,26 µg/g. *F. verticillioides* 103F produziu maior concentração de fumonisinas (5119,26 ± 400,25 µg/g), entretanto esta concentração não diferiu estatisticamente daquelas produzidas pelas cepas 119B, 97K e 119BR quando comparada pelo teste de Tukey (p < 0,05). As cepas de *F. verticillioides* foram inoculadas em ágar batata dextrose contendo quintozeno (75, 375, 1875, 9375 µg/mL) e fludioxonil + metalaxil-M (1,5 + 0,6, 7,5 + 3, 37,5 + 15, 187,5 + 75 µg/mL) para avaliar o efeito destes fungicidas no crescimento micelial *in vitro*. As cepas de *F. verticillioides* mostraram uma grande variabilidade em relação à dose do fungicida que inibe 50% do crescimento micelial (ED₅₀). O mais elevado e o mais baixo valor de ED₅₀ para quintozeno foi 1679,3 µg/mL e 183,2 µg/mL para as cepas 119 B e 97K, respectivamente. Para o fludioxonil + metalaxil-M, as cepas 113B e 103F mostraram o mais elevado (38,4 + 15,4 µg/mL) e o mais baixo (1,4 + 0,7 µg/mL) valor de ED₅₀, respectivamente. O quintozeno foi ineficaz na inibição do crescimento micelial *in vitro* de todas as 16 cepas de *F. verticillioides*, considerando que os valores dos ED₅₀ foram > 50 µg/mL. Por outro lado, fludioxonil + metalaxil-M foram eficazes na inibição do crescimento micelial *in vitro* das cepas de *F. verticillioides* 113F, 164G e 103G, mas moderadamente eficazes para as outras 13 cepas analisadas. A adição de fludioxonil + metalaxil-M na concentração recomendada pelo fabricante (25 + 10 mg/mL ingrediente ativo) ao meio de cultura líquido definido inoculado com *F. verticillioides* 103F causou alterações morfológicas pronunciadas às hifas após 14 dias a 25°C, isto é, malformação, inchaço, enrugamento, formação de estruturas esféricas. Além disso, a adição do fungicida ao meio de cultura aumentou a concentração de FB₁ (2,57 µg/mL) quando comparada ao controle (média 0,72 µg/mL). A adição de adsorventes a 0,5% no milho triturado contaminado contendo 81,9 µg/g de FB₁ após 30 min de reação mostrou que a β-glucana adsorveu 49% de FB₁. A β-glucana (50%) + HSCAS (50%) e HSCAS apresentaram uma capacidade de adsorção de 29% e 18,7% de FB₁, respectivamente. No milho triturado contaminado contendo 1.529,23 µg/g de FB₁, o HSCAS adsorveu 45% de FB₁ e β-glucana (75%) + HSCAS (25%) adsorveu 51,7% de FB₁ em 30 e 90 minutos de reação, respectivamente. Não houve adsorção de FB₁ quando os adsorventes a 0,5 % foram adicionados ao milho triturado contaminado contendo 5, 10 e 20 µg/g FB₁, conseqüentemente mais estudos são necessários para otimizar a capacidade de adsorção. Além disso, o fludioxonil + metalaxil-M na dose recomendada pelo fabricante causou um aumento na produção média de FB₁, demonstrando que o efeito dos fungicidas na produção de micotoxinas deve ser considerado, além do controle do fitopatógeno.

Palavras-chaves: Milho. *Fusarium verticillioides*. Crescimento micelial. Quintozeno. Fludioxonil + metalaxil-M. ED₅₀. Fumonisina B₁. β-glucana. HSCAS. Glucomanano modificado.

FALCÃO, Virgínia Carla A. *Fusarium verticillioides*: Evaluation of fumonisin production, susceptibility to fungicides and effectiveness of inorganic and organic adsorbents on fumonisin B₁ removal. 2009. 76 f. Dissertation (Master's Degree in Biotechnology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

ABSTRACT

Fusarium verticillioides is a prevalent fungus in corn and the main fumonisin producer, a group of mycotoxins that causes serious economic losses, in addition to the human and animal health hazard. The aims of this study were to evaluate the fumonisin production of 16 *F. verticillioides* strains, the effect of quinterozone and Maxim-XL (fludioxonil + metalaxil-M) fungicides on *in vitro* mycelial growth, as well as the effect of fludioxonil + metalaxil-M on mycelial morphology and fumonisin production in defined liquid culture medium. In parallel, the efficacy of hydrated sodium and calcium aluminosilicate (HSCAS), β -glucan and modified glucomannan (commercial product) to adsorb fumonisin B₁ from culture material (ground corn inoculated with *F. verticillioides* 103F) was evaluated. All *F. verticillioides* strains produced FB₁ and FB₂ with levels ranging from 2.41 to 3996.36 $\mu\text{g/g}$ and from 1.18 to 1209.91 $\mu\text{g/g}$, respectively. Total fumonisin (FB₁ + FB₂) levels ranged from 3.59 to 5119.26 $\mu\text{g/g}$. *F. verticillioides* strain 103F produced the highest total fumonisin level (5119.26 \pm 400.25 $\mu\text{g/g}$), but this level was not statistically different from those produced by 119B, 97K and 119BR strains when compared by the Tukey test ($p < 0.05$). *F. verticillioides* strains were inoculated on potato dextrose agar added with quinterozone (75, 375, 1875, 9375 $\mu\text{g/ml}$) and fludioxonil+metalaxil-M (1.5 + 0.6, 7.5 + 3, 37.5 + 15, 187.5 + 75 $\mu\text{g/ml}$) in order to evaluate the effect of these fungicides on *in vitro* mycelial growth. *F. verticillioides* strains showed a large variability concerning, the fungicide dose that inhibits 50% of mycelial growth (ED₅₀); for quinterozone, 119B and 97K strains showed the highest (1679.3 $\mu\text{g/ml}$) and the lowest (183.2 $\mu\text{g/ml}$) ED₅₀ values, whereas for fludioxonil + metalaxil-M, 113B and 103F strains showed the highest (38.4 + 15.4 $\mu\text{g/ml}$) and the lowest (1.4 + 0.7 $\mu\text{g/ml}$) ED₅₀ values, respectively. Quinterozone was ineffective in inhibiting *in vitro* growth of all the 16 *F. verticillioides* strains, taking into account that their ED₅₀ values were $> 50 \mu\text{g/ml}$. On the other hand, fludioxonil + metalaxil-M was effective in inhibiting *in vitro* growth of 113F, 164G and 103G *F. verticillioides* strains, but moderately effective for other 13 strains. Addition of fludioxonil + metalaxil-M at recommended commercial concentration (25 + 10 mg/ml active ingredient) into the defined liquid culture medium inoculated with *F. verticillioides* 103F and incubated for 14 days at 25 °C caused pronounced morphological alterations to the hyphae, i.e., malformation, swelling, wrinkling, formation of spherical structures. In addition, fungicide inclusion into the culture medium increased mean FB₁ levels (2.57 $\mu\text{g/ml}$) compared to the control (mean 0.72 $\mu\text{g/ml}$). Addition of adsorbents at 0.5% to the culture material containing 81.9 $\mu\text{g/g}$ FB₁ for 30 min showed that β -glucan binded 49% FB₁, whereas β -glucan (50%) + HSCAS (50%) and HSCAS had a binding capacity of 29% and 18.7% FB₁, respectively. In culture material containing 1529.23 $\mu\text{g/g}$ FB₁, HSCAS binded 45% FB₁ (30 min), whereas β -glucan (75%) + HSCAS (25%) adsorbed 51.7% FB₁ in a 90 min reaction time. There was no FB₁ binding when adsorbents at 0.5% were added to the culture material containing 5, 10 and 20 $\mu\text{g/g}$ FB₁, therefore more studies are necessary in order to optimize the adsorption capacity. Moreover, taking into account that fludioxonil + metalaxil-M at manufacturer's recommended dose caused an increase in mean FB₁ production, the effect of fungicides on mycotoxin production in addition to the phytopathogen control should be considered.

Keywords: Corn. *Fusarium verticillioides*. Mycelial growth. Quinterozone. Fludioxonil+metalaxil-M. ED₅₀. Fumonisin B₁. β -glucans. HSCAS. Modified glucomannan.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química da Fumonisina B1	20
Figura 2 – Fórmula estrutural do pentacloronitrobenzeno (PCNB)	22
Figura 3 – Fórmula estrutural do fludioxonil	23
Figura 4 – Fórmula estrutural do metalaxil-M	24
Figura 5 – Estrutura de HSCAS.....	28
Figura 6 – Modelo 3D da molécula de β -glucana de levedura	31
Figura 7 – Parede celular da levedura <i>S. cerevisiae</i>	31
Figura 8 – Conformação favorável de AFB1 na única hélice da cadeia (1 \rightarrow 3) β - D-glucana	32
Figura 9 – Estrutura de glucamanano modificado no trato gastrointestinal	33
Figura 10 – Adsorção (%) a partir do milho triturado contaminado contendo 81,94 $\mu\text{g/g}$ de FB1 empregando adsorventes na concentração de 0,5% (m/v) com tempo de reação de 30 minutos. (A) β -glucana, (B) (β -glucana) 50% + 50% (HSCAS), (C) HSCAS e (D) Glucomanano modificado	54
Figura 11 – Adsorção (%) a partir de milho triturado contaminado contendo 1.529,23 $\mu\text{g/g}$ de FB1 empregando os adsorventes a 0,5% (m/v) em 30 minutos de reação (A) β -glucana, (B) (β -glucana) 50% + 50% (HSCAS), (C) HSCAS e (D) Glucomanano modificado.....	55
Figura 12 – Adsorção (%) a partir de milho triturado contaminado contendo 1.529,23 $\mu\text{g/g}$ de FB.....	55

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	14
2.1	OBJETIVO GERAL	14
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1	MILHO	15
3.2	FUSARIUM VERTICILLIOIDES	16
3.3	MICOTOXINAS	17
3.3.1	Fumonisinias	19
3.4	MÉTODOS DE CONTROLE DA CONTAMINAÇÃO POR MICOTOXINAS	20
3.4.1	Fungicidas utilizados no controle de F. verticillioides	20
3.4.1.1	Quintozeno	21
3.4.1.2	Fludioxionil + metalaxil-M	22
3.5	MÉTODOS BIOLÓGICOS	24
3.6	MÉTODOS DE DESCONTAMINAÇÃO	25
3.6.1	Métodos químicos	25
3.6.2	Métodos físicos	26
3.6.2.1	Aluminossilicatos	28
3.6.2.2	β -glucanas	30
3.6.2.3	Glucomanano modificado	32
4	MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1	MATERIAL	34
4.1.2	Cepas de F. verticillioides	34
4.1.3	Fungicidas	34
4.1.4	Adsorventes	34
4.2	METODOLOGIA EXPERIMENTAL	35
4.2.1	Avaliação da Suscetibilidade in vitro de F. verticillioides a Fungicidas	35
4.2.2	Cultivo de F. verticillioides para Avaliação da Produção de Fumonisinias	35

4.2.3	Efeito do Fungicida Maxim-XL na Produção de Fumonisina por <i>F. verticillioides</i> em Meio Líquido Definido.....	36
4.2.4	Microscopia Eletrônica de Varredura.....	36
4.2.5	Preparo de Milho Triturado Contaminado	37
4.2.6	Teste de Adsorção	37
4.2.7	Determinação de fumonisinas	38
4.2.8	Análise Estatística	39
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
	ARTIGO: “ <i>Fusarium verticillioides</i> : Evaluation of fumonisin production and effect of fungicides on in vitro inhibition of mycelial growth”	40
5.1	AVALIAÇÃO DE ADSORVENTES INORGÂNICO E ORGÂNICO NA REMOÇÃO DE FUMONISINA B1 A PARTIR DE MILHO TRITURADO CONTAMINADO.....	52
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	56
	REFERÊNCIAS	57
	ANEXO.....	68
	ANEXO A – Normas para publicação no periódico <i>Mycopathologia</i>	69

1 INTRODUÇÃO

A qualidade nutricional dos grãos, o cultivo em áreas com mudanças constantes de temperatura e umidade e o armazenamento inadequado predisõem o milho à contaminação por fungos produtores de micotoxinas (CHRISTENSEN; SAUER, 1982; PLACINTA et al., 1999; SPAHR et al., 1999; AYRES, 1979).

As fumonisinas constituem um grupo de micotoxinas produzidas principalmente por *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg encontrados frequentemente em grãos de milho. Além dos riscos à saúde humana e animal, causam grandes prejuízos econômicos nos diversos setores comerciais incluindo produtores de grãos, criadores de animais, consumidores e indústrias (ASEVEDO et al., 1994; ORSI et al., 2000; SILVA et al., 2001).

O consumo de alimentos e rações contaminadas com fumonisinas podem estar relacionadas a diversas doenças. As fumonisinas causam leucoencefalomalácia em eqüinos (ELEM), edema pulmonar em suínos e redução do desenvolvimento e imunossupressão em aves. Em ratos, foi comprovada a ação hepatotóxica e hepatocarcinogênica e em seres humanos estudos epidemiológicos indicam a provável associação com câncer esofágico e hepático (GELDERBLUM et al., 1991; PITT, 2000; MARASAS, 2001; BUTCHKO; PLATTNER; PROCTOR, 2003).

Os danos e os prejuízos econômicos resultantes da contaminação de grãos de milho por *F. verticillioides* e fumonisinas podem ser reduzidos utilizando diversos métodos de prevenção e detoxificação (PARK, 1993; RAMOS; HERNANDEZ, 1997). Os adsorventes orgânicos (β -glucanas) e inorgânicos (aluminossilicato de sódio e cálcio hidratado-HSCAS) são utilizados na remoção de micotoxinas em rações. A eficiência desse método de detoxificação está relacionada à estrutura química dos adsorventes e características das micotoxinas, sendo um método eficaz e de custo acessível (SCHEIDELER, 1993; SCHELL et al., 1993).

Em estudo *in vitro*, a adsorção de FB₁ utilizando HSCAS a 0,5% (m/v) em extrato de malte artificialmente contaminado com 500, 100 e 200 μ g/Kg de FB₁ variou de 85,25% a 91,97% (ALY et al., 2004). O produto comercial Mycorsob[®] (glucomanano modificado) adicionado a 0,1% e 0,2% na dieta experimental de cordonas contaminado com aurofusarina em um nível de 26,4 mg/Kg, apresentou um efeito protetor contra

aurofusarinotoxicose em codornas melhorando a qualidade dos ovos (DVORSKA, et al., 2003).

Outra estratégia para minimizar a contaminação por micotoxinas consiste no controle químico utilizando fungicidas. Os fungicidas apresentam propriedades químicas e biológicas distintas, podendo ser constituídos de diversos princípios de controle, sendo que sua eficácia depende da época de plantio, metodologia de aplicação e estágio do desenvolvimento da doença (KIMATI, 1995).

Vários fungicidas têm sido avaliados quanto ao efeito no controle dos fungos presentes nas sementes de milho, sendo que o fludioxonil + metalaxil-M (Maxim-XL) proporcionou um aumento de 56% no rendimento de grãos (GOULART; FIALHO, 2001).

O fludioxonil age por contato e apresenta amplo espectro de ação, atuando sobre histidinas quinases denominadas MAP quinases (*mitogen activated protein*) responsáveis pela regulação de atividades como expressão gênica, mitose, diferenciação celular, virulência, conidiação, germinação de conídios, sobrevivência e crescimento invasivo de hifas (XU, 2000; ZHAO; MEHRABI; XU, 2007). O metalaxil-M age na inibição da síntese do RNA ribossomal, interferindo na síntese de proteínas, inibindo o crescimento do micélio e a formação de esporos (MONKIEDJE; ILORI; SPITELLER, 2002; SYNGENTA, 2009).

O quintozeno age na inibição do crescimento das hifas, por ser um inibidor competitivo do inositol que é uma substância requerida para o crescimento de muitos fungos (BARMAC.COM, 2009). Pertence ao grupo químico dos cloroaromáticos sendo indicado para tratamento de sementes, solo, viveiros e canteiros por inibir o crescimento fúngico (ANDREI, 1996).

Considerando que o milho, matéria prima básica na formulação de ração, apresenta alta frequência de contaminação por *F. verticillioides* e fumonisinas, a avaliação da suscetibilidade das cepas desse fungo a fungicidas, assim como a eficácia de adsorventes na remoção de fumonisinas é relevante para minimizar a contaminação e reduzir os riscos à saúde humana e animal.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a produção de fumonisinas e o efeito de fungicidas quintozeno e Maxim XL (fludioxonil + metalaxil-M) sobre o crescimento micelial *in vitro* de *Fusarium verticillioides*, assim como a eficácia de adsorventes inorgânico e orgânico na remoção de fumonisina B₁.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a suscetibilidade de *F. verticillioides* aos fungicidas quintozeno e fludioxonil + metalaxil-M.

Avaliar a produção de fumonisinas das cepas de *F. verticillioides*.

Determinar a concentração de quintozeno e fludioxonil + metalaxil-M que inibe 50 % do crescimento de *F. verticillioides* e avaliar a possível associação com a produção de fumonisinas.

Avaliar o efeito do fungicida Maxim XL (fludioxonil + metalaxil-M) na produção de fumonisinas pela cepa 103F em meio líquido.

Avaliar a eficácia do aluminossilicato de sódio e cálcio hidratado (HSCAS), glucomanano modificado (produto comercial) e β -glucana na adsorção de fumonisina B₁ em milho triturado e artificialmente contaminado.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 MILHO

O milho (*Zea mays* L.) é uma das culturas mais importantes no cenário agrícola mundial, constituindo uma considerável fonte de energia na alimentação humana e animal. Apresenta ampla aplicação industrial derivando mais de 500 produtos, além da perspectiva de emprego na produção de biocombustíveis visando substituir o petróleo.

A produção de milho destina-se a vários setores, sendo que o aumento da demanda favoreceu o crescimento da suinocultura e avicultura, por ser componente de rações para esses animais. Com relação à alimentação humana, destina-se à composição de diversos produtos processados, incluindo cereais matinais, “snacks”, “cornflakes”, semolina, massas e biscoitos (MUNKVOLD; DESJARDINS, 1997).

Os maiores produtores mundiais de milho são os Estados Unidos, China e Brasil (EMBRAPA, 2007).

No Brasil o milho é cultivado em praticamente todo o território nacional, sendo o Paraná o maior produtor. A safra brasileira de milho de 2008/2009 estima uma área plantada entre 9,4 e 9,6 milhões de hectares, indicando uma redução de 2,6% a 0,8% em comparação à safra anterior, quando a área total semeada com milho ficou em 14,3 milhões de hectares. Os principais Estados responsáveis por esse decréscimo são Paraná, Santa Catarina, São Paulo, Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul. Por outro lado os Estados do Rio Grande do Sul e Minas Gerais, demonstram crescimento de áreas, porém, insuficiente para compensar as reduções em outras regiões (CONAB, 2009).

O cultivo em áreas com mudanças constantes de temperatura e umidade e o armazenamento inadequado predispõem o milho ao crescimento de fungos produtores de micotoxinas (CHRISTENSEN; SAUER, 1982; PLACINTA; D’MELLO; MACDONALD, 1999; SPAHR et al., 1999).

As interações de diversos fatores contribuem para o crescimento fúngico e a produção de toxinas como fatores geográficos, susceptibilidade da variedade, população de plantas, sistema de cultivo, potencial produtivo do híbrido, condição de armazenamento. Além destes fatores outros parâmetros como aeração, teor de umidade no solo, elevadas temperaturas durante o dia, baixas temperaturas durante a noite, solos deficientes em

nutrientes e diferentes substratos contribuem para a produção de micotoxinas por *Fusarium* spp. (CAHAGNIER; MELCION; RICHARD-MOLARD, 1995; ABBAS et al., 2002; SORIANO; DRAGACCI, 2004).

