



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MELISSA TIEMI HIROZAWA

ANTIBIOSE DE *Fusarium verticillioides* E DETOXIFICAÇÃO *IN VITRO* DE
FUMONISINA B₁ POR BACTÉRIAS LÁCTICAS

Londrina
2015

MELISSA TIEMI HIROZAWA

ANTIBIOSE DE *Fusarium verticillioides* E DETOXIFICAÇÃO *IN VITRO* DE
FUMONISINA B₁ POR BACTÉRIAS LÁCTICAS

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina como um dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Elisabete Yurie Sataque Ono

Londrina
2015

MELISSA TIEMI HIROZAWA

ANTIBIOSE DE *Fusarium verticillioides* E DETOXIFICAÇÃO *IN VITRO* DE
FUMONISINA B₁ POR BACTÉRIAS LÁCTICAS

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina como um dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Elisabete Yurie Sataque
Ono
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Sandra Garcia
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Alexandre Rodrigo Coelho
Universidade Tecnológica Federal do Paraná -
UTFPR

Londrina, 10 de abril de 2015.

*Dedico este trabalho aos meu pais Neusa
Tomoko Hirozawa e Orlando Shigueru
Hirozawa pelo amor, incentivo e
dedicação.*

AGRADECIMENTOS

À Prof^a Dr^a Elisabete Yurie Sataque Ono pela orientação e todos ensinamentos indispensáveis para a realização deste trabalho.

Ao CNPq, Fundo Paraná/SETI, à Fundação Araucária e CAPES pelo apoio financeiro e pela concessão de bolsa de mestrado.

À Prof^a Dr^a Sandra Garcia e seus alunos pela disponibilização das cepas de bactérias lácticas e colaboração com o trabalho.

Ao Prof. Dr. Mario Augusto Ono pela disponibilização de materiais.

À Prof^a Dr^a Elisa Yoko Hirooka pela disponibilização das cepas de *F. verticillioides*.

Aos professores do Programa do Mestrado em Biotecnologia pelos ensinamentos e colaboração em diversos aspectos.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia (BBTEC/UEL): Elda Jonas Aguiar, Sérgio do Nascimento Evangelista e especial à Sandra Aparecida Defende e ao Nelson Janeiro Rodriguez pela amizade e por todo auxílio imprescindível nesses anos de mestrado.

Aos amigos de curso Aline Merci, Alana Carvalho Machado, Letícia Mileny Santos, Agnes Magri, Tamires Minucelli, Glauber Henrique Mantovani de Oliveira, Talita Busulini Martins, Francielle Lina Vidotto, Fabíola Azanha de Carvalho, Leonardo Guerreiro Borges dos Santos, Andressa Jacqueline de Oliveira e em especial Suellen Mika Hishinuma Silva, Danielle Cardoso Gimenes e Jaqueline Gozzi Bordini pelo companheirismo, amizade e suporte tanto nos dias alegres quanto nos dias mais difíceis.

Aos alunos de graduação e pós-graduação do Laboratório de Imunologia Animal da UEL – Aline Miyuki Omori, Giovana Gomes de Carvalho, Rafaela Macagnan e Isabele Kazahaya Borges.

Ao meu namorado Diego Augusto de Camargo por todo o amor, companheirismo e compreensão.

Aos meus irmãos Sabrina Satie Hirozawa, Fábio Hirozawa, Alexandre Hirozawa, aos meus tios Rosa Satie e Massami Shigaki, aos meus primos Jackson e Guilherme Shigaki e aos meus avós Tomie e Kazuo Hirozawa que de alguma forma me ajudaram a ter força e perseverança para enfrentar os obstáculos no meio deste caminho.

A todos que colaboraram para a realização deste trabalho.

“Seja a mudança que você gostaria de ver no mundo” Mahatma Gandhi

HIROZAWA, Melissa Tiemi. **Antibiose de *Fusarium verticillioides* e detoxificação *in vitro* de fumonisina B1 por bactérias lácticas**. 2015. 85 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

RESUMO

Fusarium verticillioides é o principal fitopatógeno das culturas de milho, além de causar danos à planta produz metabólitos secundários tóxicos denominados de micotoxinas, sendo o principal produtor de fumonisinas. A Fumonisina B1 é o metabólito prevalente e mais tóxico e pode causar grandes prejuízos econômicos e riscos à saúde de seres humanos e animais. Portanto, torna-se fundamental a busca por métodos de controle do crescimento de *F. verticillioides*, além de minimizar a contaminação por fumonisinas. O controle biológico utilizando bactérias lácticas (BAL) consiste em um método promissor, pois além da atividade antifúngica, estes micro-organismos apresentam a capacidade de detoxificação de micotoxinas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antifúngica de cepas de BAL frente a 5 cepas de *F. verticillioides* e avaliar a detoxificação *in vitro* de fumonisina B1 utilizando bactérias lácticas (viáveis e inativadas por tratamento térmico). Também foi avaliada a influência da concentração do caldo MRS, pH e concentração do ácido láctico e ácido acético no antagonismo fúngico, assim como a concentração inibitória mínima dos ácidos láctico e acético. As BAL apresentaram diferentes níveis de inibição frente a *F. verticillioides*, sendo que as cepas *Lactobacillus reuteri* LR-92 e *L. plantarum* BG112 demonstraram maior atividade antifúngica contra a cepa 97L, com diâmetros de inibição de 30 e 24 mm, respectivamente. A cepa 97L demonstrou ser a mais sensível à presença do ácido acético e láctico com diâmetros de inibição que variaram de 26 a 55 mm e 10 a 17 mm, respectivamente. Todas as cepas de BAL demonstraram capacidade em remover a FB1 *in vitro* com porcentagens que variaram de 30,1% a 78,0% (células viáveis) e 49,5% a 88,0% (células inviáveis). *L. fermentum* ATCC 9339 e *L. reuteri* LR-92 apresentaram maiores porcentagens de remoção da FB1, 78,0% e 80,7% (célula viável e inviável) e 71,9% a 88,0% (células viáveis e inviáveis), respectivamente. As BAL demonstraram atividade antifúngica e capacidade de remoção da FB1, indicando potencial para serem utilizadas como um aditivo para minimizar os riscos à saúde animal.