As micotoxinas podem contaminar grãos de cereais de duas maneiras. Primeiramente os fungos crescem como patógenos em plantas, secundariamente, os fungos desenvolvem-se em cereais armazenados. Entretanto nem todos os fungos produzem micotoxinas ou produzem em quantidades pequenas dependendo do substrato no qual estão se desenvolvendo. A alta taxa de contaminação de grãos de cereais e rações animais tem sido relatada mundialmente (PLACINTA; D'MELLO; MACDONALD, 1999; SPAHR et al., 1999).

3.2 *FUSARIUM VERTICILLIOIDES*

O gênero *Fusarium* constitui um dos principais problemas na agricultura mundial e suas espécies estão adaptadas em diversos habitats (NELSON et al., 1992; DOKO et al., 1996). As espécies de *Fusarium* produtoras de fumonisinas são principalmente *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg que possui a fase teleomórfica ou sexuada (*Gibberella moniliformis* Wine) (BULLERMAN, 1996; SAMSON; HOEKSTRA; FRISVAD, 2004) e *F. proliferatum* (T. Matsushima) Nirenberg. As duas espécies são associadas ao milho, sendo a primeira prevalente (MILLER, 1995).

As colônias das espécies de *Fusarium* apresentam diversas cores (branco, rosa pálido, roxo, alaranjado, púrpura), dependendo do pH do substrato. Os micélios podem ser ralos, cotonosos como um feltro e com uma zona central de funículos (SEIFERT, 2001). *F. verticillioides* possui microconidióforos sem ramificações formadas no micélio aéreo, com 1-3 alongamentos simples de fiálides. As formas de esporos são os microconídios e os macroconídios. Os microconídios são unicelulares, claviformes com uma base redonda ou truncada e os macroconídios são delgados e septados (3-7 septos), retos ou ligeiramente curvos, fusiformes com célula apical alongada frequentemente curvados e pediculados (SAMSON; HOEKSTRA; FRISVAD, 2004).

A temperatura ótima para crescimento de *F. verticillioides* situa-se entre 22,5 e 27,5°C, ficando a máxima entre 32 e 37°C e a mínima entre 2,5 e 5,0°C, porém deve-se

ressaltar que existem variações marcantes entre as cepas sendo que algumas não crescem abaixo de 6°C e acima de 30°C (BACON; NELSON, 1994).

Apesar de crescerem em diferentes faixas de temperatura, necessitam de alta atividade de água e de teores de umidades acima de 18%. As condições ótimas para o desenvolvimento de *F. verticillioides* em milho são temperatura de 25°C e atividade de água (a_w) de 0,98 (MARÍN et al., 1998; TORRES et al., 2003).

F. verticillioides, espécie de ampla distribuição geográfica, tem sido encontrada como um contaminante freqüente em milho e derivados em diversos países como África, China, França, Indonésia, Itália, Filipinas, América do Sul, Tailândia, Estados Unidos, Polônia, Argentina e Brasil. Causa danos a plantações e prejuízos de bilhões de dólares nos Estados Unidos e no mundo (FOOD RESEARCH INSTITUTE, 1997).

F. verticillioides pode causar doença em todos os estágios de desenvolvimento do milho infectando raízes, caules e grãos. O ciclo da fumonisina no milho inicia-se com o fungo remanescente nos resíduos de colheitas anteriores, que produz hifas espessas capazes de prolongar a sobrevivência, e contaminar as sementes no solo, transmitindo o fungo para o colmo com conseqüente disseminação para a espiga (MUNKVOLD; DESJARDINS, 1997). Outro mecanismo de infecção é por meio de lesões na semente provocadas por pássaros ou insetos (WICKLOW et al., 1988).

3.3 MICOTOXINAS

O termo micotoxina é originário da palavra grega mykes (fungo) e de uma palavra do latim toxicum (toxina), que significa toxina fúngica (BULLERMAN, 1979). As micotoxinas existem desde a idade mais antiga, entretanto tornaram-se mais conhecidas após o acidente ocorrido na Inglaterra em 1960 em que mais de 100.000 perus morreram devido à ingestão de torta de amendoim de origem brasileira contaminada com aflatoxina (YIANNIKOURIS; JOUANY, 2002).

Micotoxinas são compostos orgânicos de baixa massa molecular, produzidos durante o metabolismo secundário de diferentes gêneros fúngicos. Ocorrem em diferentes substratos, incluindo os produtos agrícolas, e apresentam diferentes estruturas químicas (HUWIG et al., 2001). Alguns metabólitos secundários de fungos são utilizados

como agentes terapêuticos, como por exemplo, a fumagilina, ácido fusárico e ácido micofenólico (CAST, 2003).

Os principais fungos produtores de micotoxinas pertencem aos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Claviceps* e *Alternaria* (SWEENEY; DOBSON, 1998). As micotoxinas mais freqüentes são aflatoxinas, ocratoxina A, tricotecenos, zearalenona e fumonisinas, que podem estar presentes em alimentos e rações animais.

A toxicidade de micotoxinas tanto em seres humanos como em animais depende de vários fatores como a quantidade de micotoxina ingerida diariamente por meio de alimentos contaminados, estado fisiológico do organismo afetado, idade e peso do indivíduo (PERAICA et al., 1999).

O consumo de alimentos contaminados com micotoxinas a longo prazo pode induzir inúmeros distúrbios que resultam em efeitos teratogênicos, carcinogênico (principalmente fígado e rim), estrogênico, ou imunossupressivo. Embora os animais e homens sejam suscetíveis a esses efeitos, os animais apresentam mais probabilidade de contaminação devido à ingestão de grãos de baixa qualidade (D'MELLO; PLACINTA; MACDONALD, 1999).

Além dos efeitos tóxicos os alimentos contaminados induzem à recusa alimentar, reduzindo a conversão alimentar, diminuição de peso, aumento da incidência de infecção devido à imunossupressão, e interferência na capacidade reprodutiva (CAST, 1989; KUBENA; HARVEY; BAILEY, 1998).

Para preservar a saúde de consumidores alguns países desenvolvidos apresentam legislação específica para a comercialização de produtos contaminados por micotoxinas acima de determinados níveis máximos, incluindo-se alguns países em desenvolvimento, como, Brasil, Argentina, Uruguai e Paraguai (RAMOS; HERNANDEZ, 1997).

Diversos métodos são utilizados na prevenção, descontaminação e diminuição da contaminação fúngica e a produção de micotoxinas e seus efeitos tóxicos (JOUNAY, 2007).

3.3.1 Fumonisinias

As fumonisinias, descobertas em 1988, constituem um grupo de micotoxinas produzidas principalmente por *F. verticillioides* (GELDERBLUM, et al., 1988). No entanto, outras espécies do gênero *Fusarium* também são produtoras de fumonisinias: *F. proliferatum*, *F. nygamai*, *F. anthophilum*, *F. dlamini*, *F. napiforme*, *F. subglutinans*, *F. polyphialidicum*, e *F. oxysporum* (NELSON, 1992). As moléculas de fumonisinias são estruturalmente relacionadas e, desde a sua descoberta, foram isolados e caracterizados 28 análogos divididos em quatro grupos principais (A, B, C e P). No entanto, apenas as FB₁, FB₂ e FB₃ ocorrem em concentrações significativas como contaminantes naturais de milho e derivados, sendo a FB₁ (Figura 1) considerada a mais tóxica e abundante, correspondendo a 60% a 90% das fumonisinias (MUSSER; PLATTNER, 1997; SEO; LEE, 1999; RHEEDER; MARASAS; VISMER, 2002). A FB₁ é um diéster de propano-1, 2, 3-ácido tricarbóxico e 2-amino-12, 16 dimetil 3, 5, 10, 14, 15 pentahidroieicosano, em que os grupos hidroxilas no C14 e C15 estão esterificados com um grupo carboxila terminal do ácido tricarbóxico (BEZUIDENHOUT et al., 1988).

As fumonisinias são moléculas polares, solúveis em água e acetonitrila e insolúveis em solventes orgânicos (MURPHY et al., 2006; DILKIN et al., 2002).

A biossíntese de fumonisinias ocorre entre 20 e 30°C em substratos com a_w de 0,85 a 1,0, sendo que as condições ótimas são 25°C e a_w de 0,97 (CAHAGNIER et al., 1995; MARIN et al., 1995 e 1998).

As fumonisinias interferem no metabolismo da esfingosina-esfinganina (So-Sa), bloqueando a biossíntese de esfingolipídios por meio da inibição da esfingosina-N-aciltransferase. Os esfingolipídios são encontrados nas membranas celulares, desempenhando um papel fundamental na regulação celular e no controle de proteínas de membranas, mediando o crescimento, a diferenciação e a morte celular (TURNER; NIKIEMA; WILD, 1999).

As fumonisinias causam câncer renal e hepático em roedores de laboratório, leucoencefalomalácia em eqüinos, uma lesão de cérebro que pode ser fatal aos cavalos consumindo ração contaminada por alguns dias, e edema pulmonar em suínos. Estudos epidemiológicos indicam a sua provável associação com câncer esofágico e hepático em seres humanos (PITT, 2000; MARASAS, 2001; BUTCHKO; PLATTNER; PROCTOR, 2003).

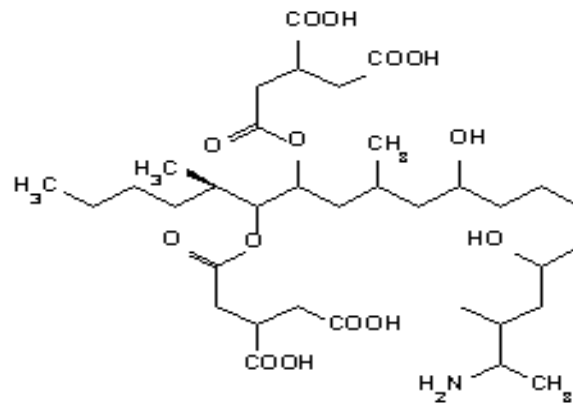


Figura 1 – Estrutura química da fumonisina B₁

3.4 MÉTODOS DE CONTROLE DA CONTAMINAÇÃO POR MICOTOXINAS

3.4.1 Fungicidas Utilizados no Controle de *Fusarium verticillioides*

Na agricultura moderna uma das medidas econômicas utilizadas para garantir alta produtividade consiste no controle químico de doenças de plantas. Os agroquímicos utilizados no controle de doenças de plantas incluem fertilizantes e pesticidas. Dentre o grupo de pesticidas mais utilizados destacam-se os fungicidas. As propriedades químicas e biológicas dos fungicidas são muito variáveis, e podem ser constituídos de diversos princípios de controle sendo que sua eficácia depende da época, metodologia de aplicação e estágio do desenvolvimento da doença (KIMATI, 1995).

No Brasil houve um aumento na venda de defensivos agrícolas de 26,5% no período de janeiro a outubro de 2007, totalizando cerca de R\$ 7,7 bilhões. Todas as classes de defensivos apresentaram incremento nas vendas. Os fungicidas foram os que mais cresceram (32,5%), seguidos dos inseticidas (28,3%), herbicidas (23,5%), inseticidas (28,3%) e acaricidas (5,4%) (IEA, 2009). Em relação ao mesmo período de 2007, as vendas dos defensivos agrícolas em 2008 apresentaram um crescimento de 31%, totalizando um mercado de R\$ 10.246 milhões (SINDAG, 2008).

O uso de fungicidas em larga escala teve início com a descoberta da calda bordalesa por Millardet em 1882, em Bordeaux na França sendo o fungicida mais utilizado no controle de doenças em plantas na época (DEWAARD et al., 1993).

Em 1934, deu-se início à segunda geração de fungicidas no quais os ditiocarbamatos e outros importantes fungicidas orgânicos assim como os inorgânicos possuíam a característica de fornecer uma superfície protetora à planta sem penetrar no tecido (DEWAARD et al., 1993).

A terceira geração de fungicidas orgânicos foi desenvolvida para que penetrassem no tecido da planta erradicando patógenos após infecção e protegendo as partes da planta em que o fungicida não tivesse contato direto. Estes fungicidas foram classificados como sistêmicos e incluem os 2-aminopirimidinas, benzimidazóis, carboxamidas, fenilamidas, azoles e morfolinas (DEWAARD et al., 1993). Os fungicidas sistêmicos apresentavam diversas vantagens em relação aos não sistêmicos tanto que em 1980 foram desenvolvidos mais de 40 princípios ativos. As principais vantagens desses fungicidas são a especificidade de ação, maior fungitoxicidade inerente, maior efeito protetor, curativo e erradicante, menor fitotoxicidade, menor dosagem e menor contaminação ambiental, entretanto podem possibilitar o surgimento de patógenos resistentes (KIMATI, 1996).

O tratamento com fungicida constitui uma alternativa para reduzir a incidência das infecções causadas por *Fusarium* spp. Os fungicidas dispõem de inúmeros mecanismos de ação, interferindo na respiração celular, na produção de energia e nos processos biossintéticos, sendo que alguns alteram a permeabilidade da membrana da célula ocasionando a destruição celular (SIJPESTEINJN, 1982). Os fungicidas utilizados para reduzir os danos causados por *Fusarium* spp. incluem Captan 750 TS (captana), Maxim XL (Fludioxonil + metalaxil-m), Quintozeno (Pentaclorobenzeno), Derosal Plus (carbendazim + tiram), Vitavax Thiram 200 SC (carboxina + tiram) (ANVISA, 2009).

3.4.1.1 Quintozeno

O quintozeno é um fungicida que contém o ingrediente ativo Pentacloronitrobenzeno-PCNB (Figura 2). O PCNB é um composto moderadamente solúvel em água. Pertence ao grupo químico dos cloroaromáticos e inibe o crescimento fúngico sendo indicado para tratamento de sementes, solo, viveiros e canteiros (ANDREI, 1996).

Embora seja considerado medianamente tóxico (classe III), apresenta grande periculosidade ambiental devido à persistência e à possibilidade de lixiviação no solo. Sua aplicação pode ser realizada antes ou na época de semeadura e as doses variam conforme o

tipo de tratamento, cultura e doença. É compatível com outros inseticidas e fungicidas, exceto os de reação alcalina como calda bordaleza (ANVISA, 2009; PAN PESTICIDES DATABASE, 2009).

O quintozeno inibe o crescimento das hifas, por ser um inibidor competitivo do inositol que é uma substância requerida para o crescimento de muitos fungos (BARMAC.COM, 2009).

No Canadá e E.U.A. o quintozeno é utilizado no controle do fungo *Typhula phacorrhizap* que é encontrado em regiões temperadas e desenvolve-se na relva de campos de golfe (MCBEATH, 2003).

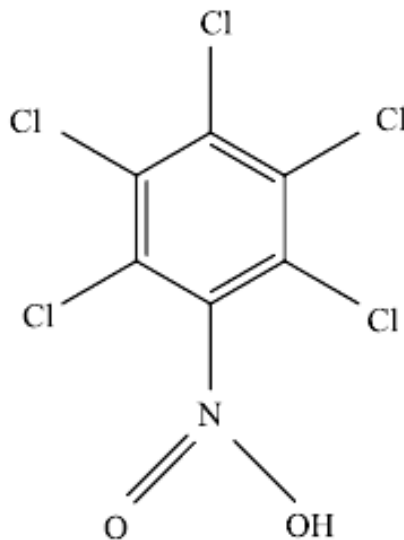


Figura 2 – Fórmula estrutural do pentacloronitrobenzeno (PCNB)
Fonte: ANVISA (2009)

3.4.1.2 Fludioxonil + Metalaxil-M

O maxim XL é um fungicida sistêmico que controla os fungos associados à semente do milho e do solo, não afetando o poder germinativo, e permitindo que a cultura desenvolva-se normalmente (SYNGENTA, 2009). Esse fungicida surgiu da associação de dois princípios ativos fludioxonil e metalaxil-M (Tabela 1), sendo que os diferentes modos de ação, os locais e os diferentes mecanismos da inibição do desenvolvimento do micélio dos

fungos conferem ao maxim XL uma grande eficácia (SYNGENTA, 2009). O Fludioxonil (Figura 3) é um fungicida que age por contato e apresenta amplo espectro de ação, atua sobre histidinas quinases denominadas MAP quinases (*mitogen activated protein*) que estão envolvidas na transdução de uma variedade de sinais extracelulares e regulam atividades como expressão gênica, mitose, diferenciação celular, virulência, conidiação, germinação de conídios, sobrevivência e crescimento invasivo de hifas (XU, 2000; ZHAO; MEHRABI; XU, 2007).

ZHANG et al. (2002) estudaram os efeitos do fludioxonil sobre *Neurospora crassa* e demonstraram que o fungicida é responsável por ativar a resposta hiperosmótica mediada pela MAP quinase que resultam em acúmulo intracelular de glicerol causando inchaço e ruptura das células. O fludioxonil adicionado em meio de cultivo com *Cândida albicans* (OCHIAI et al., 2002) também interferiu na transdução de sinal afetando a osmorregulação e induzindo a síntese de glicerol em *Neurospora crassa* (FUJIMURA, 2000).

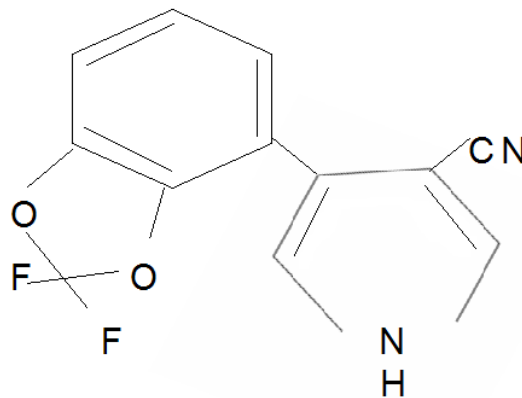


Figura 3 – Fórmula estrutural do fludioxonil
Fonte: ANVISA (2009).

O metalaxil-M (Figura 4) penetra no tegumento da semente e é sistemicamente translocado a todas as partes da planta durante a germinação. Age pela inibição da síntese do RNA ribossomal, interferindo na síntese de proteínas e inibe o crescimento do micélio e a formação de esporos (SYNGENTA, 2009). Devido ao seu amplo espectro de ação o metalaxil é utilizado por diversos países, em regiões temperadas, subtropicais e tropicais (MONKIEDJE; ILORI; SPITELLER, 2002).

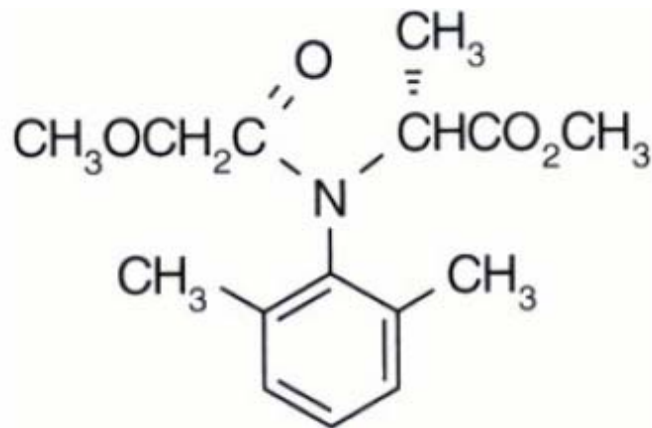


Figura 4 – Fórmula estrutural do metalaxil-M
Fonte: ANVISA (2009).

Tabela 1 – Ingredientes ativos do Maxim XL e suas informações químicas

Ingrediente Ativo	Nome Químico	Fórmula molecular	Grupo Químico	Classificação toxicológica
Fludioxonil	4-(2,2-difluoro-1,3benzodioxol-4-il) pirrole-3 carbonitrila	C ₁₂ H ₆ F ₂ N ₂ O ₂	Fenilpirrol	III (Medianamente tóxico)
Metalaxil-M	Metil-N-metoxiacetil-N-2,6-xilil-D-alaninato	C ₁₅ H ₂₁ NO ₄	Acilalaninato	II (Altamente tóxico)

Fonte: ANVISA (2009).