Palavras-chave: Antagonismo. Bactéria láctica. *Lactobacillus reuteri*. *Lactobacillus plantarum*. *Lactobacillus fermentum*. Adsorção.

HIROZAWA, Melissa Tiemi. *Fusarium verticillioides* antibiosis and *in vitro* detoxification of fumonisin B1 by lactic acid bacteria. 2015. 85 f. Dissertation (Master's degree in Biotechnology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

ABSTRACT

Fusarium verticillioides is the major corn phytopathogen and producer of fumonisins, which are toxic secondary metabolites (mycotoxins). Fumonisin B1 is the prevalent mycotoxin and the most toxic and can cause great economic losses and health risks to humans and animals. Therefore, it is essential to search for fungal growth control methods, as well as for minimization of contamination by mycotoxins. Biological control using lactic acid bacteria (LAB) is a promising method, because in addition to the antifungal activity, it has detoxification capacity of mycotoxins. The objective of this study was to evaluate the antifungal activity of LAB strains against five *F. verticillioides* strains and *in vitro* fumonisin B1 detoxification using lactic acid bacteria (viable and unviable cells). In addition, it was evaluated the influence of the MRS broth concentration, pH and concentration of lactic acid and acetic acid in the fungal antagonism, and the minimal inhibitory concentrations of lactic and acetic acids. The LAB strains showed different levels of inhibition against *F. verticillioides*, and the *Lactobacillus reuteri* LR-92 and *Lactobacillus plantarum* BG112 strains showed higher antifungal activity against 97L strain, with inhibition zones of 30 mm and 24 mm, respectively. *F. verticillioides* 97L strain proved to be more sensitive to the acetic acid and lactic acid with inhibition diameters ranging from 26 to 55 mm and from 10 to 17 mm, respectively. All the LAB strains demonstrated ability to remove FB1 *in vitro* with percentages ranging from 30.1% to 78.0% (viable cells) and 49.5% to 88.0% (unviable cells). *L. fermentum* ATCC 9339 and *L. reuteri* LR-92 showed the highest removal of FB1, 78.0% and 80.7% (viable and unviable cell) and 71.9% to 88.0% (viable and unviable cells), respectively. LAB strains demonstrated antifungal activity and FB1 removal capacity indicating potential to be used as an additive in order to minimize animal health hazards.

Key words: Antagonism. Lactic acid bacteria. *Lactobacillus reuteri*. *Lactobacillus plantarum*. *Lactobacillus fermentum*. Adsorption.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Estrutura química das fumonisinas B1, B2 e B3	18
Figura 2 –	Representação esquemática da via de biossíntese de fumonisinas	19
Figura 3 –	Semelhança estrutural da Fumonisina B1 e as bases esfingóides	20
Figura 4 –	Inibição da via de biossíntese de esfingolipídeos pela FB1 (O símbolo X representa os locais da inibição)	21

LISTA DE TABELAS

Artigo A

Table 1 –	Antagonistic activity of comercial cultures of lactic acid bacteria against five <i>F. verticillioides</i> strains (97L, 97K, 103F, 113F e 103G).....	59
Table 2 –	Effect of different concentrations of acetic acid, lactic acid, MRS broth and pH on fungal antagonism.....	59
Table 3 –	Minimum inhibitory concentrations of lactic and acetic acid for of <i>F. verticillioides</i> strains (97L, 97K, 103F, 113F and 103G).....	60
Table 4 –	Fumonisin B1 binding levels (%) by viable and unviable cells of LAB strains at 2.5 µg mL ⁻¹ FB1 concentration.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ALT	Alanina transaminase
AST	Aspartato transaminase
AC	<i>Aspergillus carbonarius</i>
AO	<i>Aspergillus ochraceus</i>
A _w	Atividade de água
AYM	<i>Ágar yeast malt</i>
BDA	Ágar batata dextrose
BAL	Bactérias do ácido láctico, bactérias lácticas ou bactérias ácido lácticas
BHI	<i>Brain heart infusion</i>
CFU	Concentração mínima inibitória
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DTNs	Defeitos no tubo neural
DON	Desoxinivalenol
PPE	Edema pulmonar suíno
Sa	Esfinganina
So	Esfingosina
FB ₁	Fumonisina B ₁
FB ₂	Fumonisina B ₂
FB ₃	Fumonisina B ₃
GGT	Gama glutamil transpeptidase
GRAS	<i>Generally recognized as safe</i>
BAL-FB	Interação entre grupos funcionais da fumonisina com a bactéria láctica
LAMIC	Laboratório de Análises Micotoxicológicas
LEME	Leucoencefalomalácia
LMT	Limite máximo tolerado
MRS	Man, Rogosa and Sharpe
MS	Mato Grosso do Sul
RPPN	Reserva Particular do Patrimônio Natural
PR	Paraná
PG	Peptidoglicano
pH	Potencial hidrogeniônico

rpm	Rotações por minuto
PBS	Tampão fosfato-salina ou <i>phosphate buffered saline</i>
UHT	<i>Ultra-high temperature</i>
UFC	Unidade formadora de colônia
FDA	U.S.Food and Drug Administration
YM	<i>Yeast and malt</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	MILHO	15
2.2	MICOTOXINAS	16
2.2.1	Fungos Produtores de Fumonisinias.....	16
2.2.2	Fumonisinias.....	17
2.2.2.1	Propriedades químicas e físicas.....	18
2.2.2.2	Biossíntese.....	18
2.2.2.3	Mecanismo de ação	19
2.2.2.4	Micotoxicoses causadas por fumonisinias.....	21
2.2.2.5	Ocorrência de fumonisinias em milho e derivados	23
2.3	ESTRATÉGIAS DE PREVENÇÃO DO CRESCIMENTO FÚNGICO E DA CONTAMINAÇÃO POR MICOTOXINAS	26
2.4	MÉTODOS DE DESCONTAMINAÇÃO DE MICOTOXINAS	27
2.4.1	Métodos Químicos e Físicos	28
2.4.2	Métodos Biológicos.....	29
2.4.2.1	Bactérias lácticas	29
2.4.2.1.1	<i>Bactérias lácticas no antagonismo de fungos toxigênicos</i>	30
2.4.2.1.2	<i>Bactérias lácticas na detoxificação de micotoxinas</i>	32
3	OBJETIVOS	35
3.1	OBJETIVO GERAL	35
3.2	OBJETIVO ESPECÍFICO	35
4	MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1	MATERIAL	36
4.1.1	Cepas de <i>Fusarium verticillioides</i>	36
4.1.2	Bactérias Lácticas Comerciais.....	36
4.2	AValiação DO ANTAGONISMO EM MEIO SÓLIDO	37
4.2.1	Bactérias Lácticas	37