3.5 MÉTODOS BIOLÓGICOS

O controle químico por fungicidas pode não ser totalmente eficaz na redução da infecção fúngica, por isso o controle biológico pode ser utilizado como uma alternativa contra a toxigenicidade de *Fusarium* spp. e a contaminação por micotoxinas. Esses métodos utilizam fermentação por microrganismos como à conversão de aflatoxina B₁ em produtos inofensivos por *Flavobacterium auranticum*. Porém, geralmente as conversões são lentas e incompletas (SWEENEY; DOBSON, 1998; BATA; LASZTITY, 1999; KARLOVSKY, 1999). Antagonistas microbianos ou competidores podem ser borrifados em plantas na fase de florescência podendo eliminar ou reduzir o crescimento de fungos

produtores de toxinas (SCHISLER et al., 2002). Durante a fase de crescimento endofítico *Bacillus subtilis* pode inibir o crescimento de fungos (BACON et al., 2001).

De acordo com Munkvold; Hellmich; Rice (1999) os insetos estão envolvidos na infecção de *Fusarium* spp. em plantas por transportarem esporos e por penetrarem na proteção externa de grãos e tecidos da planta, permitindo que as hifas tenham acesso aos nutrientes. Com o intuito de reduzir o nível de infecção de fungos causados por insetos podem ser utilizados grãos de cereais inseto-resistentes geneticamente modificados. Por exemplo, a utilização de híbridos de milho-Bt transgênico diminuíram significativamente a podridão da espiga causada por *Fusarium* spp. e consequentemente a redução da contaminação por fumonisinas.

Os óleos essenciais são extraídos de plantas aromáticas e possuem muitas propriedades antibacterianas e antifúngicas que podem ser utilizados para controlar a infecção fúngica de *Fusarium* spp. em planta e a produção de micotoxinas (RANA; SINGH; TANEJA, 1997; ANTHONY et al., 2004).

3.6 MÉTODOS DE DESCONTAMINAÇÃO

Embora a prevenção da produção de fumonisinas seja necessária, a formação destas micotoxinas pode ser inevitável em certas condições ambientais de temperatura e umidade. Portanto, a utilização de procedimentos para a descontaminação de milho e derivados contaminados com fumonisinas são indispensáveis.

3.6.1 Métodos Químicos

Os métodos químicos são aqueles em que a adição de um determinado composto em meio contendo a micotoxina pode inativá-la ou convertê-la em um composto menos tóxico, por modificação molecular. Alguns exemplos de tratamentos químicos são o emprego de amônia, hidróxido de cálcio, bissulfito de sódio, hipoclorito de sódio, peróxido de hidrogênio, formaldeído, permanganato de potássio, ozônio, nitrito de sódio (PIVA et al., 1995; BAUER, 1994; MCKENZIE et al., 1997; LEMKE et al., 1999; LEMKE et al., 2001a).

A amoniação é um processo de detoxificação de alimento contaminado com aflatoxinas aprovado em Senegal, França, Reino Unido e alguns estados norte americanos. A desvantagem desse tipo de detoxificação química é a sua especificidade (apenas aflatoxinas) e os resíduos de amônio que permanecem no alimento prejudicando a saúde animal (HUWIG et al., 2001).

Outro processo é a diazotização no qual o amino primário que é um componente que contribui para a toxicidade de FB₁ é removido, ou seja, a fumonisina pode ser desaminada em solução aquosa em condições de pH ácido e baixa temperatura (pH 1,0 e 5°C) com adição de NaNO₂ (LEMKE et al., 2001a).

3.6.2 Métodos Físicos

Os métodos físicos incluem o beneficiamento de grãos, aquecimento, irradiação e o emprego de adsorventes.

A irradiação gama foi avaliada quanto à capacidade de reduzir a contaminação de esporo fúngico e degradar as micotoxinas produzidas em sementes, alimentos e ração. A irradiação gama inativa o crescimento de *Fusarium* spp. e a formação de micotoxinas em sementes de trigo, milho e cevada. A dose de 3 kGy de irradiação gama resultou em uma diminuição significativa de fumonisina B₁ em 51,7%, 74,2% e 80%, respectivamente. A aplicação de 5 kGy resultou na diminuição de fumonisina B₁ em 96,6%, 87,1% e 100% para trigo, milho e cevada, respectivamente, enquanto que a dose de 7 kGy foi suficiente para completa degradação de fumonisina B₁ em trigo e milho (AZIZ; MOUSSA, 2004; AZIZ, et al., 2007)

O método físico por meio da adição de adsorventes à ração animal contaminada é o mais utilizado. No mercado interno e externo, a detoxificação de alimentos contaminados com micotoxinas pelo emprego de materiais não nutritivos vem crescendo cada vez mais por ser um método eficaz e de custo acessível. Entretanto, vários critérios devem ser seguidos na escolha do adsorvente que será utilizado em rações para reduzir a adsorção de toxinas no trato gastrointestinal de animais (SCHEIDELER, 1993; SCHELL et al., 1993). Ramos et al. (1996) relataram que a ingestão de alimentos contaminados é o principal meio de incorporar micotoxinas ao organismo e consideram que estudos do processo de adsorção

gastrointestinal de micotoxinas é de grande interesse porque fornecem informações sobre a biodisponibilidade desses metabólitos tóxicos .

Os adsorventes são agentes que se ligam às micotoxinas evitando sua absorção no intestino e influenciados por vários fatores como pH, temperatura, enzimas. Quando os níveis de pH oscilam, as micotoxinas não continuam aderidas aos adsorventes (FEEDING TIMES, 2002). Diversos requisitos são necessários para que os adsorventes sejam capazes de adsorver as micotoxinas no trato gastrointestinal dos animais sem causar danos. Estes devem ser efetivos contra diversas micotoxinas mesmo que estas se encontrem em baixas concentrações, apresentar baixo custo, não gerar produtos tóxicos, agir rapidamente, não afetar as propriedades nutricionais do alimento. A característica mais importante para adsorção é a estrutura física do adsorvente que compreende a superfície da área disponível e o tamanho dos poros (HUWIG, 2001).

Os adsorventes para micotoxinas podem ser classificados em orgânicos e inorgânicos. Os adsorventes orgânicos são materiais derivados de vegetais fibrosos (casca de aveia, farelo de trigo, fibra de alfafa), de extratos da parede celular de leveduras (β -glucana), celulose, hemicelulose e pectina. Os adsorventes inorgânicos são polímeros à base de silicatos como zeólitas, bentonitas, aluminossilicatos de sódio e cálcio hidratado (HSCAS), carvão ativado, terra diatomácea e vários outros tipos de argilas (KNOWMYCOTOXINS, 2009).

A ligação a micotoxinas ocorre por adsorção física e química. A adsorção física envolve ligação por forças de van der Waals e pontes de hidrogênio, enquanto a adsorção química (Quimissorção) uma interação mais forte por ligações iônicas e covalentes (DAWSON, 2002).

Os testes de adsorção *in vitro* podem incluir estudos em meio aquoso, fluido simulado do trato gastrointestinal e curvas isotérmicas que podem ser usados mais efetivamente para caracterizar diferentes adsorventes antes de testes *in vivo* (LEMKE et al., 2001b).

Vários materiais adsorventes como colestiramina (CH), celite, bentonita e carvão ativado foram testados *in vitro* a 1 mg/mL com concentrações de FB₁ que variaram entre 3,25 a 260 μ g/mL para avaliar a capacidade de adsorção da fumonisina em soluções aquosas. A colestiramina e o carvão ativado demonstraram a melhor capacidade de adsorção em uma solução aquosa que continha 200 μ g/mL de FB₁, adsorvendo 85% e 62%, respectivamente. No entanto, a bentonita adsorveu 12% em uma solução com 13 μ g/mL de FB₁, enquanto a celite não adsorveu na menor concentração de FB₁ testada (3,2 μ g/mL). A colestiramina também foi avaliada em diferentes concentrações (10 e 100 mg/g) em farinha de

milho contaminada com diferentes níveis de fumonisinas $3\mu\text{g/g}$ e $162\mu\text{g/g}$, respectivamente. Os resultados obtidos variaram de 16 a 95% para FB_1 e de 56 a 100% para FB_2 , respectivamente (SOLFRIZZO et al., 2000).

3.6.2.1 Aluminossilicatos

Os aluminossilicatos de cálcio e sódio hidratado (HSCAS) conhecidos como bentonita, zeolita, filosilicatos e montmorilonita são argilas porosas inorgânicas constituídas por no mínimo duas camadas laminares de tetraedros de silício e camadas de octaedros de alumínio (figura 5). As moléculas de sílica das argilas apresentam cargas positivas rodeadas por quatro oxigênios com cargas negativas. As micotoxinas são adsorvidas na estrutura porosa por meio de cargas elétricas. O percentual de adsorção dependerá da forma e tamanho das partículas dos HSCAS, diâmetro do poro, pH, da carga elétrica da toxina e da estrutura da argila (PHILLIPS et al., 1994; SMITH et al., 1994). A utilização de aluminossilicatos para a adsorção de micotoxinas é estudada há 20 anos (DAVIDSON et al., 1987; RAMOS; HERNANDEZ, 1997).

Os aluminossilicatos são utilizados em grandes quantidades e atuam principalmente contra as aflatoxinas. Quando se ligam às micotoxinas no trato gastrointestinal formam complexos irreversíveis que não são digeridos e, conseqüentemente são excretados pelas fezes (HUWIG et al., 2001).

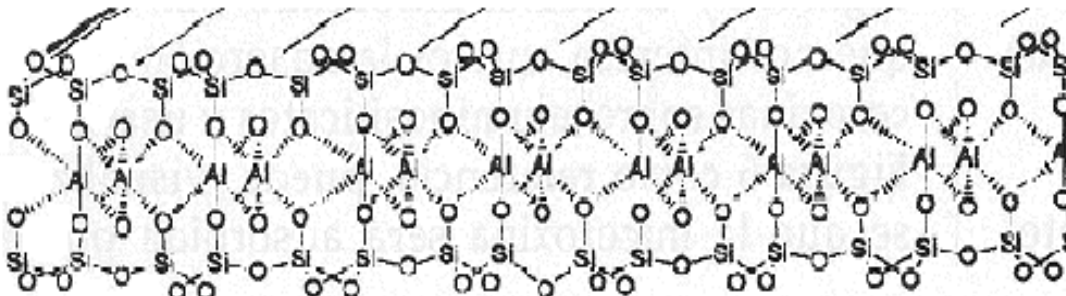


Figura 5 – Estrutura de HSCAS
Fonte: www.mycoad.com/eng_5_15.htm.

O processo de adsorção das aflatoxinas pelos aluminossilicatos ocorrem devido a formação de um complexo entre o sistema β -carbonil de aflatoxinas e os íons alumínio (PHILLIPS et al., 1994). Os aluminossilicatos mostraram se ineficientes na adsorção de outras micotoxinas como zearalenona, ocratoxina, toxina T-2, desoxinivalenol (BAUER, 1994; RAMOS; FINK-GREMMELS; HERNANDEZ, 1996; LEMKE et al., 1998). As zeolitas e bentonitas possuem um elevado número de cargas negativas, sendo que podem ocasionar sérias conseqüências nutricionais aos animais, pois além das micotoxinas podem imobilizar componentes essenciais da ração como vitaminas, minerais e aminoácidos (DEWAARD et al., 1991).

Estudos *in vitro* demonstraram que a bentonita de sódio natural apresentou elevada capacidade na adsorção de AFB₁ (45 μ g/mg de bentonita) em solução aquosa a pH 2 (ROSA et al., 2001).

Desheng et al.(2005) relataram que os níveis máximos de adsorção de AFB₁ pela montmorilonita em solução aquosa, a pH de 2 e 8, foram 613,5 μ g (80%) e 628,9 μ g (90%) de AFB₁/g de montmorilonita, respectivamente.

Os aluminossilicatos utilizados como adsorventes de micotoxinas para suínos, apresentaram elevada afinidade por aflatoxinas, mas reduzida para as toxinas de menor polaridade como a zearalenona (AVANTAGGIATO et al., 2005).

No entanto, a capacidade de adsorção da zearalenona pode ser aumentada com a incorporação de compostos orgânicos à superfície dos aluminossilicatos (organoaluminossilicato) modificando, assim, sua estrutura com a criação de novos pontos de adsorção (LEMKE; GRANT; PHILLIPS, 1998).

A incorporação de íons octadecildimetilbenzil amônio (ODMBA) à superfície dos aluminossilicatos permitiu uma maior afinidade às moléculas orgânicas hidrofílicas, como a maioria das micotoxinas. A adsorção de fumonisina B₁ (FB₁) melhorou em aluminossilicatos modificados com íons octadecildimetilbenzil amônio (ODMBA) (DAKOVIC et al., 2005; DAKOVIC et al., 2007).

Aly et al. (2004) demonstraram uma adsorção de 85,1% a 92,4% de FB₁ utilizando HSCAS em diferentes concentrações (0,5%, 1%, 2% e 4%, m/v) a partir de extrato de malte contaminado artificialmente com 5, 10, 50 μ g/mL de FB₁.

3.6.2.2 β -glucanas

As β -glucanas são polissacarídeos altamente organizados que compõem a estrutura da parede celular de leveduras, fungos e alguns cereais.

As β -1,3-glucanas são carboidratos fibrosos resistentes à degradação pelos sistemas enzimáticos no trato gastrointestinal dos animais. Consistem de um material altamente organizado composto por monômeros de glicose que formam longas cadeias (figuras 6 e 7) e se diferenciam pelo tipo de ligação entre as unidades de D-glicose (anéis tipo β -D-glucopiranosose) da cadeia principal e pelas ramificações que se conectam a essa cadeia (DAWSON, 2002; LAROCHE; MICHAUD, 2007).

Nos últimos anos inúmeras pesquisas sobre as β -glucanas indicaram que além de apresentarem diversas aplicações como antitumoral, antiinflamatório, antimutagênico, podem ser utilizadas como adsorventes para micotoxinas (BAUER, 1994).

As β -glucanas apresentam diversas vantagens quando empregadas como adsorventes de micotoxinas por promoverem interações, aderindo imediatamente à superfície do carboidrato, ou seja, a superfície da β -1,3-glucana permite a formação de interações bipolares, eletrostáticas e de pontes de hidrogênio (DAWSON, 2002).

De acordo com Yiannikouris et al. (2003), a mobilidade da conformação tridimensional da parede celular da levedura é provavelmente importante no evento de adsorção de micotoxinas.

Yiannikouris et al. (2006) demonstraram que β -D-glucanas isoladas de *Saccharomyces cerevisiae* poderiam adsorver zearalenona e reduzir sua biodisponibilidade no trato digestivo, protegendo os animais de efeitos adversos. Estudos *in vitro* da cinética de interações entre outras micotoxinas e β -D-glucanas em três valores de pH (3,0, 6,0, e 8,0) demonstraram que sob condições ácidas e neutras as taxas de afinidade para aflatoxinas B₁, desoxinivalenol e ocratoxina A aumentam e envolvem as cadeias (1 → 3)- β -D-glucanas e (1 → 6) β -D-glucanas. Porém, as condições alcalinas favoreceram somente a adsorção de patulina. Por meio de mecanismos moleculares foi elucidado que os grupos hidroxil, cetona e lactona estão envolvidos na formação de pontes de hidrogênio e de interações van der Waals entre β -glucanas e aflatoxinas B₁ (Figura 8), desoxinivalenol e patulina. As diferenças na capacidade de ligação de micotoxinas são devido as suas características físicas e químicas distintas.



Figura 6 – Modelo 3D da molécula de β glucana de levedura
 Fonte: <http://www.e-kaio.net/guide/bglucan.htm>

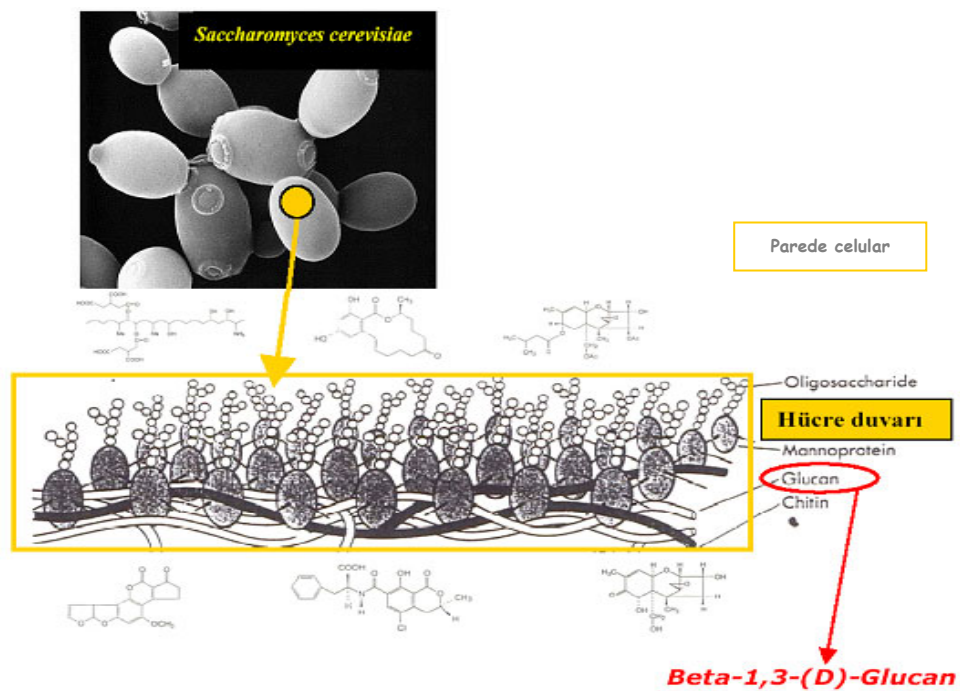


Figura 7 – Parede celular da levedura *S. cerevisiae*
 Fonte: www.biovet.com.tr/Portals/0/images/1118.jpg

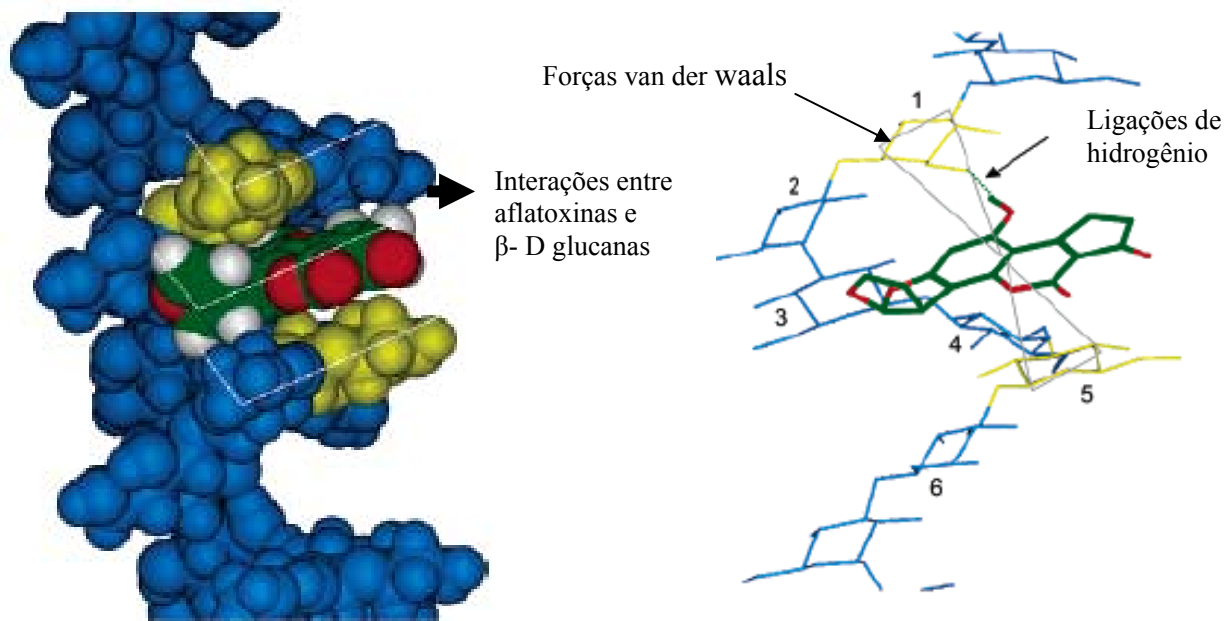


Figura 8 – Conformação favorável de AFB₁ na única hélice da cadeia (1→3)-β-D-glucana.
Fonte: Yiannikouris et al. *Biomacromolecules*, v. 7, p. 1147-1155, 2006.

3.6.2.3 Glucomanano modificado

O glucomanano modificado (Mycosorb®) é um adsorvente derivado da parede celular de levedura utilizado como aditivo em ração para animais (ALLTECH, 2009). A estrutura da glucana foi modificada com o objetivo de criar pontos polares e não polares adicionais para adsorver as toxinas (DAWSON, 2002). Todo o processo de adsorção das toxinas ocorre no trato gastrointestinal dos animais (Figura 9) e são eliminados nas fezes (DAWSON, 2002).

Avantaggiato; Havenaar; Viscontia (2004) demonstraram em estudos *in vitro* que o Mycosorb em níveis de 0,1% com 2µg/mL das toxinas adsorveu 18% de desoxinivalenol e 6% de nivalenol em pH 3, enquanto que em pH 8, 3% de desoxinivalenol e 10% de nivalenol, respectivamente. Por outro lado, com 10 µg/mL das toxinas adsorveu 0% de desoxinivalenol e 1% de nivalenol em pH 3 e 9% de desoxinivalenol e 7% de nivalenol em pH 8, respectivamente.

As principais vantagens deste glucomanano modificado (Mycorsob®) consistem na prevenção da redução das reservas de antioxidantes decorrentes de toxicoses por T-2, diminuição de peroxidação lipídica no fígado, no qual estão envolvidos os principais

mecanismos moleculares de ação das micotoxinas (DVORSKA; SURAI, 2001). A dieta experimental de cordonas suplementada com aurofusarina em um nível de 26,4 mg/Kg com 0,1% e 0,2% do adsorvente mycosorb apresentou um efeito protetor contra aurofusarinotoxicose em codornas e também melhorou a qualidade dos ovos (DVORSKA, et al., 2003).

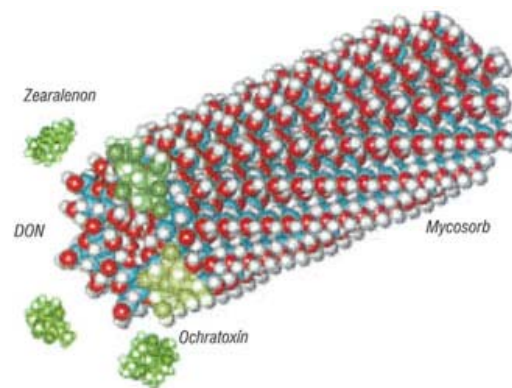


Figura 9 – Estrutura de glucomanano modificado no trato gastrointestinal.
Fonte: www.mkm.sk/images/krm/mycosorb_1.jpg

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.2 Cepas de *F. verticillioides*

Um total de 16 cepas de *F. verticillioides* (97J, 97K, 97L, 103BR, 103G, 103F, 103H, 104Ga, 113B, 113F, 118F, 119B, 119BR, 119Fa, 162A, 164G) isoladas a partir de alimentação animal a base de milho associado com intoxicação animal foram morfologicamente identificadas na Science University of Tokyo, Japão.

4.1.3 Fungicidas

Os fungicidas utilizados foram o Plantacol (Quintozeno) Laboratórios Pfizer Ltda-Divisão agrícola, Guarulhos, SP, Brazil e Maxim XL (fludioxonil + metalaxil-M), Syngenta. Os fungicidas testados foram selecionados por serem produtos comerciais utilizados por agricultores de cereal no Brasil para o controle de *Fusarium* spp e autorizados pelo Ministério da Agricultura Brasil.

4.1.4 Adsorventes

Os adsorventes aluminossilicato de sódio e cálcio (HSCAS) (SLO-Agropecuária LTDA-Cambé-PR), β -glucana (SLO-Agropecuária LTDA-Cambé-PR), glucomanano modificado (produto comercial) (Alltech Inc.-Brasil) foram cedidos pelo Professor Dr. Antônio Sérgio de Oliveira da Cooperativa Agroindustrial-COROL-Rolândia/PR.

4.2 METODOLOGIA EXPERIMENTAL

4.2.1 Avaliação da Suscetibilidade *in vitro* de *F. verticillioides* a Fungicidas

O ensaio foi realizado de acordo com Summerbell (1993) com modificação. Quatro diluições de cada fungicida em água destilada estéril (2,5 ml) foram transferidas para placas de Petri (9 cm diâmetro) com 22,5 ml de Ágar Batata Dextrose (BDA) a 50 °C. As placas foram homogeneizadas até que a solução ficar homogênea, e então incubadas a 37°C por 24 h para teste de esterilidade. Placas controle consistiram de BDA com 2,5 ml de água destilada estéril. As concentrações finais dos fungicidas (ingredientes ativos) foram de 75, 375, 1875, 9375 µg/mL para quintozeno e 1,5 + 0,6, 7,5 + 3, 37,5 + 15, 187,5 + 75 µg/mL para fludioxonil + metalaxil-M. As cepas de *F. verticillioides* foram cultivadas em BDA a 25°C durante 7 dias e utilizadas em ensaios de inibição. As colônias foram retiradas com uma alça calibrada (1 µl) e transferida a um único ponto central. Depois de 7 dias de crescimento a 25°C, o diâmetro de cada colônia foi medido. A porcentagem de inibição foi calculada em relação ao diâmetro das colônias do controle crescido em BDA sem fungicida. O experimento foi realizado em triplicata, com duas repetições sucessivas para cada fungicida. A dose de fungicida que inibe 50 % do crescimento fúngico (ED₅₀), foi calculada utilizando a equação quadrática que foi ajustada à curva de resposta da dose (Ln de concentração x % de inibição) utilizando o programa Curve Expert 1.3. As cepas com um ED₅₀ ≥ 50 µg/mL ou maior foi considerado insensível ao fungicida, aqueles com um ED₅₀ entre 1 e 10 µg/mL como moderadamente sensível, e os ED₅₀ menores que 1µg/mL como altamente sensível (Edgington et al., 1971).

4.2.2 Cultivo de *F. verticillioides* para Avaliação da Produção de Fumonisinas

Placas de Petri (90 x 20 mm) contendo 10 g de milho triturado foram umedecidos com 10 mL de água destilada, e autoclavados 2 vezes por 30 min e inoculadas com 1 mL de suspensão de esporos (1 x 10⁶ esporos/mL) obtidos do cultivo de cepas de *F.*

verticillioides em BDA a 25°C. durante 7 dias. As placas foram incubadas por 14 dias a 25°C e utilizadas para avaliação da capacidade de produção de fumonisina.

4.2.3 Efeito do Fungicida Maxim -XL na Produção de Fumonisina B₁ por *F. verticillioides* em Meio Líquido Definido

Um meio líquido definido (JIMÉNEZ et al., 2003) foi utilizado para avaliar o efeito de Maxim-XL (fludioxonil + metalaxil-M) na produção de fumonisina B₁ por *F. verticillioides* (cepa 103F). Composição do meio líquido definido em 1 litro: 0,5 g de extrato de malte; 1 g de extrato de levedura; 1 g de peptona micológica; 1 g de KH₂PO₄; 0,3 g de MgSO₄.7H₂O; 0,3 g de KCl; 1 mL de solução de CuSO₄.H₂O (0,005 g/L); 1 mL de solução de ZnSO₄.7H₂O (0,01 g/L) e 20 g/L de frutose. O meio de cultura foi autoclavado a 120°C por 20 minutos, com exceção da frutose, que foi esterilizada separadamente em vapor fluente por 40 minutos e adicionada asépticamente ao meio de cultivo. Uma suspensão de esporos de 10⁶ esporos/mL de *F. verticillioides* (cepa 103F) foi cultivada em ágar batata dextrose (BDA) por 7 dias a 25°C e inoculada em frascos Erlenmeyer contendo 50 mL de meio líquido definido.

O fungicida Maxim-XL foi adicionado ao meio líquido após 24 h, na dose recomendada pelo fabricante (150 mL de fungicida para 100 Kg de sementes) proporcionalmente 75 µL de fungicida (1,875 mg (25 mg/mL) fludioxonil + 0,75 mg (10 mg/mL) metalaxil-M) em 50 mL de meio líquido definido. Aos cultivos controle foram adicionados 75 µL de água ultra-pura estéril 24 h após a inoculação. Todos os cultivos foram incubados a 28°C, 180 rpm por 14 dias.

4.2.4 Microscopia Eletrônica de Varredura

Amostras de micélio de *F. verticillioides* foram fixadas em solução de glutaraldeído 2,5 % e tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 7,2) por 12 horas a 4°C. As amostras foram então lavadas com tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,2) e tratadas com tetróxido de ósmio 1% em tampão fosfato de sódio por 1 hora. Procedeu-se a desidratação gradual em etanol (70, 80, 90 e 100%), e secagem ao ponto crítico (BALTEC CPD 030 Critical Point

Dryer). Após a secagem, as amostras de micélio foram coladas em *stubs* utilizando-se fita adesiva de carbono, e então recobertas com ouro (BALTEC SDC 050 Sputter Coater). Os micélios foram visualizados em microscópio eletrônico de varredura FEI Quanta 200 no laboratório de microscopia e microanálise, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR.

4.2.5 Preparo de Milho Triturado Contaminado

O milho triturado contaminado contendo fumonisinas foi preparado de acordo com a metodologia preconizada por WEIBKING et al. (1993). Uma alíquota de 200 g de milho triturado adicionado de 200 mL de água destilada foi autoclavado duas vezes por 20 min a 121°C. Uma suspensão de esporos (10^7 esporos/mL) de *F. verticillioides* 103F, cultivado em ágar batata dextrose (BDA) por 7 dias a 25°C foi inoculado no milho previamente autoclavado e incubado a 25°C durante 5 semanas. O cultivo foi submetido a um processo de pré-limpeza (WEIBKING et al., 1993), adicionando-se 250 mL de acetona-clorofórmio na proporção 3:1 (v/v) e agitado a 180 rpm por 18 h a 25°C. O cultivo foi filtrado em papel de filtro, seco sob ventilação a 40°C por 48 horas (estufa de circulação de ar), triturado e mantido a -20°C.

O material seco e triturado foi previamente analisado quanto à concentração de FB₁ por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e utilizado nos testes de adsorção *in vitro*.

4.2.6 Teste de Adsorção

As amostras de milho triturado contaminado preparadas conforme item 4.2.5 apresentaram concentrações de FB₁ de 81,94 µg/g e 1.529,23 µg/g. Alíquotas de 10 g desse material foram adicionados de 100 mL de água destilada e agitadas a 120 rpm a 25°C por 30 min. Posteriormente, o material foi centrifugado a 1000 x g por 10 min e para obtenção das concentrações desejadas foram realizadas diluições adequadas do sobrenadante. Uma alíquota de 2 mL do sobrenadante foi retirada para cada controle e 20 mL para cada adsorvente avaliado, no qual foi adicionado 0,5% (m/v) de cada adsorvente. Em seguida, o

material foi agitado a 120 rpm a 25°C por 30 e 90 min e centrifugado a 1000 x g por 10 min. Uma alíquota do sobrenadante foi retirada e utilizada para determinação de FB₁.

A quantidade de FB₁ adsorvida para cada adsorvente testado foi calculada através da fórmula:

$$\% \text{ adsorção} = \frac{(\text{sem adsorvente} - \text{com adsorvente}) \times 100}{\text{sem adsorvente}}$$

4.2.7 Determinação de Fumonisinias

As fumonisinias foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE de acordo com o método preconizado por Shephard et al. (1990) modificado por UENO et al. (1993). Os materiais de cultura foram extraídos com uma solução de 60 mL de metanol : água (3:1, v/v), deixada em repouso por 10 min a temperatura ambiente, e agitada em shaker a 150 rpm por 30 min. A suspensão foi centrifugada a 4500 × g por 10 min e o sobrenadante utilizado para determinação de fumonisinias.

Os extratos brutos (1 mL) obtidos do material de cultura e do meio líquido foram submetidos à pré-limpeza empregando-se colunas de troca aniônica Sep-Pak accell plus QMA (Waters Co., Ltda). Para a extração de fumonisinias do meio de cultivo líquido 1 mL do extrato livre de células foi misturado a 1 mL de metanol : água (3:1, v/v) , sendo a mistura agitada em vortex por 1 min. Uma alíquota de 1 mL da mistura foi aplicada em coluna de pré-limpeza (Sep Pak acell plus QMA) previamente acondicionada com 5 mL de metanol, seguido por 5 mL de metanol/água (3:1, v/v) e lavada com 6 mL de metanol/água (3:1, v/v), 3 mL de metanol e eluição final com 10 mL de metanol/ ácido acético (0,5%). O eluato foi seco sob gás N₂ a 45°C e o resíduo dissolvido em metanol/água (3:1, v/v, 800 µL). Após derivatização com 200 µL de orto-ftaldialdeído (OPA), as injeções das amostras foram realizadas dentro de 1 min em cromatografia líquida de alta eficiência-CLAE utilizando detector de fluorescência (Shimadzu RF-10A XL), sistema isocrático de fase reversa e coluna C18 Nucleosil 100-5 (4,6 × 250 mm, Macherey-Nagel GmbH & Co.). Os comprimentos de onda de excitação e emissão foram de 335 nm e 450 nm, respectivamente. A fase móvel consistiu de NaH₂PO₄ 0,1 mol/L (80:20, v/v) ajustado para pH 3,3 com ácido orto-fosfórico.

O fluxo foi de 1 mL/min e temperatura de forno constante a 25°C. Os limites de detecção foram de 27,5 ng/g para FB₁ e de 35,3 ng/g para FB₂, respectivamente.

4.2.8 Análise Estatística

Diferenças na produção de fumonisinas pelas cepas de *F. verticillioides* e as doses efetivas que causaram 50% de inibição (ED₅₀) foram analisadas estatisticamente utilizando ANOVA seguida do teste de comparação múltipla de Tukey (p <0,05). A correlação entre a produção de fumonisinas e o ED₅₀ foi analisada pelo teste de correlação de Pearson (p <0,05). A análise estatística foi realizada utilizando o programa pelo 'Statistica' software versão 6.0 (Stat Soft, Inc.).

Parte dos resultados deste trabalho está apresentada em forma de artigo científico sob o título “***Fusarium verticillioides*: Evaluation of fumonisin production and effect of fungicides on *in vitro* inhibition of mycelial growth**”, redigido de acordo com as normas do periódico Mycopathologia.

Parte dos resultados não foi incluída no artigo e será discutida adiante.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

***Fusarium verticillioides*:** Evaluation of fumonisin production and effect of fungicides on *in vitro* inhibition of mycelial growth

Abstract

Fusarium verticillioides is a prevalent fungus in corn and the main fumonisin producer, a group of mycotoxins that causes serious economic losses, in addition to the human and animal health hazard. The aims of this study were to evaluate the fumonisin production of 16 *F. verticillioides* strains, the effect of quintozone and Maxim-XL (fludioxonil + metalaxyl-M) fungicides on *in vitro* mycelial growth, as well as the effect of fludioxonil + metalaxyl-M on mycelial morphology and fumonisin production in defined liquid culture medium. All *F. verticillioides* strains produced FB₁ and FB₂ with levels ranging from 2.41 to 3996.36 µg/g and from 1.18 to 1209.91 µg/g, respectively. Total fumonisin (FB₁ + FB₂) levels ranged from 3.59 to 5119.26 µg/g. *F. verticillioides* strain 103F produced the highest total fumonisin level (5119.26 ± 400.25 µg/g), but this level was not statistically different from those produced by 119B, 97K and 119BR strains when compared by Tukey test ($p < 0.05$). *F. verticillioides* strains were inoculated in potato dextrose agar added with quintozone (75, 375, 1875, 9375 µg/ml) and fludioxonil+metalaxyl-M (1.5 + 0.6, 7.5 + 3, 37.5 + 15, 187.5 + 75 µg/ml) in order to evaluate the effect of these fungicides on *in vitro* mycelial growth. *F. verticillioides* strains showed a large variability concerning ED₅₀ values, i.e., the fungicide dose that inhibits 50% of mycelial growth; for quintozone, 119B and 97K strains showed the highest (1679.3 µg/ml) and the lowest (183.2 µg/ml) ED₅₀ values, whereas for fludioxonil + metalaxyl-M, 113B and 103F strains showed the highest (38.4 + 15.4 µg/ml) and the lowest (1.4 + 0.7 µg/ml) ED₅₀ values, respectively. Quintozone was ineffective in inhibiting *in vitro* growth of all the 16 *F. verticillioides* strains, taking into account that their ED₅₀ values were > 50 µg/ml. On the other hand, fludioxonil + metalaxyl-M was effective in inhibiting *in vitro* growth of 113F, 164G and 103G *F. verticillioides* strains, but moderately effective for other 13 strains. Addition of fludioxonil + metalaxyl-M at recommended commercial concentration (25 + 10 mg/ml active ingredient) into the defined liquid culture medium inoculated with *F. verticillioides* 103F and incubated for 14 days at 25 °C caused pronounced morphological alterations to the hyphae, i.e., malformation, swelling, wrinkling, formation of spherical structures. In addition, fungicide addition into the culture medium increased mean FB₁ levels (2.57 µg/ml) compared to the control (mean 0.72 µg/ml). These results indicated the importance of focusing the effect of fungicides on mycotoxin production in addition to the phytopathogen control.

Keywords: Fludioxonil+metalaxyl-M. Quintozone. ED₅₀. Fumonisin B₁. Mycotoxin production.

Introduction

Corn (*Zea mays* L.) is one of the major cereal crops in Brazil and the annual production of 50.3 million (metric) tons ranks the country as the third largest corn producer in the world. The State of Paraná is the main corn producer accounting for 30% of the Brazilian production [4].

Due to its nutritional quality it is susceptible to mould contamination, mainly *Fusarium verticillioides*, primary corn phytopathogen and producer of fumonisins, toxic secondary metabolites [3, 21]. Fumonisins induce several diseases in animals, most importantly leukoencephalomalacia in horses [15], pulmonary oedema in pigs [11] and hepatocarcinoma in rats [10]. They have also been associated with high incidences of human oesophageal cancer in Southern Africa [27] and China [34]. The International Agency for Research on Cancer [13] classified FB₁ as a Group 2B carcinogen (possible human carcinogen).

In addition to the health hazard caused by fumonisins, the natural occurrence of *F. verticillioides* causes stalk, root and ear rot, resulting in serious economic losses in corn crop [22]. A significant effort has been made on the development and use of fungicides for *Fusarium* sp. control in order to prevent infection and maximize yield [20,29] but there are few reports on *F. verticillioides* [9, 26, 17, 25, 23]. [9] evaluated 8 fungicides (tolylfluanid M, penycuron + tolylfluanid M, penycuron, captan, thiram, thiabendazole, iprodione + thiram, carboxin + thiram) and showed that thiabendazole was the most effective in *F. verticillioides* control.[17] Luz (2003) reported a reduction in corn seed infection by *F. verticillioides* from 24 % (control) to 7 % using fludioxonil (2.5 % i.a.) + metalaxyl-M (1.0 % i.a.).

The overall evidence concerning the fungicide effectiveness is contradictory in laboratory experiments with pure fungal cultures and field trials [5]. Moreover, sub-lethal doses of some fungicides may lead to an increase in mycotoxin production by *Fusarium* species [18, 6]. Increased trichothecene production has been reported in several *in vitro* studies with some compounds inhibiting the growth of *Fusarium* species [19, 5, 12]. Therefore, when fungicides are used to control fungal diseases, the implications for mycotoxin production should be considered.