4.2.1.1	Avaliação da influência de outros parâmetros no antagonismo frente a <i>Fusarium verticillioides</i>	37
4.2.1.1.1	Influência da concentração de ácido acético e ácido lático	37
4.2.1.1.2	Influência da concentração do caldo MRS	38
4.2.1.1.3	Influência do pH do meio	38
4.2.1.2	Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) do ácido lático e do ácido acético	38
4.3	ENSAIOS DE DETOXIFICAÇÃO DE FUMONISINA B ₁	39
4.3.1	Preparo da Suspensão de Bactérias Lácticas	39
4.3.2	Preparo do Padrão de Fumonisin B ₁	39
4.3.3	Análise da Detoxificação de Fumonisin B ₁ em Meio Líquido	39
4.4	DETERMINAÇÃO DE FUMONISINA B ₁ POR CLAE	40
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1	ARTIGO A: EFFECT OF LACTIC ACID BACTERIA ON <i>FUSARIUM VERTICILLIOIDES</i> GROWTH AND FUMONISIN B ₁ DETOXIFICATION	43
1	INTRODUCTION	44
2	MATERIAL AND METHODS	45
2.1	MICRO-ORGANISMS AND CULTURE CONDITIONS	45
2.2	EVALUATION OF ANTIFUNGAL ACTIVITY	46
2.3	EVALUATION OF EFFECT BY VARYING THE ACETIC ACID, LACTIC ACID AND MEDIA CONCENTRATION AND THE pH ON THE ANTIFUNGAL ACTIVITY	46
2.4	DETERMINATION OF THE MINIMUM INHIBITORY CONCENTRATION (MIC) OF LACTIC ACID AND ACETIC ACID IN THE FUNGAL GROWTH	47
2.5	FUMONISIN B ₁ DETOXIFICATION ASSAY	47
2.6	QUANTIFICATION OF FUMONISIN B ₁ BY HPLC	48
2.7	STATISTICAL ANALYSIS	48

3	RESULTS	48
3.1	EVALUATION OF ANTIFUNGAL ACTIVITY	49
3.2	EFFECT BY VARYING THE ACETIC ACID, LACTIC ACID AND MEDIA CONCENTRATION AND THE pH ON THE ANTIFUNGAL ACTIVITY	49
3.3	THE MINIMUM INHIBITORY CONCENTRATION (MIC) OF LACTIC ACID AND ACETIC ACID ON FUNGAL GROWTH	50
3.4	FUMONISIN B ₁ DETOXIFICATION ASSAY	50
4	DISCUSSION	51
5	ACKNOWLEDGEMENTS	53
	REFERENCES	54
	REFERÊNCIAS	61
	ANEXOS	83
	ANEXO A – Considerações sobre Escala nefelométrica de Mc Farland.....	84
	ANEXO B– Composição do caldo MRS	85

1 INTRODUÇÃO

O Brasil ocupa a 3ª posição no ranking dos maiores produtores de milho do mundo. A produção estimada para a safra de 2014/2015 é de 78,4 milhões de toneladas de milho, sendo que na safra de 2013/2014 o Estado do Paraná foi considerado o segundo maior produtor nacional, com uma produção estimada de 15,6 milhões de toneladas (CONAB, 2015).

O milho é um cereal amplamente consumido no mundo, porém sua composição nutricional favorece o crescimento de fungos filamentosos toxigênicos. Esses micro-organismos são produtores de micotoxinas, metabólitos secundários tóxicos que podem comprometer a saúde humana e animal (LOGRIECO et al., 2002; PLACINTA; D'MELLO; MACDONALD, 1999). *Fusarium* spp. são os principais contaminantes de culturas de milho (MILLS, 1989), sendo *Fusarium verticillioides* a mais prevalente em grãos de milho recém-colhidos (ORSI et al., 2000). Esta espécie está amplamente distribuída no mundo, acometendo cerca de 90% da produção mundial de milho (BACON; NELSON, 1994). Além disso, está associada a diversas micotoxicoses por produzirem altos níveis de micotoxinas (RHEEDER; MARASAS; VISMER, 2002).

A principal micotoxina produzida por *F. verticillioides* é a fumonisina (MARASAS, 2001). Desde a sua descoberta, foram descritos vinte e oito análogos sendo as fumonisinas B₁ (FB₁), B₂ (FB₂) e B₃ (FB₃) as mais frequentes em milho e derivados naturalmente contaminados. A FB₁ é a mais abundante e a mais tóxica (GALVANO et al., 2002; RHEEDER; MARASAS; VISMER, 2002; MALLMANN et al., 2001; SHEPHARD et al., 1996) e está associada a diversas micotoxicoses humanas e animais. A Agência Internacional de Pesquisa sobre o câncer classifica a fumonisina B₁ no grupo 2B, sendo considerada como um provável carcinógeno humano (IARC, 2002). Estima-se que esta micotoxina seja responsável por 70% da contaminação de alimentos no mundo (THIEL et al., 1991).

Em seres humanos, o consumo desta micotoxina a partir de grãos de milho contaminados está associado com a incidência de câncer esofágico em algumas regiões da África (RHEEDER et al., 1992; SYDENHAM et al., 1990) e China (SUN et al., 2007; WANG et al., 2000), câncer hepático primário (UENO et al., 1997) e defeitos no tubo neural em algumas regiões do México e da Guatemala (CIFUENTES, 2002; MISSMER et al., 2006). Em animais, as manifestações mais graves incluem leucoencefalomalácia em equinos

(MALLMANN, SANTURIO; DILKIN, 1999), diminuição do ganho de peso, aumento do tamanho do fígado e hiperplasia biliar em frangos de corte (LEDOUX et al., 1992) e em suínos, edema pulmonar, alterações hepáticas, cardiovasculares e no metabolismo de esfingolipídeos (HARRISON et al., 1990; HASCHEK et al., 2001).