Taking into account that fungicide efficacy is an important commercial issue, the aim of this study was to evaluate the fumonisin production, sensitivity of *F. verticillioides* strains to two fungicides (quintozene and fludioxonil + metalaxyl-M) as well as the possible relationship between these parameters.

Material and Methods

Fusarium verticillioides Strains

F. verticillioides strains (97J, 97K, 97L, 103BR, 103G, 103F, 103H, 104Ga, 113B, 113F, 118F, 119B, 119BR, 119Fa, 162A, 164G) isolated from corn feed samples were morphologically identified at Science University of Tokyo, Japan.

Fungicides

The following two fungicides were evaluated, (i): Quintozene (Laboratórios Pfizer Ltda. – Divisão Agrícola, Guarulhos, SP, Brazil) and fludioxonil and metalaxyl-M (Syngenta- Brazil). The fungicides tested were chosen from the commercial products used by cereal growers in Brazil for *Fusarium* sp. control and authorized by the Brazilian Ministry of Agriculture.

“In vitro” inhibition assay

The assay was carried out according to [31] with modification. Four dilutions of each fungicide in sterile distilled water (2.5 ml) were poured onto Petri dishes (9 cm diameter) with 22.5 ml of Potato Dextrose Agar at 50 °C. The plates were stirred until the solution was homogeneous, and then incubated at 37°C for 24 h. Control plates consisted of PDA with 2.5 ml sterile distilled water. The final fungicide concentrations (active ingredient; a.i.) were 75, 375, 1875 and 9375 µg/ml for quintozene and 1.5 + 0.6, 7.5 + 3, 37.5 + 15, 187.5 + 75 µg/ml for fludioxonil + metalaxyl-M. *F. verticillioides* strains were grown on PDA at 25°C for 7 days and then used in inhibition assays. Colonies were sampled with a calibrated loop (1 µl) and transferred to a single point on the test medium. After 7 days growth at 25°C, the diameter of each colony was measured. The percentage inhibition was calculated in relation to the diameter of control colonies grown on PDA without fungicide. The experiment was repeated two times in triplicate for each fungicide. The fungicide dose that inhibits 50% of growth (ED₅₀), was calculated using a quadratic equation that was fit to the dose response curve (Ln of concentration x % of inhibition). Strains with an ED₅₀ of 50 µg/mL or greater were considered insensitive to the fungicide, those with an ED₅₀ between 1 and 10 µg/mL as moderately sensitive, and those with an ED₅₀ of less than 1 µg/mL as highly sensitive [7].

Fumonisin production evaluation in ground corn

All strains were grown on potato dextrose agar (PDA) slants at 25°C for 7 days. Each *F. verticillioides* strain (10⁶ conidia/mL) was inoculated onto a Petri dish (90 x 20 mm) containing 10 g of ground corn moistened with 10 mL distilled water, and autoclaved 2 times for 30 min. The cultures were incubated at 25°C for 14 days and evaluated for fumonisin production.

Effect of fungicide on fumonisin production by *F. verticillioides* in defined liquid culture medium

A defined liquid culture medium [14] was used for evaluation of fludioxonil + metalaxil-M effect on fumonisin production by *F. verticillioides* 103F strain. Liquid culture medium composition was: 0.5 g/l malt extract, 1 g/l mycological peptone, 1g/l KH₂PO₄, 0.3 g/l MgSO₄.7H₂O, 0.3 g/l KCl, 1 ml CuSO₄.H₂O solution (0.005 g/l), 1 ml ZnSO₄.7 H₂O solution (0.01 g/l) and 20 g/l fructose. Culture medium was autoclaved at 120°C for 20 minutes, except fructose, which was autoclaved separately and further added aseptically to the culture medium. An aliquot of conidia suspension (10⁶ conidia/ml) from *F. verticillioides* 103F strain previously grown on PDA for 7 days at 25°C was inoculated in Erlenmeyer flasks added with 50 ml of defined liquid

culture medium. The fungicide fludioxonyl + metalaxil-M was added into the culture medium after 24h at manufacturer's recommended dose, i.e., 75 μ l fungicide (25 mg/ml fludioxonyl + 10 mg/mL metalaxil-M) in 50 ml liquid culture medium. The control cultures (without fungicide) were added by 75 μ l sterile distilled water 24 h after *F. verticillioides* inoculation. All cultures were incubated at 28°C, 180 rpm, for 14 days.

Scanning Electron Microscope

Samples of *F. verticillioides* were disposed over glass cover slides previously coated with poly-lysine. Glass cover slides were then fixed in a solution containing 2.5% glutaraldehyde and 0.1M sodium phosphate buffer (pH 7.2) for a period of 12 h at 4°C. Cover slides were then washed with sodium phosphate buffer (0.1M, pH 7.2) and subsequently postfixed with 1% osmium tetroxide in sodium phosphate buffer for 1h. The samples were dehydrated in a graded ethanol series (70, 80, 90 and 100%), critical point dried in CO₂ (BALTEC CPD 030 Critical Point Dryer). After drying the cover slides were taped onto stubs using carbon adhesive tape and coated with gold (BALTEC SDC 050 Sputter Coater). Finally, samples were viewed in a FEI Quanta 200 Scanning Electron Microscope.

Fumonisin analysis

Fumonisins were determined by high-performance liquid chromatography (HPLC) according to [30] with some modification [33]. Culture samples were extracted with 60 mL methanol-water (3:1, v/v). After standing for 10 min at room temperature, the suspension was shaken (150 rpm, 30 min) and centrifuged (4500 x g, 10 min).

One milliliter of the supernatant was applied onto a preconditioned Sep Pak accell plus QMA (*quaternary methylammonium*) cartridge (Waters Co., Ltd.). After washing the cartridge with methanol-water (3:1, 6 mL) followed by methanol (3 mL), the fumonisins were eluted with 10 mL methanol containing 0.5% acetic acid. The eluate was evaporated to dryness under a stream of nitrogen at 45°C, and the residue was dissolved in methanol-water (3:1, 800 μ L). After derivatization with 200 μ l *o*-phthalaldehyde (OPA) reagent, HPLC injections were made within 1 min. Fumonisin were analyzed by a reversed-phase, isocratic HPLC system (Shimadzu LC-10 AD pump and RF-10A XL fluorescence detector), using a Shim-pack CLC-ODS (M) column (4.6 x 250 mm, Shimadzu). Excitation and emission wavelengths were 335 nm and 450 nm, respectively. The eluent was CH₃OH: 0.1 M NaH₂PO₄ (80:20, v/v) adjusted to pH 3.3 with *ortho*-phosphoric acid at flow rate of 1 mL/min. The detection limits for FB₁ and FB₂ were 27.5 ng/g and 35.3 ng/g, respectively.

Statistical analysis

Differences in fumonisin production among the *F. verticillioides* strains and the fungicide dose that inhibits 50% of growth (ED₅₀) were analyzed by one-way ANOVA followed by the Tukey multiple comparison test (p<0.05). The correlation between the fumonisin production and ED₅₀ was analysed by the Pearson correlation test (p < 0.05). Statistical analysis was performed by the 'Statistica' software version 6.0 (Stat Soft, Inc.).

Results and Discussion

Fumonisin production in corn culture of 16 *F. verticillioides* strains tested is shown in Table 1. All strains produced FB₁ and FB₂ with levels ranging from 2.41 to 3996.36 µg/g and from 1.18 to 1209.91 µg/g, respectively (Table 1). The FB₁ levels were lower than those detected by [1], but higher than those reported [2]. [1] analyzed 34 *F. verticillioides* isolates from different feedstuffs and 33 of these isolates produced FB₁ and FB₂ at levels ranging from 5.6 to 25,846.4 µg/g and from 3.4 to 7507.5 µg/g, respectively. [2] detected FB₁ and/or FB₂ production ranging from 20 to 2168 µg/g and from 10 to 380 µg/g, respectively, in rice cultures of 40 *F. verticillioides* strains isolated from corn. Total fumonisin (FB₁ + FB₂) levels ranged from 3.59 to 5119.26 µg/g (Table 1). *F. verticillioides* strain 103F produced the highest total fumonisin level (5119.26 ± 400.25 µg/g), but this level was not statistically different from those produced by 119B, 97K and 119BR strains when compared by the Tukey test ($p < 0.05$, Table 1).

The fungicide dose that inhibits 50% of mycelial growth (ED₅₀) for 16 *F. verticillioides* strains is shown in Table 2. *F. verticillioides* strains showed a large variability concerning ED₅₀ values; for quintozone, 119B and 97K strains showed the highest (1679.3 µg/ml) and the lowest (183.2 µg/ml) ED₅₀ values, whereas for fludioxonil + metalaxyl-M, 113B and 103F strains showed the highest (38.4 + 15.4 µg/ml) and the lowest (1.4 + 0.7 µg/ml) ED₅₀ values, respectively. Quintozone was largely ineffective in inhibiting *in vitro* growth of all the 16 *F. verticillioides* strains, taking into account that their ED₅₀ values were > 50 µg/ml. These results are in accordance with the data reported by [26], who showed inefficacy of quintozone (187.5 g a.i./100 kg corn seed) for *F. verticillioides* control in corn seed. On the other hand, fludioxonil + metalaxyl-M was effective in inhibiting *in vitro* growth of 113F, 164G and 103G *F. verticillioides* strains, but moderately effective for other 13 strains. Pearson correlation test was carried out in order to evaluate the possible relationship between the fumonisin production of *F. verticillioides* strains and the ED₅₀ values for quintozone and fludioxonil + metalaxyl-M. There was no significant correlation ($p < 0.05$) between fumonisin production and ED₅₀ for any fungicide evaluated. The efficacy differences of the same fungicide in inhibiting the mycelial growth of *F. verticillioides* strains can be related to their genetic variability and thus to the higher or lower sensitivity of the strains. In similar studies, the fungicide efficacy also varied in relation to the different strains of the same pathogen [16,24,28]. [24] demonstrated differences in quintozone, procymidone, thiram and iprodione efficacy on mycelial growth inhibition of four *Phomopsis phaseoli* f. sp. *meridionalis* and *Phomopsis sojae* isolates. [16] detected differences in efficacy of benomyl, thiophanate-methyl, vinclozolin and iprodione on *in vitro* mycelial growth inhibition of 45 *Botrytis cinerea* isolates.

Differences in fungicide efficacy are related to their mechanism of action. Quintozone acts as a competitive inhibitor for inositol, a required growth substance for many fungi. Fludioxonil acts on histidine kinases called MAP kinases (Mitogen Activated Protein), which are involved in the transduction of a variety of extracellular signals and the regulation of different developmental processes such as gene expression, mitosis, cell differentiation, virulence, conidiation, survival, invasive hyphal growth and stress response [35,36]. Metalaxyl-M inhibits mycelial growth and conidia formation and acts by RNA inhibition [32].

Taking into account that fludioxonil + metalaxyl-M was moderately effective and effective on *in vitro* mycelial growth inhibition, the effect of this fungicide on mycelial morphology and fumonisin

production by *F. verticillioides* 103F strain was evaluated. After treatment with fungicide for 14 days the hyphae showed pronounced morphological alterations (Figure 1), i.e., malformation, swelling, wrinkling, formation of spherical structures, probably due to the action of fungicide in the cell membrane and cellular osmotic equilibrium. Fumonisin B₁ (FB₁) levels detected in culture medium added with fludioxonil + metalaxyl-M and control (without fungicide) are shown in Figure 1. Fungicide added to the culture medium at recommended commercial concentration (25 + 10 mg/ml active ingredient) increased mean FB₁ levels (2.57 µg/ml) compared to the control (mean 0.72 µg/ml). Therefore, fungicide addition into the culture medium increased FB₁ production by 3.5-fold. Several researchers have reported an increase in mycotoxin production by *Fusarium* sp. in the presence of some fungicides [19,5,12]. [19] reported that tridemorph at 30-50 µg/ml inhibited *F. sporotrichioides* growth by 50% but stimulated T-2 toxin production by five fold. Mycotoxin production may be stimulated by fungicide due to a direct stress effect on mycotoxigenic species increasing the activity of enzymes involved in toxin biosynthesis [8].

In summary, fludioxonil + metalaxyl-M was effective and moderately effective in inhibiting *in vitro* growth of *F. verticillioides* strains, but at manufacturer's recommended dose there was an increase in mean FB₁ production compared to the control treatment. Although only one *F. verticillioides* strain had been evaluated for the effect of fludioxonil + metalaxyl-M on FB₁ production, these results indicated the importance of focusing the effect of fungicides on mycotoxin production in addition to the phytopathogen control.

Acknowledgement

The authors thank the CNPq (the Brazilian Government Organisation for grant aid and fellowship to Brazilian researchers), CNPq/ Ministry of Agriculture, the Araucária Foundation, PPSUS/Brazilian Ministry of Health, Paraná Fund/SETI and CAPES (Co-ordination for Formation of High Level Professionals) for the financial support.

References

1. ACUÑA, A.; LOZANO, M. C.; GARCÍA, M. C.; DIAZ, G. J. Prevalence of *Fusarium* species of the *Liseola* section on selected Colombian animal feedstuffs and their ability to produce fumonisins. **Mycopathologia** 2005; 160: 63–66.
2. ALMEIDA, A. P.; CORRÊA, B.; MALLOZZI, M.; SAWAZAKI, E.; SOARES, L. M. V. Mycoflora and aflatoxin / fumonisin production by fungal isolates from freshly harvested corn hybrids. **Braz J of Microbiol** 2000; 31:321- 326.
3. BEZUIDENHOUT, S. C.; GELDERBLOM, W. C. A.; GORST-ALLMAN, C.P; HORAK, R. M.; MARASAS, W. F. O.; SPITELLER, G.; VLEGGAR, R. Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme* . **J Chem Soci Chem Commun** 1988; 743-745.
4. CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira: grãos: quinto levantamento, fevereiro/2009/Companhia Nacional de Abastecimento** Brasília: Conab, 2009. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/5_levantamento_fev2009.pdf>. Acesso em: 04 mar. 2009.
5. D’MELLO, J. P. F.; MACDONALD, A. M. C., POSTEL, D., DIJKSMA, W. T. P. 3-Acetyl deoxynivalenol and esterase production in a fungicide-insensitive strain of *Fusarium culmorum*. **Mycotoxin Res** 1998^a; 14: 8–9.
6. D’MELLO, J. P. F.; MACDONALD, A. M. C.; POSTEL, D.; DIJKSMA, W. T. P.; DUJARDIN, A.; PLACINTA, C. M. Pesticide use and mycotoxins production in *Fusarium* and *Aspergillus* phytopathogens. **Eur J of Plant Pathol** 1998^b; 104: 741–751.
7. EDGINGTON, L.V.; KNEW, K. L.; BARRON, G. L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. **Phytopathology** 1971; 61(1) : 42–44.
8. EDWARDS, S. G.; PIRGOZLIEV, S. R.; HARE, M. C.; JENKINSON, P. Quantification of trichothecene-producing *Fusarium* species in harvested grain by competitive PCR to determine efficacies of fungicides against *Fusarium* head blight of winter wheat. **Appl Environ Microb** 2001; 67:1575–1580.
9. GOULART, A. C. P. Tratamento de sementes de milho (*Zea mays* L) com fungicidas. **Rev Bras Sementes** 1993;15(2) :165–169.
10. GELDERBLOM, W. C. A.; ABEL, S.; SMUTS, C. M.; MARNEWICK, J.; MARASAS, W. F. O.; LEMMER, E. R.; RAMLJAK, D. Fumonisin-induced hepatocarcinogenesis: mechanisms related to cancer initiation and promotion. *Environ Health Persp* 2001, **Research Triangle Park**, 109 (.2): 291-300.
11. HARRISON, L. R.; COLVIN, B. M.; GRENE, J. T.; NEWMAN, L. E.; COLE, J. R. Pulmonary edema and hydrotorax in suine produced by fumonisin B₁, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. **J Vet Diagn Invest** 1990; Columbia, 2:217-221.
12. HOPE, R. J.; COLLEATE, A.; BAXSTER, E. S.; MAGAN, N. Interactions between environmental stress and fungicides effect growth and mycotoxin production by *Fusarium culmorum* isolates from wheat grain. **Eur J Plant Pathol** 2002; 108: 685–690.
13. IARC- International Agency for Research on Câncer. **Some naturally occurring substance: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins**. Lyon: OMS, 2002.
14. JIMÉNEZ, M.; MATEO, J. J.; HINOJO, M. J.; MATEO, R. Sugars and amino acids as factors affecting the synthesis of fumonisinas in liquid cultures by isolates of the *Gibberella fujikuroi* complex. **Inter J Food Microbiol** 2003; 89:185-193.
15. KELLERMAN, T. S.; MARASAS, W. F. O.; THIEL, P. G.; GELDERBLOM, W. C. A.; WOOD, M.; COETZER, J. A.W. Leukoencephalomalacia in two horses induced by oral dosing of fumonisin B₁. **Onderstepoort J Vet** 1990; 57: 269-275.

16. LAMONDIA, J. A.; DOUGLAS, S. M. Sensitivity of *Botrytis cinerea* from Connecticut Greenhouses to Benzimidazole and Dicarboximide Fungicides. **Plant Dis** 1997; 81:729-732.
17. LUZ, W. C. D. Combinação dos Tratamentos Biológico e Químico de Semente de Milho. **Fitopatol Bras** 2003; 28(1):37-40.
18. MILUS, E. A.; PARSON, C. E. Evaluation of foliar fungicides for controlling *Fusarium* head blight of wheat. **Plant Dis** 1994; 78: 697-699.
19. MUSS, M. O.; FRANK, M. The influence of the fungicide tridemorph on T-2 toxin production by *Fusarium sporotrichioides*. **Trans of Br Mycol Soc** 1985;54:585-590.
20. MÜLLENBORN, C.; STEINER, U.; LUDWIG, M.; OERKE, E. C. Effect of fungicides on the complex of *Fusarium* species and saprophytic fungi colonizing wheat kernels. **Eur J Plant Pathol** 2008; 120(2):157-166.
21. NELSON, P. E.; PLATTNER, R. D.; SHACKELFORD, D. D.; DESJARDINS, A. E. Production of fumonisins by *Fusarium moniliforme* strains from various substrates and geographic areas. **Appl Environ Microb** 1991;57:2410-2412.
22. NELSON, P. E. Taxonomy and biology of *Fusarium moniliforme*. **Mycopathologia** 1992; 117:26-36.
23. OLIVEIRA, W. F.; MIRANDA, B. A.; CAETANO, F. V.; MACHADO, L. A.; RAMALHO, V. Efeito de produtos fitossanitários no tratamento de sementes de milho (*Zea mays* L.), visando ao controle de *Fusarium moniliforme* (SHELD). **Pesq Agropec Trop** 1999; 29(1):65-69.
24. PARISI, J. J. D.; MENTEM, J. O. M.; MARTINS, M. C. Sensibilidade *in vitro* e *in vivo* de *Phomopsis sojae* e *Phomopsis phaseoli* f.sp. *meridionalis* a fungicidas. **Fitopatol Bras** 1999; 24:25-30.
25. PATRÍCIO, F. R. A.; BORIN, R. B. R. G.; DENUCCI, S.; LEME, L.C.; ORTOLANI, D. B. Tratamento de sementes de milho com fungicidas. **Fitopatol Bras** 1990; 15(2): 138.
26. PINTO, N. F. J. A. Eficiência de fungicidas no tratamento de sementes de milho visando o controle de *Fusarium moniliforme* e *Pythium* sp. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 1997; 32:797-801.
27. RHEEDER, J. P.; MARASAS, W. F. O.; THIEL, P. G.; SYDENHAM, E. W.; SHEPHARD, G. S.; VANSCHALKWYK, D. J. *Fusarium moniliforme* and fumonisins in corn in relation to human esophageal cancer in Transkei. **Phytopathology** 1992; 82:353-7.
28. SILVA, J. C.; MEYER, M.C.; COUTINHO, W. M.; SUASSUNA, N. D. Fungitoxicidade de grupos químicos sobre *Myrothecium roridum* *in vitro* e sobre a mancha-de-mirotécio em algodoeiro. **Pesq Agropec Bras** 2006; 41:755-761.
29. SONG, W.; ZHOU, L.; YANG, C.; CAO, X.; ZHANG, L.; LIU, X. Tomato *Fusarium* wilt and its chemical control strategies in a hydroponic system. **Crop Prot** 2004;23:243-247.
30. SHEPHARD, G. S.; SYDENHAM, E. W.; THIEL, P. G.; GELDERBLUM, W. C. A. Quantitative determination of fumonisins B₁ and B₂ by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **J Liq Chromatogr** 1990;13:2077-2087.
31. SUMMERBELL, R. C. The Benomyl Test as a Fundamental Diagnostic Method for Medical Mycology. **J Clin Microbiol** 1993; 31:572-577.
32. SYNGENTA do Brasil. Produtos e Marcas. Disponível em: <<http://www.syngenta.com.br/website/produtos-e-marcas/protecao-de-cultivos/produtos/produto/especificacoes-tecnicas.aspx?IdProduto=60>>. Acesso em: 04 mar. 2009.
33. 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 Res** 1993; 9: 27-34.

34. UENO, Y.; IIJIMA, K.; WANG, S.; 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 Chem Toxicol** 1997;35:1143-1150.
35. XU, J. R. MAP kinases in fungal pathogens. **Fungal Genet and Biol** 2000;31:137-152.
36. ZHAO, X.; MEHRABI, R.; XU, J. R. Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways and Fungal Pathogenesis. **Eukaryot Cell**, 2007, 6:1701–1714.

Table 1 – Fumonisin production of *Fusarium verticillioides* strains in corn culture material.

<i>F. verticillioides</i> strains	FB ₁ (µg/g)	FB ₂ (µg/g)	FB ₁ + FB ₂ * (µg/g)
103 F	3996.36	1122.90	5119.26 ^a ± 400.25
119 B	3832.59	1209.91	5042.50 ^a ± 81.32
97 K	3098.88	952.80	4051.68 ^{ab} ± 433.43
119 BR	3256.08	792.18	4048.26 ^{ab} ± 164.36
119 Fa	2813.55	866.95	3680.50 ^b ± 631.45
97 L	2146.00	1084.00	3230.00 ^b ± 786.30
104 Ga	2390.22	754.02	3144.24 ^b ± 244.72
162 A	1162.08	640.98	1803.06 ^c ± 366.31
118 F	1219.70	506.40	1726.10 ^c ± 68.57
97 J	1230.99	397.16	1628.15 ^c ± 348.67
103 H	1025.72	585.78	1611.50 ^c ± 17.68
103 BR	1296.96	181.42	1478.38 ^{cd} ± 61.99
113 F	513.09	211.14	724.23 ^{cde} ± 48.75
103 G	168.60	56.14	224.74 ^{de} ± 39.67
113 B	109.39	106.21	215.60 ^e ± 4.02
164 G	2.41	1.18	3.59 ^e ± 0.47

All results are averages of replicate cultures and duplicate analysis

*Means followed by same letter indicate no significant difference by the Tukey test ($p < 0.05$)

Table 2 – Fungicide dose that inhibits 50% of mycelial growth (ED₅₀) of *Fusarium verticillioides* strains in Potato Dextrose Agar at 25°C for 7 days

<i>F. verticillioides</i> strains	Quintozene ED ₅₀ (µg/mL)	Maxim-XL	
		Fludioxonil ED ₅₀ (µg/mL)	+ Metalaxyl-M ED ₅₀ (µg/mL)
113 B	281.5 ^{fg}	38.4 ^a	15.4 ^a
103 F	468.2 ^{defg}	1.4 ^f	0.7 ^f
103 H	473.8 ^{defg}	34.6 ^{ab}	13.8 ^{ab}
162 A	1399.6 ^{ab}	16.8 ^{def}	6.7 ^{cde}
103 Br	842.2 ^c	15.1 ^{def}	6.0 ^{def}
97 L	1191.2 ^b	29.1 ^{bc}	11.6 ^{abc}
104 Ga	644.2 ^{cde}	24.0 ^{bcd}	9.6 ^{bcd}
97 K	183.2 ^g	19.8 ^{cde}	6.5 ^{cde}
119 BR	460.4 ^{defg}	31.6 ^{ab}	12.6 ^{ab}
119 B	1679.3 ^a	14.9 ^{def}	5.9 ^{def}
119 Fa	668.4 ^{cde}	12.8 ^{ef}	5.1 ^{def}
97 J	699.1 ^{cd}	14.7 ^{def}	5.9 ^{def}
118 F	390.1 ^{efg}	9.1 ^f	3.6 ^{ef}
113F	641.6 ^{cde}	26.0 ^{bcd}	10.4 ^{abcd}
164 G	551.6 ^{cdef}	9.9 ^f	3.9 ^{ef}
103 G	218.6 ^g	16.7 ^{de}	6.7 ^{cde}

*Means followed by same letter indicate no significant difference by the Tukey test ($p < 0.05$)

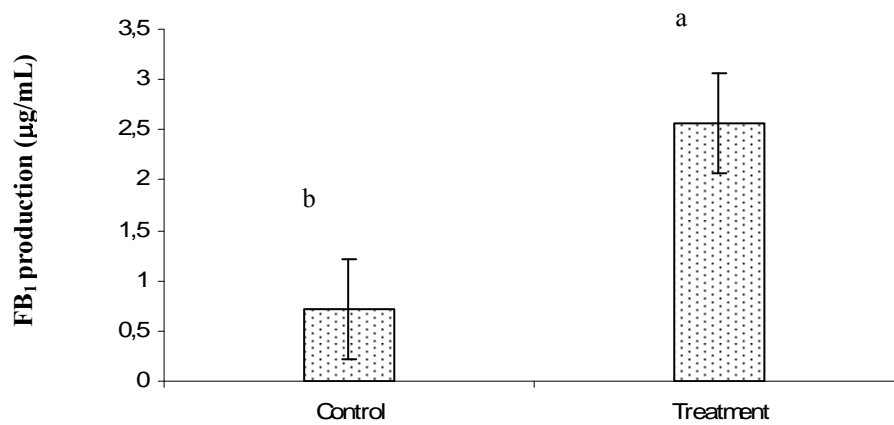


Figure 1 – Fumonisin B₁ production by *Fusarium verticillioides* 103 F strain in defined liquid culture medium with and without fludioxonil + metalaxyl-M grown at 28 °C for 14 days

*Control = without fungicide

** Treatment = addition of fungicide at manufacturer's recommended dose

***Mean of two replicates and duplicate analysis

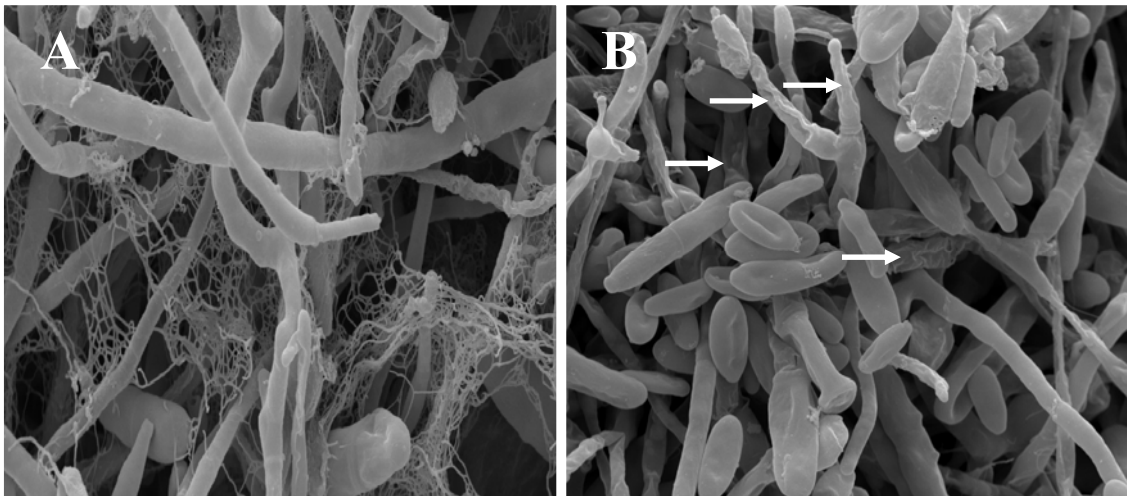


Figure 2 – Scanning electron micrographs of the hyphae from *Fusarium verticillioides* 103F strain grown in liquid culture medium at 28 °C, 180 rpm, for 14 days. (A) Hyphae from the untreated control (2500 x) 20 µm. (B) Hyphae from the treatment with fludioxonil + metalaxil-M (2500 x) 20 µm; (→: morphological alterations: swelling, wrinkling, due to the action of fungicide.

5.1 Avaliação de Adsorventes Inorgânico e Orgânico na Remoção de Fumonisina B₁ em Milho Triturado Contaminado

A capacidade de remoção de fumonisina FB₁ utilizando adsorventes inorgânico e orgânico na concentração de 0,5% (m/v) foi avaliada em cinco concentrações diferentes (5, 10, 20, 81, 94, 1529,23 µg/g) da toxina em 30 e 90 min de reação.

Na figura 10 estão apresentados os resultados da adsorção de FB₁ a partir de milho triturado contaminado empregando β-glucana, HSCAS, 50% β-glucana + 50% HSCAS e glucomanano modificado na concentração de 0,5% (m/v) com tempo de reação de 30 minutos. O milho triturado contaminado (controle) apresentou 81,94 µg/g de FB₁. A β-glucana adsorveu 49,14% de FB₁, enquanto que 50% β glucana + 50% HSCAS e HSCAS adsorveram 29,15% e 18,67% de FB₁, respectivamente. O glucomanano modificado (produto comercial) não adsorveu FB₁. Nas figuras 11 e 12 estão apresentados os resultados da adsorção a partir de milho triturado contaminado contendo 1.529,23 µg/g de FB₁ empregando os adsorventes a 0,5% (m/v) em dois tempos de reação, 30 e 90 min. Quando o adsorvente foi deixado em contato com o milho triturado contaminado por 30 min, o HSCAS removeu 45,0% de FB₁, seguido de glucomanano modificado (42,1%), β-glucana (33,2%) e 50% β-glucana + 50% HSCAS (22,3%). No entanto, para o tempo de reação de 90 min, os níveis de adsorção para FB₁ foram de 51,7% (75% β-glucana + 25% HSCAS), 36,6% (β-glucana), 19,79% (50% β-glucana + 50% HSCAS), 33,01 (HSCAS) e 24,8% (glucomanano modificado).

Portanto, em milho triturado contaminado contendo 81,94 µg/g de FB₁ a β-glucana apresentou maior capacidade de adsorção, enquanto que em 1.529,23 µg/g de FB₁ o HSCAS e a mistura (75% β-glucana + 25% HSCAS) apresentaram melhores resultados dependendo do tempo de reação. Por outro lado, a adição dos adsorventes a concentrações mais baixas de FB₁ (5, 10 e 20 µg/g) não reduziram os níveis de FB₁.

Aly et al. (2004) demonstraram que HSCAS utilizado em diferentes concentrações (0,5%, 1%, 2% e 4%, m/v) em extrato de malte artificialmente contaminado com 5, 10, 50 µg/mL de FB₁ em solução aquosa resultaram na adsorção de 85,1% a 92,4%. Entretanto em níveis de 0,5% (m/v) de HSCAS com 50, 100 e 200 µg/kg de FB₁, a adsorção variou de 85,25% a 91,97% .

Vários outros estudos indicaram que os aluminossilicatos de cálcio e sódio hidratado (HSCAS) conhecidos como bentonita, zeolita, filosilicatos e montmorilonita

possuem superfícies moleculares que atraem e imobilizam as micotoxinas por meio de cargas elétricas, sendo que a adsorção dependerá de fatores como forma, tamanho das partículas, diâmetro do poro, pH, carga elétrica da toxina e estruturas dos adsorventes (DAVIDSON et al., 1987; RAMOS; HERNANDEZ, 1997; KUBENA; HARVEY; BAILEY, 1998).

As β -glucanas são polissacarídeos altamente organizados que compõem estruturalmente a parede celular de leveduras, fungos e alguns cereais. A alta adsorção por β -glucanas está relacionado às paredes celulares que contém polissacarídeos (glucana, manana), proteínas, e lipídios que exibem numerosos centros de adsorção e que incluem diferentes mecanismos de adsorção (VOLKL; KARLOVSKY, 1999).

De acordo com Yiannikouris et al. (2006) as β -D-glucanas isoladas de *Saccharomyces cerevisiae* são utilizadas como adsorventes de micotoxinas reduzindo sua biodisponibilidade no trato digestivo protegendo os animais de efeitos adversos. Em avaliação *in vitro* as β -D-glucanas testadas em diferentes pH (3, 6 e 8) demonstraram que as taxas de ligação a aflatoxina B₁, desoxinivalenol e ocratoxina A aumentaram sob condições ácidas e neutras.

Em estudos *in vitro* o produto comercial Mycosorb® a nível de 0,1% (m/v) com adição de 2 μ g/mL das toxinas adsorveu 18% de desoxinivalenol e 6% de nivalenol em pH 3, enquanto que em pH 8, 3% de desoxinivalenol e 10% de nivalenol, respectivamente. Entretanto com 10 μ g/mL das toxinas adsorveu 0% de desoxinivalenol e 1% de nivalenol em pH 3 e 9% de desoxinivalenol e 7% de nivalenol em pH 8, respectivamente (AVANTAGGIATO; HAVENAARB; VISCONTIA, 2004).

Murthy e Devegowda (2009) demonstraram que o glucomanano modificado (Mycosorb®) foi capaz de adsorver aflatoxina B₁, zearalenona e fumonisinas em níveis de 92%, 75% e 59%, respectivamente.

A capacidade dos adsorventes colestiramina (CH), celite, bentonita e carbono ativado foram avaliados *in vitro* a 1 mg/ml em soluções aquosas com concentrações (3,25 a 260 μ g/mL) de FB₁ para adsorção da fumonisina. A colestiramina e o carbono ativado demonstraram melhor capacidade de adsorção variando de 85% e 62% respectivamente, em solução contendo 200 μ g/ml de FB₁. No entanto, na solução com 13 μ g/ml de FB₁ a bentonita adsorveu 12%, enquanto que na menor concentração de FB₁ testada (3,2 μ g/ml) a celite não adsorveu nada.

Nas amostras de farinha de milho a colestiramina foi testada nas concentrações (10 e 100 mg/g) com diferentes níveis de fumonisinas (3 μ g/g e 162 μ g/g). Os resultados obtidos variaram de 16 a 95% para FB₁ (SOLFRIZZO et al., 2000).

Os resultados do presente estudo demonstraram maior capacidade de adsorção de HSCAS, β -glucana, glucomanano modificado a partir de milho triturado contaminado contendo altas concentrações de FB_1 que em concentrações mais baixas da toxina. Os testes *in vitro* constituem um passo fundamental no desenvolvimento e controle de qualidade de adsorventes. Para estudos *in vivo* ainda faltam bioensaios sensíveis e específicos para a maioria das micotoxinas conhecidas (AVANTAGGIATO et al., 2003).

Vários estudos demonstraram diferentes graus de eficácia de adsorventes orgânicos e inorgânicos na detoxificação de rações contaminadas com micotoxinas, no entanto, mais estudos são requeridos para otimizar as condições para adsorção de fumonisinas.

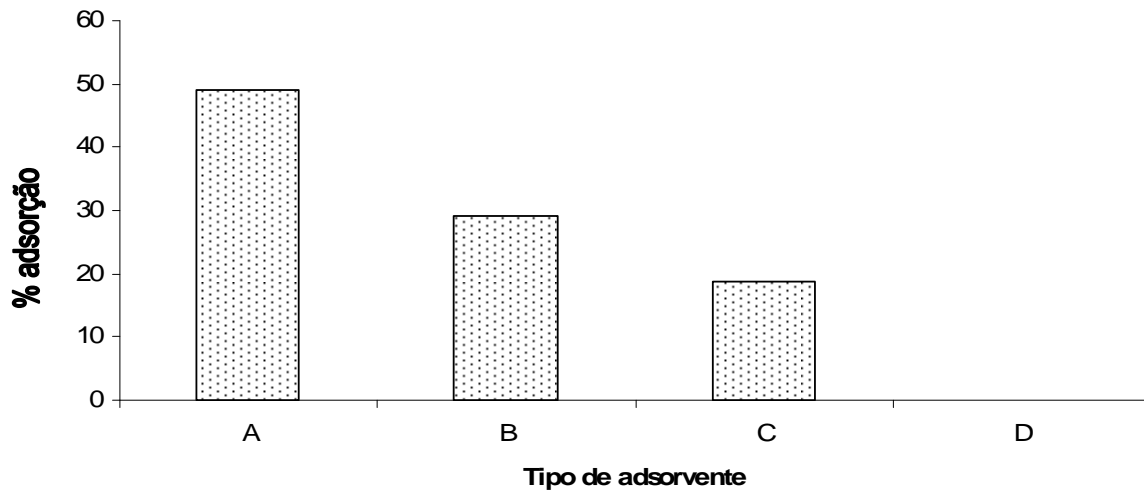


Figura 10 – Adsorção (%) a partir do milho triturado contaminado contendo 81,94 $\mu\text{g/g}$ de FB_1 empregando adsorventes na concentração de 0,5% (m/v) com tempo de reação de 30 minutos. (A) β -glucana, (B) (β -glucana) 50% + 50% (HSCAS), (C) HSCAS e (D) Glucomanano modificado.

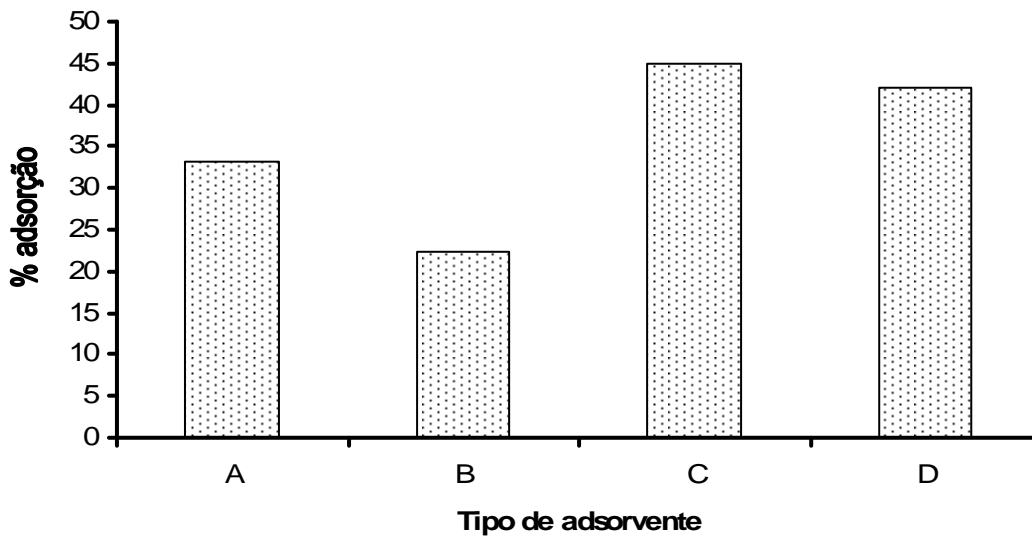


Figura 11 – Adsorção (%) a partir de milho triturado contaminado contendo 1.529,23 $\mu\text{g/g}$ de FB_1 empregando os adsorventes a 0,5% (m/v) em 30 minutos de reação. (A) β -glucana, (B) (β -glucana) 50% + 50% (HSCAS), (C) HSCAS e (D) Glucomanano modificado.