Os métodos de controle de micotoxinas tem por objetivo a diminuição da concentração para um nível considerado seguro ou ainda a utilização de compostos não tóxicos que degradam a toxina, sem que haja perda na qualidade nutricional do alimento. Esses métodos são classificados em duas categorias principais: prevenção da contaminação e crescimento fúngico e detoxificação dos compostos tóxicos produzidos pelo fungo (MALLMANN et al., 2006).

Nos últimos anos, diversas estratégias de detoxificação de micotoxinas em cereais vêm sendo estudadas com o objetivo de minimizar a contaminação de rações por esses metabólitos tóxicos. Os métodos de detoxificação são classificados em químicos, físicos e biológicos (HUWIG et al., 2001), sendo que este último vem ganhando um lugar de destaque, devido à segurança que o método proporciona, além da busca recorrente na utilização de produtos naturais, que substituem os aditivos químicos e fungicidas em rações (GOURAMA; BULLERMAN, 1995; HOCKING et al.; 2006).

Diversas bactérias lácticas têm sido avaliadas devido ao seu potencial antimicrobiano e sua capacidade de detoxificação de micotoxinas (BETTIOL; GHINI, 1995; DALIÉ; DESCHAMPS; RICHARD-FORGET, 2010). Os mecanismos que podem estar envolvidos com o efeito inibitório sobre o crescimento fúngico incluem a competição nutricional, produção de metabólitos secundários, pH ou a combinação destes fatores (HANSEN, 2002).

A detoxificação microbiológica pode envolver mecanismos como a inibição da biossíntese de micotoxinas por bactérias lácticas, descontaminação de micotoxinas por meio da adsorção com componentes estruturais de bactérias lácticas e a degradação ou biotransformação enzimática (JUODEIKIENE et al., 2012).

Considerando os problemas associados à contaminação de milho por *F. verticillioides* e conseqüentemente pela fumonisina B₁, os riscos à saúde humana e animal e as vantagens na utilização de um método de biocontrole, este trabalho teve como objetivo avaliar a antibiose de bactérias lácticas frente a cepas de *Fusarium verticillioides* e analisar a detoxificação de fumonisina B₁ *in vitro*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MILHO

O milho (*Zea mays* L.) é um cereal que apresenta ampla utilização na alimentação de seres humanos e animais, principalmente devido à composição nutricional, na qual, predominam carboidratos e lipídeos (PAES, 2006). A importância social e econômica do grão é evidenciada pela sua inclusão como base alimentar em diversos países, sendo utilizado na produção de mais de 500 produtos alimentícios, além de participar diretamente na avicultura e suinocultura como ingrediente de rações (LAFIS, 2003; MELO FILHO; RICHETTI, 1997). No Brasil cerca de 70% a 80% do milho é destinado para alimentação animal principalmente de aves, bovinos e suínos (DUARTE et al., 2010; GARCIA et al., 2006). No ano de 2013 foram utilizados cerca de 39 milhões de toneladas de milho para a produção de ração (SINDIRAÇÕES, 2014).

A produção de milho no Brasil é caracterizada por apresentar duas épocas de plantio. A primeira safra ou plantio de verão é realizado em épocas tradicionais caracterizadas por períodos chuvosos, que variam desde o final de agosto na região Sul, até os meses de outubro/novembro nas regiões Sudeste e Centro-oeste. A segunda safra ou “safrinha” refere-se ao milho plantado extemporaneamente nos meses de fevereiro ou março, com predomínio nas regiões Centro-Oeste e nos estados do Paraná e São Paulo (CRUZ et al., 2006).

O milho é considerado um grão altamente energético, sendo a composição média em base seca do grão cerca de 72% de amido, 9,5% de proteínas, 9% de fibra e 4% de óleo. A qualidade do grão depende do seu destino final, por exemplo, o milho com alto teor de óleos (6,0 a 7,5%) e alto teor de proteínas (> 12%) é destinado à alimentação animal, enquanto que o milho com alto teor de amilose à indústria alimentícia ou de papel (PAES, 2006).

O elevado volume de produção do milho aliado a fatores climáticos (tropical-subtropical) torna-o susceptível ao desenvolvimento de fungos toxigênicos, que são responsáveis pela podridão em raízes, colmo e espiga, assim como pela deterioração do grão que resultam em grandes prejuízos econômicos (FERROCHIO et al, 2013). Além disso, esses fungos podem produzir metabólitos secundários tóxicos, denominados micotoxinas (BUIATE et al., 2008). Esses compostos, quando ingeridos ou inalados em baixas concentrações, podem causar danos à saúde em seres humanos e animais (HUSSEIN; BRASEL, 2001; RODRIGUEZ-AMAYA, 2000).

2.2 MICOTOXINAS

As micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos produzidos por fungos filamentosos. Esses produtos naturais compõem um grupo heterogêneo de compostos orgânicos, que apresentam baixa massa molecular e podem originar uma variedade de efeitos tóxicos a animais e seres humanos (BENNETT, 1987; BENNETT, KLICH, 2003; SMITH, MOSS, 1985). Os principais gêneros de fungos produtores de micotoxinas em alimentos são *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*. (MURPHY et al., 2006; SWEENEY; DOBSON, 1998)

Foram descritas mais de 400 micotoxinas, porém apenas algumas apresentam riscos à saúde (BENNETT, KLICH, 2003). As micotoxinas podem entrar na cadeia alimentar humana de forma direta, por meio do consumo de cereais, oleaginosas e derivados. A contaminação indireta ocorre pelo consumo de carne, ovos e leite provenientes de animais contaminados por micotoxinas através da ração (MOLIN, 1999). A contaminação de alimentos com micotoxinas ocorre no mundo todo, principalmente em grãos e cereais, que são alimentos suscetíveis à contaminação de fungos toxigênicos (MAZIERO; BERSOT, 2010).

2.2.1 Fungos Produtores de Fumonisinias

As fumonisinias compõem um grupo de micotoxinas produzidas principalmente por *F. verticillioides* (= *Fusarium moniliforme*) e *F. proliferatum*, sendo que o primeiro apresenta maior prevalência em milho (GELDERBLUM et al., 1988). Outras espécies produtoras de fumonisinias incluem *F. anthophilum*, *F. nygamai*, *Alternaria alternata* f. sp. *Lycopersici* (BENNETT; KLICH, 2003; CHEN et al., 1992; MUNKVOLD; DESJARDINS, 1997; RHEEDER, MARASAS; VISMER, 2002; ROSS et al., 1990).