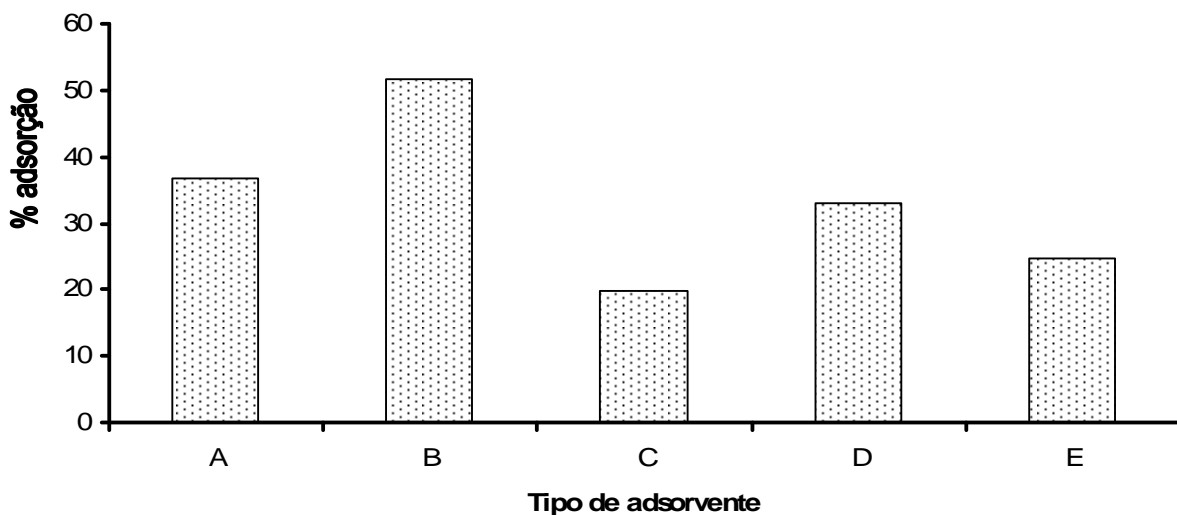


Figura 12 – Adsorção (%) a partir de milho triturado contaminado contendo 1.529,23 $\mu\text{g/g}$ de FB_1 empregando os adsorventes a 0,5% (m/v) em 90 minutos de reação. (A) β -glucana, (B) (β -glucana) 75% + 25% (HSCAS), (C) (β -glucana) 50% + 50% (HSCAS), (D) HSCAS e (E) Glucomanano modificado.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As cepas de *Fusarium verticillioides* apresentaram uma grande variabilidade dos valores de ED₅₀. O fungicida quintozeno foi ineficaz, enquanto que o fludioxonil + metalaxil-M foram eficazes e moderadamente eficazes na inibição do crescimento micelial *in vitro* das cepas de *F. verticillioides*. No entanto, o fludioxonil + metalaxil-M empregado na dose recomendada na agricultura causou um aumento na produção média de fumonisinas em meio de cultivo líquido definido. Desta forma, além do controle do fitopatógeno, é relevante considerar o efeito dos fungicidas na produção de micotoxinas.

Os adsorventes HSCAS, β -glucana, glucomanano modificado apresentaram melhor capacidade de adsorção de fumonisina FB₁ a partir de milho triturado contaminado contendo altas concentrações de FB₁, porém mais estudos são requeridos para otimizar as condições de adsorção.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, H. K; WILLIAMS, W. P; WINDHAM, G. L; PRINGLE, H. C; XIE, W, SHIER, W. T. Aflatoxin and Fumonisin Contamination of Commercial Corn (*Zea mays*) Hybrids in Mississippi. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.5246-5254, 2002.
- ACUÑA, A.; LOZANO, M. C.; GARCÍA, M. C.; DIAZ, G. J. Prevalence of *Fusarium* species of the *Liseola* section on selected Colombian animal feedstuffs and their ability to produce fumonisins. **Mycopathologia**, v.160, p.63–66, 2005.
- ALMEIDA, A. P.; CORRÊA, B.; MALLOZZI, M.; SAWAZAKI, E.; SOARES, L. M. V. Mycoflora and aflatoxin / fumonisin production by fungal isolates from freshly harvested corn hybrids. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.31, p.321- 326, 2000.
- ALLTECH, 2009: Disponível em: < <http://hms.alltech.com/ireland/mycosorb.htm>>. Acesso em: 16 mar. 2009.
- ALY, S. E.; ABDEL-GALIL, M. M.; ABDEL-WAHAB, M. A. Application of adsorbent agents technology in the removal of aflatoxina B₁ and fumonisin B₁ from malt extract. **Food and Chemical Toxicology**, v.42, p.1825-1831, 2004.
- ANDREI, E. **Compêndio de Defensivos Agrícolas**. 5. ed. São Paulo: Andrei, 1996.
- ANTHONY, S.; ABEYWICKRAMA, K.; DAYANANDA, R.; WIJERATMAN, S. W.; ARAMBEWELA, L. Fungal pathogens associated with banana fruit in Sri-Lanka, and their treatment with essential oils. **Mycopathologia**, v.157, p.91–97, 2004.
- ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/monografias/f49.pdf>>. Acesso em: 17 fev. 2009.
- ASEVEDO, I. G.; GAMBALE, W.; CORRÊA, B.; PAULA, C. R.; ALMEIDA, R. M. A.; SOUZA, V. M. Mycoflora and aflatoxigenic species of *Aspergillus* spp. isolated from stored maize. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.25, n.1, p.46-50, 1994.
- AVANTAGGIATO, G.; HAVENAARB, R.; VISCONTIA, A. Evaluation of the intestinal absorption of deoxynivalenol and nivalenol by an *in vitro* gastrointestinal model, and the binding efficacy of activated carbon and other adsorbent materials. **Food and Chemical Toxicology**, v.42, p.817–824, 2004.
- AVANTAGGIATO, G.; SOLFRIZZO, M.; VISCONTI, A. Recent advances on the use of adsorbent materials for detoxification of *Fusarium* mycotoxins. **Food Additives and Contaminants**, v.22, p.379-88, 2005.
- AYRES, J. C. Significance of food mycology- an overview. In: RHODES, M. E. **Food Mycology**. Massachusetts: G.K.Hall & Co., 1979. p.3-10,
- AZIZ, N. H.; MOUSSA, L. A. Reduction of fungi and mycotoxins formation in seeds by gamma-irradiation. **Journal of Food Safety**, v.24, p.109–127, 2004.

- AZIZ, N. H.; EL-FAR ; F. M.; SHAHIN, A. A. M; ROUSHY, S. M. Control of *Fusarium* moulds and fumonisin B₁ in seeds by gamma-irradiation. **Food Control**, v.18, p.1337–1342, 2007.
- 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.
- BACON, C. W.; YATES, I. E.; HINTON, D. M.; FILMORE, M. Biological control of *Fusarium moniliforme* in maize. **Environmental Health Perspectives**, v.109 (Suppl. 2), p.325–343, 2001.
- BARMAC INDUSTRIES PTY LTD. Disponível em:
<http://www.barmac.com.au/brochures/CHLD_AG_BR.pdf>. Acesso em: 04 mar. 2009
- BATA, A.; LASZTITY, R. Detoxification of mycotoxin-contaminated food and feed by microorganisms. **Trends in Food Science and Technology**, v.10, p.223–228, 1999.
- BAUER, J. Möglichkeiten zur Entgiftung mykotoxinhaltiger Futtermittel. **Monatsh. Veterinarmed**, v.49, p.175–181, 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, Chemical Communications**, p.743-745, 1988.
- BULLERMAN, L. B. Significance of mycotoxins to food safety and human health. **Journal of Food Protection**, v.42, n. 1, p.65-86, 1979.
- 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**. New York: Plenum Press, 1996. p.27-38.
- BUTCHKO, R. A. E.; PLATTNER, R. D.; PROCTOR, R. H. FUM9 is required for C-5 hydroxylation of fumonisins and complements the methodically defined fum3 locus in *Gibberella moniliformis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, n.11, p.6935 - 6937, 2003.
- CAHAGNIER, B.; MELCION, D.; RICHARD-MOLARD, D. Growth of *Fusarium moniliforme* and its biosynthesis of fumonisin B₁ on maize grain as a function of different water activities. **Letters in Applied Microbiology**, v.20, p.247–251, 1995.
- CAST. Mycotoxins. Economic and health risks. Task Force Rep. No. 116. **Council for Agricultural Science and Technology**, Ames, IA, 1989.
- CAST, Mycotoxins: Risks in Plant, Animal, and Human Systems. Task Force Report No. 139, **Council for Agricultural Science and Technology**, Ames, Iowa, USA, 2003.
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da Safra Brasileira: Grãos: quinto levantamento, fevereiro/2009**. Disponível em:
<http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/5_levantamento_fev2009.pdf>. Acesso em: 04 mar. 2009.

CHRISTENSEN, C. N.; SAUER, D. B. Mycoflora: In: Christensen, C.N. ed. Storage of cereal grains and their products. Minnesota: **American Association of Cereal Chemists**, p.219-240, 1982.

DAKOVIC, A.; CANOVIC, M. T.; DONDUR, V.; ROTTINGHAUS, G. E.; MEDAKOVIC, V.; SNE`ZANAZARI. Adsorption of mycotoxins by organozeolites. **Colloids and Surfaces B- Biointerfaces**, v. 46, n. 1, p.20-25, 2005.

DAKOVIC, A.; CANOVIC, M. T.; ROTTINGHAUS, G. E.; MATIJASEVIC, S.; SEKULIC, Z. Fumonisin B₁ adsorption to octadecyldimethylbenzyl ammonium-modified clinoptilolite-rich zeolitic tuff. **Microporous and Mesoporous Materials**, v.105, p.285–290, 2007.

DAWSON, K. A. Anatomia do adsorventes de micotoxinas à base de carboidratos. **Feeding Times**, v.7, n.3, p.9, 2002.

DAVIDSON, J. N.; BABISH, J. G.; DELANEY, K. A.; TAYLOR, D. R.; PHILLIPS, T. D. Hydrated sodium calcium aluminosilicate decreases the bioavailability of aflatoxin in the chicken. **Poultry Science**, v.66 (Suppl. 1), p.89, 1987.

DESHENG, Q.; FAN, L.; YANHU, Y.; NIYA, Z. Adsorption of Aflatoxin B₁ on Montmorillonite. College of Animal Science. **Poultry Science**, v.84, p.959–961, 2005.

DEWAARD, T. L.; WATKINS, K. L.; SOUTHERN, L. L.; HOYT, P. G.; FRENCH, D. D. Interactive effects of sodium zeolite-A and copper in growing swine: growth, and bone and tissue mineral concentrations. **Journal of Animal Science**, v.69, p.726–733, 1991.

DEWAARD, M. A.; GEORGOPOULOS; S. G.; HOLLOMON, D. W.; ISHII, H.; LEROUX, P.; RAGSDALE, N. N.; SCHWINN, F. J. Chemical control of plant diseases: problems and prospects. **Annual Review of Phytopathology**, v.31, p.403, 1993.

DILKIN, P. ; MALLMANN, C. A.; ALMEIDA, C. A. A.; STEFANON, E. B.; FONTANA, F. Z.; MILBRADT, E. L. Production of fumonisins by strains of *Fusarium moniliforme* according to temperature, moisture and growth period. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.33, n.2, p.111-118, 2002.

DOKO, M. B.; CANET, C.; BROWN, N.; SYDENHAM, E. W.; MPUCHANE, S.; SIAME, B. A. Natural co-occurrence of fumonisins and zearalenone in cereals and cereal based foods from eastern and southern Africa. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.44, p.3240–3243, 1996.

D`MELLO, J. P. F.; MACDONALD, A. M. C.; POSTEL, D.; DIJKSMA, W. T. P. 3-Acetyl deoxynivalenol and esterase production in a fungicide-insensitive strain of *Fusarium culmorum*. **Mycotoxin Research**, v.14, p.8–9, 1998a .

D`MELLO, J. P. F.; MACDONALD, A. M. C.; POSTEL, D.; DIJKSMA, W. T. P.; DUJARDIN, A.; PLACINTA, C. M. Pesticide use and mycotoxins production in *Fusarium* and *Aspergillus* phytopathogens. **European Journal of Plant Pathology**, v.104, p.741–751, 1998b

D`MELLO, J. P. F.; PLACINTA, C. M.; MACDONALD, A. M. C. *Fusarium* mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity. **Animal Feed Science and Technology**, v.80, p.183–205, 1999.

DVORSKA, J. E.; SURAI, P. F. Effect of T-2 toxin, zeolite and Mycosorb on antioxidant systems of growing quail. **Journal of Animal Science**, v.14, p.1752–1757, 2001.

DVORSKA, J. E.; SURAI, P. F.; SPEAKE, B. K.; SPARKS, N. H. C. Protective effect of modified glucomannans against aurofusarin-induced changes in quail egg and embryo. **Comparative Biochemistry and Physiology: Toxicology & Pharmacology**, v 135C, n.3, p.337–343, 2003.

EDGINGTON, L.V.; KNEW, K. L.; BARRON, G. L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. **Phytopathology**, St.Paul, v.61, n.1, p.42–44, 1971.

EDWARDS, S. G.; PIRGOZLIEV, S. R.; HARE, M. C.; JENKINSON, P. Quantification of trichothecene-producing *Fusarium* species in harvested grain by competitive PCR to determine efficacies of fungicides against *Fusarium* head blight of winter wheat. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p.1575–1580, 2001.

EMBRAPA, 2007. **Sistemas de Produção**, 3^a ed Setembro-2007. Disponível em: <<http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho/economia.htm>>. Acesso em: 15 mar. 2009.

FEEDING TIMES. Norcliff Enterprises Ltd.Dublin. **Republic of Ireland**, v.7, n.3, p.12, 2002.

FOOD RESEARCH INSTITUTE. University of Wisconsin. ***Fusarium* Mycotoxins**. Madison; 1997.

FUJIMURA, M.; OCHIAI, N.; ICHIISHI, A.; USAMI, R.; HORIKOSHI, K.; YAMAGUCHI, I. Fungicide Resistance and Osmotic Stress Sensitivity in *os* Mutants of *Neurospora crassa*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.67, ed.2, p.125-133, 2000.

GELDERBLUM, 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.

GELDERBLUM, 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.

GELDERBLUM, W. C. A.; ABEL, S.; SMUTS, C. M.; MARNEWICK, J.; MARASAS, W. F. O.; LEMMER, E. R.; RAMLJAK, D. Fumonisin-induced hepatocarcinogenesis: mechanisms related to cancer initiation and promotion. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, v.109, n.2, p.291-300, 2001.

GOULART, A. C. P; FIALHO, W. E. B. Incidência e controle de *Fusarium moniliforme* sheldon em sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, v.21, n. 1, p.216-221, 1999.

GOULART, A. C. P. Tratamento de sementes de milho (*Zea mays* L) com fungicidas. **Revista Brasileira de Sementes**, v.15, n.2, p.165–169, 1993.

HARRISON, L. R.; COLVIN, B. M.; GRENE, 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**, Columbia, v.2, p.217-221, 1990.

HOPE, R. J.; COLLEATE, A.; BAXSTER, E. S.; MAGAN, N. Interactions between environmental stress and fungicides effect growth and mycotoxin production by *Fusarium culmorum* isolates from wheat grain. **European Journal of Plant Pathology**, v.108, p.685-690, 2002.

HUWIG, A.; FREIMUND, S.; KAPPELI, O.; DUTLER, H. Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. **Toxicology Letters**, v.122, p.179-188, 2001.

IARC - International Agency for Research on Câncer. **Some naturally occurring substance: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins**. Lyon: OMS, 2002.

IEA, Instituto de Economia Agrícola. Disponível em <<http://www.iea.sp.gov.br/out/verTexto.php?codTexto=9200>> Acesso em: 10 mar. 2009.

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

JOUANY, J. P. Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v.137, p.342-362, 2007.

KARLOVSKY, P. Biological detoxification of fungal toxins and its use in plant breeding, feed and food production. **Natural Toxins**, v.7, p.1-23, 1999.

KELLERMAN, T. S.; MARASAS, W. F. O.; THIEL, P. G.; GELDERBLUM, W. C. A.; CAWOOD, M.; COETZER, J. A. W. Leukoencephalomalacia in two horses induced by oral dosing of fumonisin B₁. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v.57, p.269-275, 1990.

KIMATI, H. Controle químico. In: BERGAMIN FILHO, A; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia**. 3.ed. São Paulo: Ceres., 1995. p.761-785.

KIMATI, H. Evolução dos Fungicidas. In: SIMPÓSIO - CONTROLE QUÍMICO DE DOENÇAS DE PLANTAS. **Summa Phytopathologica**, v.22, n.1, p.79-80, 1996.

KUBENA, L. F.; HARVEY, R. B.; BAILEY, R. H. Effects of a hydrated sodium aluminosilicate (T-Bind) on mycotoxicosis in young broiler chickens. **Poultry Science**, v.77(1), p.1502-1509, 1998.

KNOWMYCOTOXINS. 2009. Disponível em <<http://www.knowmycotoxins.com/pt/npig15.htm>> Acesso em: 28 mar. 2009.

LAMONDIA, J. A.; DOUGLAS, S. M. Sensitivity of *Botrytis cinerea* from Connecticut Greenhouses to Benzimidazole and Dicarboximide Fungicides. **Plant Disease**, v.81, p.729-732, 1997.

- LAROCHE, C.; MICHAUD, P. New Developments and Prospective Applications for β (1,3) Glucans. **Recent Patents on Biotechnology**, v.1, p.59-73, 2007.
- LEMKE, S. L.; GRANT, P. G.; PHILLIPS, T. D. Adsorption of zearalenone by organophilic montmorillonite clay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, p.3789–3796, 1998.
- LEMKE, S. L.; MAYURA, K.; OTTINGER, S. E.; MCKENZIE, K. S.; WANG, N.; FICKEY, C.; KUBENA, L. F.; PHILLIPS, T. D. Assessment of the estrogenic effects of zearalenone after treatment with ozone utilizing the mouse uterine weight bioassay. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v.56, p.283–295, 1999.
- LEMKE, S. L.; OTTINGER, S. E.; AKE, C. L.; MAYURA, K.; PHILLIPS, T. D. Deamination of Fumonisin B₁ and Biological Assessment of Reaction Product Toxicity. **Chemical Research in Toxicology**, v.14, p.11-15, 2001a.
- LEMKE, S. L.; OTTINGER, S. E.; MAYURA, K.; AKE, C. L.; PIMPUKDEE, K.; WANG, N.; PHILLIPS, T. D. Development of a multi-tiered approach to the in vitro prescreening of clay-based enterosorbents. **Animal Feed Science and Technology**, v.93, p.17-19, 2001b.
- LUZ, W. C. D. Combinação dos Tratamentos Biológico e Químico de Semente de Milho. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, n.1, p.37-40, 2003.
- MARASAS, W. F. Discovery and Occurrence of the Fumonisin: A Historical Perspective. **Environmental Health Perspectives**, v.109, supl. 2, p.239-243, 2001.
- MARÍN, S.; SANCHIS, V.; VINAS I.; CANELA, R.; MAGAN, N. Effect of water activity and temperature on growth and fumonisin B₁ and B₂ production by *Fusarium proliferatum* and *F. moniliforme* on maize grain. **Letters in Applied Microbiology**, v.21, p.298-301, 1995.
- MARÍN, S.; COMPANYS, E.; SANCHIS, V.; RAMOS, A. J.; MAGAN, N. Effect of water activity and temperature on competing abilities of common maize fungi. **Mycological Research**, v.120, p.959 -964, 1998.
- MILLER, J. D.; SARVARD, M. E.; SCHAAFSMA, A. W.; SEIFERT, K. A.; REID, L. M. Mycotoxin production by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* from Ontario and occurrence of fumonisin in the 1993 corn crop. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.17, p.233-239, 1995.
- MILUS, E. A.; PARSON, C. E. Evaluation of foliar fungicides for controlling *Fusarium* head blight of wheat. **Plant Disease**, v.78, p.697–699, 1994.
- MONKIEDJE, A.; ILORI, M. O.; SPITELLER, M. Soil quality changes resulting from the application of the fungicides mefenoxam and metalaxyl to a sandy loam soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v.34, n.12, p.1939-1948, 2002.
- MUSS, M. O.; FRANK, M. The influence of the fungicide tridemorph on T-2 toxin production by *Fusarium sporotrichioides*. **Transactions of British Mycology Society**, v.54, p.585–590, 1985.