Os fungos do gênero *Fusarium* estão associados a patologias de diversas culturas de importância mundial, como o milho, o trigo e a cana-de-açúcar, acarretando a diminuição da produtividade e da qualidade dos produtos. Além disso, produzem micotoxinas, que causam diversas micotoxicoses, resultando em grandes prejuízos econômicos e riscos à saúde de seres humanos e animais (SMITH; SEDDON, 1998).

F. verticillioides e *F. proliferatum* atingem cerca de 90% da produção de milho, sendo que 90% das linhagens de *F. verticillioides* isoladas são capazes de produzir fumonisinias (BACON; NELSON, 1994; FANDOHAN et al., 2003; RHEEDER; MARASAS; VISMER, 2002).

Segundo a classificação taxonômica o gênero *Fusarium* constitui um estado anamórfico da ordem Hypocreales do filo Ascomycota, pertence à classe Sordariomycetes, subdivisão Pezizomycotina. Inclui espécies que produzem colônias com colorações diversas (púrpura, alaranjado, rosa pálido, roxo e branco). São produtoras de macroconídios hialinos septados que podem ou não apresentar microconídios e clamidósporos (BURGESS et al., 1994).

Fusarium verticillioides pertence à seção Liseola do complexo *Gibberella fujikuroi*. Dentro deste complexo existem oito espécies designadas por letras de A a H, sendo que as designadas A, D e E são frequentemente encontradas em milho. As principais características deste complexo são células conidiogênicas que suportam o microconídio e dispõem os esporos. *F. verticillioides* apresenta cadeias longas de microconídios em monofiálide (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

Esta espécie de fungo causa doença em todas as fases de desenvolvimento do milho, causando podridão de raiz, colmo, espiga e deterioração dos grãos armazenados (MUNKVOLD; DESJARDINS, 1997). Apresenta ampla distribuição geográfica abrangendo regiões de clima temperado, tropical úmido e subtropical.

O desenvolvimento do fungo no grão depende de fatores como pH, atividade de água (a_w) e temperatura. As condições ótimas para o crescimento de *F. verticillioides* em milho são atividade de água (a_w) de 0,98 e temperatura de 25°C (MARÍN et al., 1998).

2.2.2 Fumonisinias

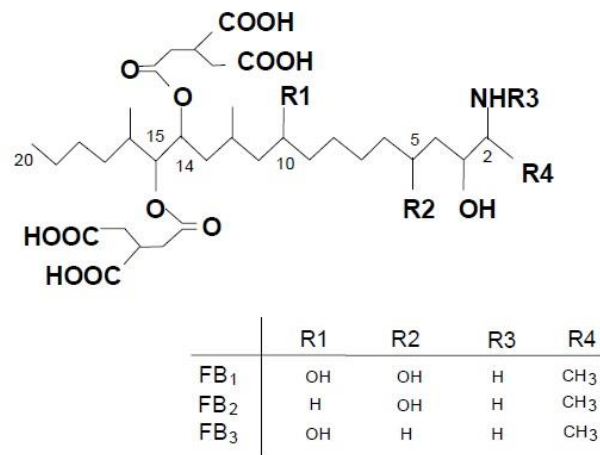
As fumonisinias foram caracterizadas quimicamente em 1988 na África do Sul por meio do seu isolamento de culturas de *Fusarium moniliforme* MRC 826 (GELDERBLOM et al., 1988). Foram caracterizados 28 análogos, sendo divididos em quatro grupos principais, identificados como fumonisinias: A, B, C e P (DUTTON, 1996; RHEEDER, MARASAS, VISMER, 2002; WHO, 2000).

As fumonisinias B₁ (FB₁), B₂ (FB₂) e B₃ (FB₃) são os análogos mais frequentes como contaminantes naturais em milho e derivados. A fumonisina B₁ (FB₁) constitui a forma mais tóxica e prevalente, representando cerca de 70% da contaminação total de alimentos e rações naturalmente contaminados (GALVANO et al., 2002; MALLMANN, 2001; NIDERKORN et al., 2009).

2.2.2.1 Propriedades químicas e físicas

As fumonisinas apresentam uma estrutura composta de 19 ou 20 carbonos lineares com grupos hidroxil e ácido tricarboxílico, ligados em várias posições ao longo da cadeia. A FB₁ possui a fórmula empírica C₃₄H₅₉NO₁₅, é um diéster de propano 1,2,3 – ácido tricarboxílico e 2 – amino – 12,16 dimetil – 3, 5, 10, 14, 15 – pentahidroieicosano (Figura 1) e nos carbonos C14 e C15 os grupos hidroxilas apresentam esterificação com o grupo carboxiterminal de propano 1, 2, 3 – ácido tricarboxílico (BEZUIDENHOUT et al., 1988).