- MÜLLENBORN, C.; STEINER, U.; LUDWIG, M.; OERKE, E. C. Effect of fungicides on the complex of *Fusarium* species and saprophytic fungi colonizing wheat kernels. **European Journal of Plant Pathology**, v.120, n.2, p.157–166, 2008.
- MUNKVOLD, G. P.; DESJARDINS, A. E. Fumonisin in maize can we reduce their occurrence? **Plant Disease**, v.81, n.6, p.556-565, 1997.
- MUNKVOLD, G. P.; HELLMICH, R. L.; RICE, L. G. Comparison of fumonisin concentrations in kernels of transgenic Bt maize hybrids and non-transgenic hybrids. **Plant Disease**, v.83, p.130–138, 1999.
- MURPHY, P. A.; HENDRICH, S.; LANDGREN, C.; DRYANT, C. M. Food Mycotoxins: An Update. **Journal of Food Science**, v.71, n.5, 2006.
- MURTHY; DEVEGOWDA, 2009. Disponível em <http://www.alltech-bio.com/Brasil/artigos/Pics/Murthy_port.pdf> Acesso em: 15 maio 2009.
- MUSSER, S. M.; PLATTNER, R. D. Fumonisin composition in cultures of *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum* and *Fusarium nygami*. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.45, p.1169-1173, 1997.
- MCBEATH, J. H. Biological management of snow mold. **Golf Course Manage**, v.71, p.124–126, 2003.
- MCKENZIE, K. S.; SARR, A. B.; MAYURA, K.; BAILEY, R. H.; MILLER, D. R.; ROGERS, T. D.; NORRED, W. P.; VOSS, K. A.; PLATTNER, R. D.; KUBENA, L. F.; PHILLIPS, T. D. Oxidative degradation and detoxification of mycotoxins using a novel source of ozone. **Food Chemical Toxicology**, v.35, p.807–820, 1997.
- NELSON, P. E.; PLATTNER, R. D.; SHACKELFORD, D. D.; DESJARDINS, A. E. Production of fumonisins by *Fusarium moniliforme* strains from various substrates and geographic areas. **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, p.2410-2412, 1991.
- NELSON, P. E. Taxonomy and biology of *Fusarium moniliforme*. **Mycopathologia**, v.117, p.26-36, 1992.
- NELSON, P. E.; PLATTNER, R.D; SHACKELFORD, D; DESJARDINS, A. E. *Fumonisin B₁* Production by *Fusarium* Species Other Than *F. moniliforme* in Section Liseola and by Some Related Species. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, n.3, p.984-989, 1992.
- OCHIAI, N.; FUJIMURA, M.; OSHIMA, M.; MOTOYAMA, T.; ICHIISHI, A.; YAMADA-OKABE, H.; YAMAGUCHI, I. Effects of iprodione and fludioxonil on glycerol synthesis and hyphal development in *Candida albicans*. **Biosciences Biotechnology and Biochemistry**, v.66, n.10, p.2209-2215, 2002.
- OLIVEIRA, W. F.; MIRANDA, B. A.; CAETANO, F. V.; MACHADO, L. A.; RAMALHO, V. Efeito de produtos fitossanitários no tratamento de sementes de milho (*Zea mays* L.), visando ao controle de *Fusarium moniliforme* (SHELD). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.29, n.1, p.65-69, 1999.

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

PARK, D. L. Perspectives on mycotoxin decontamination procedures. **Food Additives and Contaminants**, v.10, p.49-60, 1993.

PARISI, J. J. D.; MENTEM, J. O. M.; MARTINS, M. C. Sensibilidade *in vitro* e *in vivo* de *Phomopsis sojae* e *Phomopsis phaseoli* f.sp. *meridionalis* a fungicidas. **Fitopatologia Brasileira**, v.24, n.1, p.25-30, 1999.

PAN Pesticides DataBase. Disponível em <<http://www.pesticideinfo.org>>. Acesso em: 13 jan. 2009.

PATRÍCIO, F. R. A.; BORIN, R. B. R. G.; DENUCCI, S.; LEME, L. C.; ORTOLANI, D. B. Tratamento de sementes de milho com fungicidas. **Fitopatologia Brasileira**, v.15, n.2, p.138, 1990.

PERAICA, M.; RADIC, B.; LUCIC, A.; PAVLOVIC, M. Toxic effects of mycotoxins in humans. **Bulletin of World Health Organization**, v.66, n.9, p.754-766, 1999.

PINTO, N. F. J. A. Eficiência de fungicidas no tratamento de sementes de milho visando o controle de *Fusarium moniliforme* e *Pythium* sp. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.32, p.797-801, 1997.

PITT, J. I. Toxigenic Fungi: Which Are Important?. **Medical Mycology**, Oxford, v.38, suppl.1, p.17-22, 2000.

PIVA, G.; GALVANO, F.; PIETRI, A.; PIVA, A. Detoxification methods of aflatoxins. A review. **Nutrition Research**, v.15, n.5, p.767-776, 1995.

PHILLIPS, T. D.; CLEMENT, B. A.; KUBENA, L. F.; HARVEY, R. B. Detection and detoxification of aflatoxins: prevention of aflatoxicosis and aflatoxin residues with hydrated sodium calcium aluminosilicates. **Veterinary and Human Toxicology**, v.32, p.15-19, 1990.

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* mycotoxins. **Animal Feed Science and Technology**, v. 78, p.21-37, 1999.

RAMOS, A. J.; FINK-GREMMELS, J.; HERNANDEZ, E. Prevention of the toxic effects of mycotoxins by means of non-nutritive absorbent compounds. **Journal of Food Protection**, v.59, p. 631-641, 1996.

RAMOS, A. J.; HERNANDEZ, E. Prevention of aflatoxicosis in farm animals by means of hydrated sodium calcium aluminosilicate addition to feedstuffs. A review. **Animal Feed Science and Technology**, v.65, p.197-206, 1997.

RANA, B. K.; SINGH, U. P.; TANEJA, V. Antifungal activity and kinetics of inhibition by essential oil isolated from leaves of *Aegle marmelos*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.57, p. 29-34, 1997.

ROSA, C. A. R.; MIAZZO, R.; MAGNOLI, C.; SALVANO, M.; CHIACCHIERA, S. M.; FERRERO, S.; SAENZ, M.; CARVALHO, E. C. Q.; DALCERO, A. Evaluation of the efficacy of bentonite from the south of Argentina to ameliorate the toxic effects of aflatoxin in broilers. **Poultry Science**, v.80, p.139–144, 2001.

RHEEDER, J. P.; MARASAS, W. F. O.; THIEL, P. G.; SYDENHAM, E. W.; SHEPHARD, G. S.; VANSCHALKWYK, D. J. *Fusarium moniliforme* and fumonisins in corn in relation to human esophageal cancer in Transkei. **Phytopathology**, v.82, p.353–7, 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.

SAMSON, R. A.; HOEKSTRA, E. S.; FRISVAD, J. C. **Introduction to food and airborne fungi**. 7. ed. Utrecht: Centraalbureau Voor Schimmelcultures, 2004. p.156.

SEIFERT, K. *Fusarium* and anamorph generic concepts. In: SUMMERELL, BA et al.(Ed.). **Fusarium**. Minnesota: APS Press St.Paul, 2001. p.15–28.

SEO, J. A.; LEE, Y. W. Natural occurrence of the C series of fumonisins in moldy corn. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.1331–1334, 1999.

SINDAG - **Sindicato Nacional das Empresas de Aviação Agrícolas**.

Disponível em < <http://www.sindag.com.br/upload/MercadodeAgroquimicos2007-Dadosgerais.ppt> > Acesso em: 12 fev. 2009.

SILVA, J. B.; POZZI, C. R.; MALLOZZI, M. B.; ORTEGA, E. M.; CORRÊA, B. Mycoflora and occurrence of aflatoxin B₁ and fumonisin B₁ during storage of Brazilian sorghum. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, p.4352–4356, 2001.

SILVA, J. C.; MEYER, M. C.; COUTINHO, W. M.; SUASSUNA, N. D. Fungitoxicidade de grupos químicos sobre *Myrothecium roridum in vitro* e sobre a mancha-de-mirotécio em algodoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.5, p.755–761, 2006.

SIJPESTEIJN, A. K. Mechanism of action of fungicides. In: DEKKER, J.; GEORPOULOS, S.G. (Ed.). **Fungicide resistance in crop protection**. Wageningen, Centre for Agricultural Publishing and Documentation, 1982.

SOLFRIZZO, M.; VISCONTI, A.; AVANTAGGIATO, G.; TORRES, A.; CHULZE, S. *In vitro* and *in vivo* studies to assess the effectiveness of cholestyramine as a binding agent for fumonisins. **Mycopathologia**, v.151, p.147–153, 2000.

SONG, W.; ZHOU, L.; YANG, C.; CAO, X.; ZHANG, L.; LIU, X. Tomato *Fusarium* wilt and its chemical control strategies in a hydroponic system. **Crop Protection**, v.23, p.243–247, 2004.

SORIANO, J. M.; DRAGACCI, S. Occurrence of fumonisins in foods. **Food Research International**, v.37, p.985–1000, 2004.

SUMMERBELL, R. C. The Benomyl Test as a Fundamental Diagnostic Method for Medical Mycology. **Journal of Clinical Microbiology**, v.31, p.572–577, 1993.

- SCHEIDELER, S. E. Effects of various types of aluminosilicates and aflatoxin B₁ on aflatoxin toxicity, chick performance, and mineral status. **Poultry Science**, v.72, p.282–288, 1993.
- SCHELL, T. C.; LINDEMANN, M. D.; KORNEGAY, E. T.; BLODGETT, D. J. Effects of feeding aflatoxin-contaminated diets with and without clay to weanling and growing pigs on performance, liver-function, and mineral metabolism. **Journal of Animal Science**, v.71, p. 1209–1218, 1993.
- SCHISLER, D. A.; KHAN, N. I.; BOEHM, M. J.; SLININGER, P. J. Greenhouse and field evaluation of biological control of *Fusarium* head blight on durum wheat. **Plant Disease**, v.86, p.1350–1356, 2002.
- SMITH, E. E.; PHILLIPS, T. D.; ELLIS, J. A.; HARVEY, R. B.; KUBENA, L. F.; THOMSON, J.; NEWTON, G. Dietary hydrated sodium calcium aluminosilicate reduction of aflatoxin M₁ residue in dairy goat milk and effects on milk production and components. **Journal of Animal Science**, v. 72, p. 677–682, 1994.
- SPAHR, U.; WALTHER, B.; SIEBER, R.; GAFNER, J. L.; GUIDON, D. Vorkommen von Mykotoxinen in Futtermitteln und carry over in die Milch: eine Übersicht. **Mitteilungen Aus Lebensmitteluntersuchung Und Hygiene**, v. 90, p.575-609, 1999.
- SYNGENTA do Brasil. **Produtos e Marcas**. Disponível em: <<http://www.syngenta.com.br/website/produtos-e-marcas/protecao-de-cultivos/produtos/produto/especificacoes-tecnicas.aspx?IdProduto=60>>. Acesso em: 04 mar. 2009.
- SHEPARD, G. S.; SYDENHAM, E. W.; THIEL, P. G.; GELDERBLUM, W. C. A. Quantitative determination of fumonisins B₁ and B₂ by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Liquid Chromatography**, v.13, p.2077-2087, 1990.
- SWEENEY, M. J.; DOBSON, A. D. W. Review: mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. **International Journal of Food Microbiology**, v. 43, p. 141–158, 1998.
- TORRES, M. R.; RAMOS, A. J.; SOLER, J.; SANCHIS, V.; MARÍN, S. SEM study of water activity and temperature effects on the initial growth of *Aspergillus ochraceus*, *Alternaria alternata* and *Fusarium verticillioides* on maize grain. **International Journal of Food Microbiology**, v.81, p.185-193, 2003.
- TURNER, P. C.; NIKIEMA, P.; WILD, C. P. Fumonisin contamination of food: progress in development of biomarkers to better assess human health risks. **Mutation Research**, v.443, p. 81-93, 1999.
- 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 con-based products in Asia countries. **Mycotoxin Research**, v.9, p.2734, 1993.

- UENO, Y.; IJIMA, K.; WANG, S.; 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**, Oxford, v.35, p.1143-1150, 1997.
- VÖLKL, A.; KARLOVSKY, P. Hefen und Tonminerale binden Mycotoxine: Wirksamkeit mineralischer und organischer Substanzen unterschiedlich. **Agrarzeitung Ernährungsdienst**, 1999.
- 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.
- WICKLOWD, T.; HORN, B. W.; SHOTWELL, O. L.; HESSELTINE, C. W.; CALDWELL, R. W. Fungal interference with *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin contamination of maize grown in a controlled environment. **Phytopathology**, v.78, p.68-74, 1988.
- YIANNIKOURIS, A.; JOUANY, J. P. Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a review. **Animal Research**, v.51, p.81-99, 2002.
- YIANNIKOURIS, A.; POUGHON, L.; CAMELEYRE, X.; DUSSAP, C. G.; FRANÇOIS, J.; BERTIN, G.; JOUANY, J. P. A novel technique to evaluate interactions between *S. cerevisiae* cell wall and mycotoxins: application to zearalenone. **Biotechnology Letters**, v.25, n.10, p.783-789, 2003.
- YIANNIKOURIS, A.; ANDRE, G.; POUGHON, L.; FRANÇOIS, J.; DUSSAP, C.G.; JEMINET, G.; BERTIN, G.; JOUANY, J. P. Chemical and Conformational Study of the Interactions Involved in Mycotoxin Complexation with β -D-Glucans. **Biomacromolecules**, v.7, p.1147-1155, 2006.
- XU, J. R. MAP kinases in fungal pathogens. **Fungal Genetics and Biology**, v.31, p.37-152, 2000.
- ZHANG, Y.; LAMM, R.; PILLONEL, C.; LAM, S.; XU, J. R. Osmoregulation and fungicide resistance: the *Neurospora crassa* OS-2 gene encodes a HOG1 mitogen-activated protein kinase homologue. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.532-538, 2002.
- ZHAO, X.; MEHRABI, R.; XU, J. R. Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways and Fungal Pathogenesis. **Eukaryotic Cell**, v.6, n.10, p.1701-1714, 2007.

ANEXO

ANEXO A – Normas para publicação no periódico Mycopathologia.

Aims and scope: *Mycopathologia*, founded in 1938, is an international journal devoted to the study of the role of fungi in disease and biodeterioration. As such, the journal covers a diverse, interdisciplinary range of topics that is unique in breadth and depth, including original articles and critical reviews highlighting important developments in the fields of medical and veterinary mycology, plant mycology and crop protection, mycotoxicoses and mycotoxins, molecular mycology, environmental aeromycology, entomopathogenic fungi and applied industrial mycology. The journal also welcomes papers on systematics and taxonomy of fungi involved in any of the above fields.

We trust that you will find this Online Manuscript Submission, Review and Tracking System very user friendly. To make your start even easier, please find below a few instructions:

New Authors: Please click the 'Register' button from the menu above and enter the requested information. Upon successful registration you will be sent an e-mail with instructions to verify your registration.

Note:

- When you have received an e-mail from us with an assigned user ID and password, DO NOT REGISTER AGAIN. Just log in to the system as 'Author'.

Authors: Please click the 'Login' button from the menu above and log in to the system as 'Author'. Then submit your manuscript and track its progress through the system. A wide range of submission file formats is supported, including: Word, WordPerfect, RTF, TXT, TIFF, GIF, JPEG, EPS, LaTeX2E, TeX, Postscript, PICT, Excel, Tar, Zip and Powerpoint.

PDF is not an acceptable file format.

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Authors should submit their manuscripts online. Electronic submission substantially reduces the editorial processing and reviewing times and shortens overall publication times. Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Title Page

The title page should include:

The name(s) of the author(s)

A concise and informative title

The affiliation(s) and address(es) of the author(s)

The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.

- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Note: If you use Word 2007, do not create the equations with the default equation editor but use the Microsoft equation editor or MathType instead.
- Save your file in doc format. Do not submit docx files.
-

Word template

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.
LaTeX macro package

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols. Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full.

References

Citation

Reference list

Citation

Reference citations in the text should be identified by numbers in square brackets. Some examples:

1. Negotiation research spans many disciplines [3].
2. This result was later contradicted by Becker and Seligman [5].
3. This effect has been widely studied [1-3, 7].

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

The entries in the list should be numbered consecutively.

Journal article

- Smith JJ. The world of science. *Am J Sci* 1999;36:234–5.

Article by DOI

- Slifka MK, Whitton JL. Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med* 2000; doi:10.1007/s001090000086

Book

- Blenkinsopp A, Paxton P. *Symptoms in the pharmacy: a guide to the management of common illness*. 3rd ed. Oxford: Blackwell Science; 1998.

Book chapter

- Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. In: Bourne GH, Danielli JF, Jeon KW, editors. *International review of cytology*. London: Academic; 1980. pp. 251–306.

Online document

- Doe J. Title of subordinate document. In: *The dictionary of substances and their effects*. Royal Society of Chemistry. 1999. [http://www.rsc.org/dose/title of subordinate document](http://www.rsc.org/dose/title%20of%20subordinate%20document). Accessed 15 Jan 1999.

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php

Tables

- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

Artwork Guidelines

For the best quality final product, it is highly recommended that you submit all of your artwork – photographs, line drawings, etc. – in an electronic format. Your art will then be produced to the highest standards with the greatest accuracy to detail. The published work will directly reflect the quality of the artwork provided.

Electronic Figure Submission

Supply all figures electronically.

- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format.
- MS Office files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.
-

Line Art

Definition: Black and white graphic with no shading.

- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art

Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.

- If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.
- Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.
-

Combination Art

- Definition: a combination of halftone and line art, e.g.,
- halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.
 - Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.
 -

Color Art

- Color art is free of charge for online publication.
- If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent. If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.
 - Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).
 -

Figure Lettering

- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
 - Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
 - Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
 - Do not include titles or captions within your illustrations.
 -

Figure Numbering

- All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
 - Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
 - If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text.
 - Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc."
 - Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- No punctuation is to be included after the number,
- nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- Identify previously published material by giving the original source
- in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

- When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
- For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.
- For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used

Electronic Supplementary Material

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Submission

- Supply all supplementary material in standard file formats.
- To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

Audio, Video, and Animations

- Always use MPEG-1 (.mpg) format.

Text and Presentations

- Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term

- viability.
A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended.

- If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel).

Specialized Formats

Specialized format such as .pdb (chemical), .vrl (VRML), .nb (Mathematica notebook),

- and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables (e.g., ". . . as shown in Animation 3").

Name your files accordingly, e.g., Animation3.mpg.

Captions

For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting

After acceptance

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer's web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice, offprints, or printing of figures in color.

Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink. We regret that Springer Open Choice cannot be ordered for published articles.

Springer Open Choice

Copyright transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws. Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, they agree to the Springer Open Choice Licence.

Offprints

Additional offprints can be ordered by the corresponding author.

Color illustrations

Online publication of color illustrations is free of charge. For color in the print version, authors will be expected to make a contribution towards the extra costs.

Proof reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor. After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

Languages

Articles and abstracts must be in English or in the journal's official language(s), but the journal accepts additional abstracts in other languages of the author's choice (for instance in the author's first language, if not English or the journal's official language). Such abstracts are optional. Authors would need to supply such abstracts themselves, certify that they are a faithful translation of the official abstract, and they must be supplied in Unicode (see www.unicode.org for details), especially if they are using non-roman characters. <http://www.unicode.org>

Such abstracts in other languages will carry a disclaimer:

"This abstract is provided by the author(s), and is for convenience of the users only. The author certifies that the translation faithfully represents the official version in the language of the journal, which is the published Abstract of record and is the only Abstract to be used for reference and citation."