Figura 1 – Estrutura química das fumonisinas B₁, B₂ e B₃



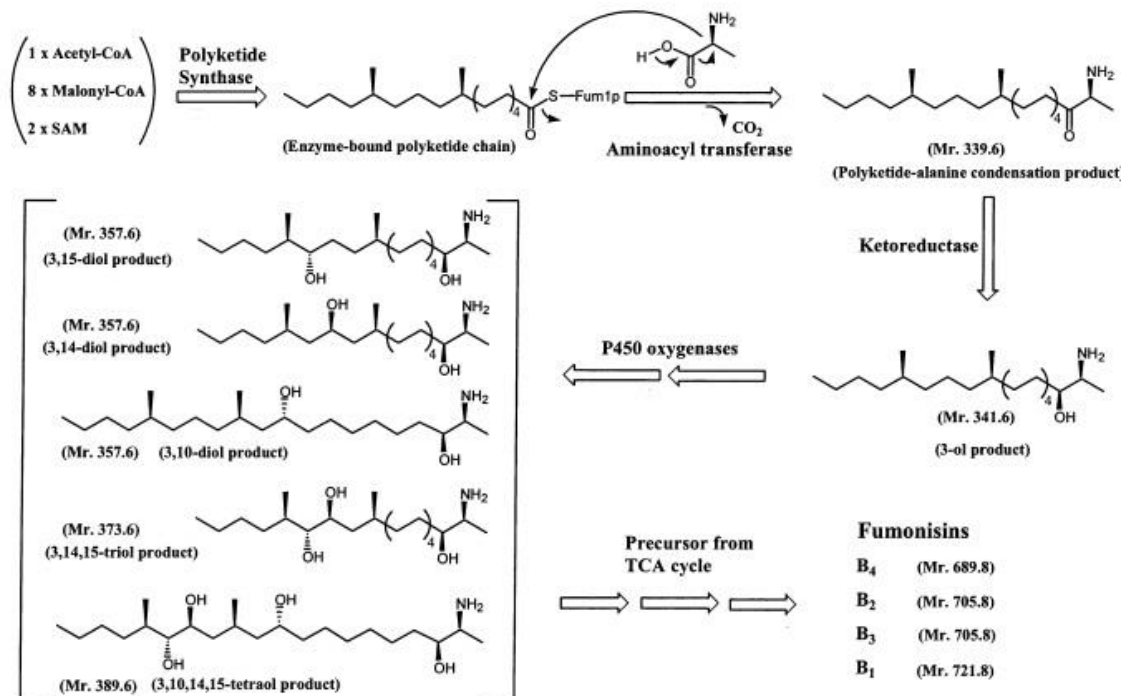
Fonte: Cast (2003)

São moléculas polares que apresentam alta solubilidade em água, metanol e acetonitrila: água (IARC, 2002; SHEPHARD, 1998). Diferentemente de outras micotoxinas não contém nenhuma estrutura aromática ou cromófora que facilita a detecção analítica (MURPHY et al., 2006). Apresenta estabilidade em acetonitrila - água (1:1) ao longo de um período de seis meses a 25°C. Em metanol, a FB₁ é estável durante seis semanas quando armazenada a -18°C. Quando está presente em alimentos é estável ao processamento térmico e à luz (VISCONTI et al., 1993; WHO, 2000).

2.2.2.2 Biossíntese

As fumonisinas são sintetizadas durante o metabolismo secundário do fungo, através da via das policetidas. O início da biossíntese ocorre com a formação da cadeia carbônica principal através da condensação de uma molécula de acetil-CoA, oito moléculas de malonil-CoA e duas moléculas de metionina. O produto desta reação é catalisado por uma policetida sintase formando um policetídeo de 18 carbonos que será condensado a uma alanina (Figura 2). Em seguida ocorrem subseqüentes reações de oxidação nos C-14 e C-15 catalisadas por oxigenases citocromo P-450 dependentes; esterificações catalisadas por uma aciltransferase nas hidroxilas dos carbonos 14 e 15 e hidroxilação no C-5 catalisada pela dioxigenase 2-ceto-glutarato-dependente (Figura 2) (BOJJA et al., 2004).

Figura 2 – Representação esquemática da via de biossíntese da fumonisina



Fonte: Adaptado de Bojja et al.(2004)

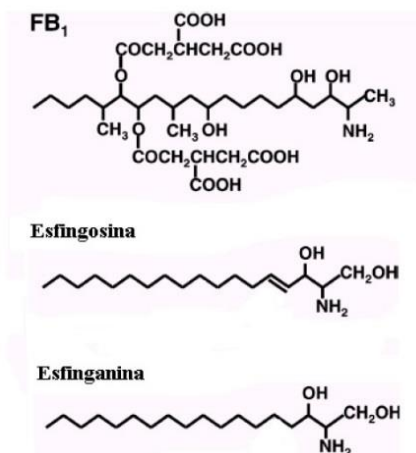
2.2.2.3 Mecanismo de ação

O principal mecanismo de toxicidade das fumonisinas está relacionado com o metabolismo de esfingolípídeos, componentes de membranas que estão presentes em todas as células eucarióticas (MERRILL JÚNIOR et al., 1997). Os esfingolípídeos apresentam um papel fundamental na célula, atuando na manutenção da estrutura lipoprotéica das membranas, interação entre células e a matriz extracelular, modulação de receptores de

fatores de crescimento e atuação como segundo mensageiros, mediando o crescimento, diferenciação e morte celular (MOBIO et al., 2000; TURNER; NIKIEMA; WILD, 1999).

A FB₁ é estruturalmente semelhante às bases esfingóides livres denominadas esfinganina (Sa) e esfingosina (So) (Figura 3). Essas bases desempenham um papel importante como intermediários na síntese e degradação das bases esfingóides de cadeia longa e esfingolípídeos mais complexos. A FB₁ atua bloqueando a síntese de novos esfingolípídeos através da ligação ao sítio catalítico da enzima ceramida sintase [esfingosina (esfinganina)-N-acetiltransferase] (Figura 4), que apresenta um papel fundamental na biossíntese e degradação de esfingolípídeos (TURNER; NIKIEMA; WILD, 1999).

Figura 3 – Semelhança estrutural da fumonisina B₁ e as bases esfingóides (esfingosina e esfinganina)



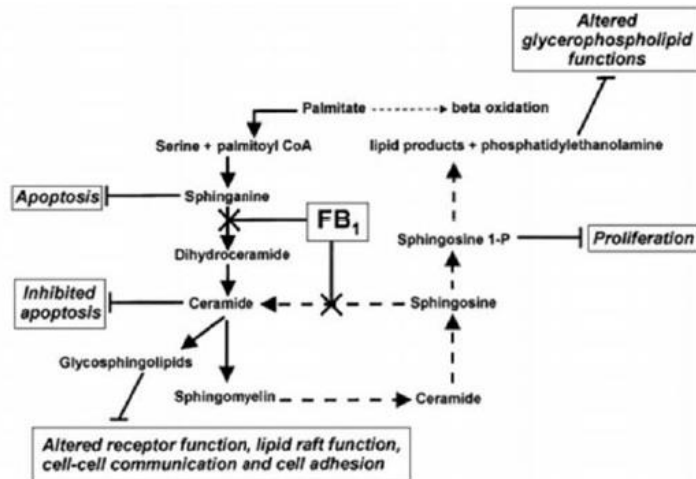
Fonte: Cast (2003)

O bloqueio inicial da ceramida sintase acarreta a inibição da biossíntese de ceramidas (unidade estrutural fundamental dos esfingolípídeos), assim ocorre o aumento da esfinganina e esfingosina livres, redução da reacilação da esfingosina e de esfingolípídeos provenientes da dieta, gerando toxicidade e alterações das funções celulares essenciais. Além disso, o acúmulo da esfinganina pode ser tóxico para muitas células (FINK-GREMMELS, 1999; RILEY et al., 2001; SORIANO; GONZÁLEZ; CATALÁ, 2005).

Os eventos sequenciais decorrentes da atuação da FB₁ na biossíntese dos esfingolípídeos resultam em toxicidade, caracterizada por alterações na atividade de proteínas quinase e peroxidação lipídica. Essas alterações também ocasionam uma modificação no crescimento, diferenciação e apoptose da célula (SORIANO; GONZÁLEZ; CATALÁ, 2005),

sendo fatores relacionados com a carcinogenicidade. Portanto, parte dos efeitos patológicos decorrentes da exposição à FB₁ pode ser causada pela alteração do metabolismo de esfingolípídeos (RILEY et al., 1996).

Figura 4 – Inibição da via de biossíntese de esfingolípídeos pela FB₁ (O símbolo X representa os locais da inibição)



Fonte: IARC (2002)

2.2.2.4 Micotoxicoses causadas por fumonisinas

Micotoxicose é definida como qualquer enfermidade que acomete seres humanos e animais, decorrente da exposição a micotoxinas (HUSSEIN; BRASEL, 2001). Os efeitos das micotoxicoses na saúde humana e animal são dependentes da toxicidade e dose da micotoxina, tempo de exposição, raça, espécie, gênero e idade (BENNETT; KLICH, 2003).

Diversas micotoxicoses causadas por fumonisinas têm sido relatadas, incluindo a leucoencefalomalácia em equinos (LEME) (MALLMANN; SANTURIO, DILKIN, 1999; DEL FAVA et al., 2010) edema pulmonar em suínos (OSWEILER et al., 1992), diarreia e redução de peso em aves (LEDOUX et al., 1992), incidência de câncer esofágico e defeito no tubo neural em seres humanos (DESJARDINS, 2006; RHEEDER et al., 1992, 2002; SYDENHAM et al., 1990; UENO et al., 1997).

O equino é considerado a espécie mais sensível à toxicidade da fumonisina. A LEME é uma doença degenerativa que acomete o sistema nervoso central, sendo caracterizada por lesões macroscópicas incluindo necrose e degeneração liquefativa dos

hemisférios cerebrais, podendo ocorrer no tronco cerebral, cerebelo e na medula espinhal (REED; BAYLY, 2000). Os sinais clínicos ocorrem de forma aguda, e os principais sintomas são apatia, sonolência, hipersensibilidade, debilidade da função motora, paralisia do lábio inferior e língua, ataxia e convulsões. Essa doença geralmente é fatal, porém, em certos casos, o animal apresenta morte aguda sem a presença da sintomatologia clínica (HUSSEIN; BRASEL, 2001; NORRED; VOSS, 1994).

Além da forma neurotóxica, os equinos também podem apresentar a síndrome hepatotóxica. Esta ocorre com menor frequência e os sinais clínicos iniciais são semelhantes à síndrome neurotóxica, como inapetência e depressão, seguidas por edema facial e icterícia. A síndrome aparece de forma aguda e o animal pode ir a óbito em questão de horas ou dias (NORRED; VOSS, 1994; REED; BAYLY, 2000).

Em 1989, diversos surtos de uma doença fatal em suínos ocorreram no meio-Oeste e Sudeste dos EUA. Após extensa investigação constatou-se que o milho utilizado na alimentação desses animais apresentava contaminação por *F. verticillioides*, sendo a FB₁ o agente causador dos óbitos. Essa doença fatal foi denominada edema pulmonar suíno (PPE) caracterizado por edema pulmonar grave e hidrotórax. A patogênese do PPE se deve aos danos do endotélio pulmonar, danos ao epitélio alveolar e falência cardíaca, podendo apresentar danos hepáticos (DIAZ; BOERMANS, 1994; GUMPRECHT et al., 2001).

Os sinais clínicos mais evidentes são dispneia com início agudo, fraqueza e cianose. O óbito pode ocorrer dentro de 4-7 dias após a ingestão diária de fumonisinas em concentrações iguais ou superiores a 6 mg/Kg de peso corporal/ dia (HASCHEK et al., 2001). Algumas alterações dos parâmetros bioquímicos séricos são observadas, como a elevação dos níveis de AST (aspartato transaminase) e ALT (alanina transaminase), fosfatase alcalina, bilirrubina, GGT (gama glutamil transpeptidase) e colesterol (DIAZ; BOERMANS, 1994).

Os principais efeitos decorrentes da exposição de aves a fumonisinas consistem de: aumento do consumo de água e ração, diarreia e diminuição do ganho de peso, inapetência, lesões orais, alterações hepáticas e alta mortalidade (NORRED; VOSS, 1994).

Ledoux et al. (1992) avaliaram a exposição de 45 frangos de corte a rações contendo 100, 200, 300 ou 400 mg de FB₁/kg de ração durante 21 dias. Após o período do teste verificaram que o peso das aves e da média de ganho de peso diário diminuiu conforme o aumento da dose da micotoxina. Também foram observados hepatomegalia, diarreia, hiperplasia biliar e necrose hepática multifocal. Outros estudos avaliando a exposição de aves a FB₁ também apresentaram resultados semelhantes (BAILLY et al., 2001; BROWN; ROTTINGHAUS; WILLIAMS, 1992).

Em seres humanos, estudos epidemiológicos demonstraram a associação de altos índices de câncer esofágico com o consumo de alimentos contendo altos níveis de fumonisinas. Em estudo realizado com amostras de milho coletadas no período de 1976 a 1989 na região de Transkei na África do Sul, foi constatado que o milho com os maiores níveis de contaminação por FB₁ e FB₂ era proveniente de regiões com maior incidência de câncer esofágico (RHEEDER et al., 1992).

Outros estudos avaliando a correlação entre o câncer esofágico e fumonisinas foram realizados na China, Irã, nordeste da Itália e sudeste dos EUA. Os resultados demonstraram a presença de altas concentrações de fumonisinas em milho e derivados utilizados na alimentação nessas regiões, sendo que nesses locais havia altos índices de câncer esofágico (NORRED; VOSS, 1994; POZZI et al., 2002; SORIANO; GONZÁLEZ; CATALÁ, 2005).

Ueno et al. (1997) avaliaram 120 amostras de milho durante três anos consecutivos, nas regiões de Haimen e Penlai (China), que apresentavam altos e baixos índices de câncer hepático primário, respectivamente. Os maiores níveis de fumonisinas foram detectados em locais com maior incidência de câncer hepático primário.

Outro estudo que relaciona a FB₁ com efeitos toxicológicos em seres humanos está relacionado com a ingestão materna de milho contendo FB₁ durante a gravidez e o aumento de defeitos no tubo neural (DTNs). Esta relação tem sido alvo de pesquisas em regiões onde o milho faz parte da base alimentar como na Guatemala, China e em Transkei na África do Sul (KROMBERG; JENKINS, 1982; NCAYIYANA, 1986; XIAO et al., 1990; MOORE et al., 1997; MARASAS et al., 2004).

De acordo com estudos experimentais e clínicos, a origem dos DNTs é multifatorial, dependendo de fatores genéticos, ambientais e nutricionais. Porém, tem sido proposto que a exposição a fumonisinas também é um fator de risco para populações que consomem grandes quantidades de milho ou derivados contaminados com fumonisinas (MARASAS et al., 2004).

2.2.2.5 Ocorrência de fumonisinas em milho e derivados

Inúmeros trabalhos sobre a ocorrência de micotoxinas em milho e em produtos derivados têm sido realizados em todo o mundo (DE NIJS et al., 1998; SHEPHARD et al., 1996; TSENG; LIU, 2001; VIQUEZ; CASTELL-PEREZ; SHELBY, 1996). No Brasil,

essas avaliações foram realizadas principalmente nas regiões centro-sul e no sul do país (KAWASHIMA; SOARES, 2006; ONO et al., 1999, 2004, 2008).

A ocorrência natural de micotoxinas nos produtos agrícolas em todo o mundo resultou no estabelecimento ou redução dos limites regulatórios em diversos países. Em 2003, cerca de 99 países apresentavam alguma legislação para micotoxinas, representando um aumento de 30% em relação a 1995 (FAO, 2004).

A Comissão Europeia estabeleceu limites regulatórios para os níveis de fumonisinas (FB_1+FB_2) em milho e derivados destinados ao consumo humano direto. O nível máximo para a soma de $FB_1 + FB_2$ deve ser de 1.000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (COMISSÃO EUROPEIA, 2007). Para alimentos destinados aos animais o nível máximo tolerado deve ser de 60.000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (COMISSÃO EUROPEIA, 2006).

Nos EUA, o U.S. Food and Drug Administration (FDA) recomenda os limites máximos para fumonisinas totais ($FB_1 + FB_2 + FB_3$) de 2.000 a 4.000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ em alimentos para seres humanos e 5.000 a 100.000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ em alimentos para animais (FDA, 2001).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), por meio da resolução RDC 07/2011, estabeleceu um limite máximo tolerado (LMT) de 5.000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e 2.500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para as fumonisinas em milho não processado e para produtos a base de milho, respectivamente. Em relação à alimentação animal, em 2006 foi criado o Grupo de Trabalho sobre Micotoxinas pelo Ministério da Agricultura, que recomendou um limite máximo tolerado para grãos de milho e trigo ou outros subprodutos destinados a alimentação animal de 10.000 $\mu\text{g}/\text{kg}$, enquanto que rações destinadas a animais monogástricos o limite máximo deve ser de 5.000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (BRASIL, 2011).

Sydenham et al. (1990) publicaram um dos primeiros trabalhos sobre a ocorrência natural de FB_1 em milho. As análises foram realizadas em amostras de milho mofado provenientes de uma região de Transkei, África do Sul, local com alta incidência de câncer esofágico em seres humanos. Os níveis detectados variaram entre 44.000 a 83.000 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Doko et al. (1995) verificaram a ocorrência natural de FB_1 e FB_2 ($n = 96$) em 26 variedades de milho na Itália e 72 linhagens cultivadas na Croácia, Polônia, Portugal, Romênia, Benin e Zâmbia. Os países que apresentaram maiores frequências de contaminação foram a Itália, Portugal, Zâmbia e Benin com 100, 100, 100 e 82%, respectivamente, sendo que os níveis máximos de fumonisinas foram 2.850, 4.450, 1.710 e 3.310 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente.

Kedera, Plattner e Desjardins (1999) avaliaram amostras de milho ($n = 197$) da safra de 1996 provenientes de diversos distritos situados no Oeste do Quênia. Cerca de 47% das amostras apresentaram contaminação por FB_1 , no entanto, apenas 5% estavam acima de $1.000 \mu\text{g}/\text{kg}$, sendo que nas amostras mais contaminadas os níveis de fumonisina variaram de 3.600 a $11.600 \mu\text{g}/\text{kg}$.

Fandohan et al. (2005) avaliaram a ocorrência natural de fumonisinas em amostras de milho provenientes das safras de 1999-2003 produzidos em Benin, oeste da África. Os níveis de fumonisinas totais variaram de 8.240 a $16.690 \mu\text{g}/\text{kg}$, sendo que a FB_1 foi detectada em maior concentração (cerca de $12.020 \mu\text{g}/\text{kg}$).

Bryden et al. (1995) analisaram amostras de milho ($n = 53$) destinados a alimentação humana e animal provenientes do Estado de New South Wales, Austrália. Em 89% das amostras foram detectadas fumonisinas, com concentrações que variaram de 1.000 a $40.000 \mu\text{g}/\text{kg}$.

Outras pesquisas sobre ocorrência de fumonisinas também foram realizadas na África do Sul, China e Argentina, com níveis máximos detectados de $17.900 \mu\text{g}/\text{kg}$, $10.200 \mu\text{g}/\text{kg}$ e $8.160 \mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente (ALBERTS et al., 1990; SYDENHAM et al., 1993; YOSHIZAWA; YAMASHITA; LUO, 1994).

No Brasil, Hirooka et al. (1996) analisaram 39 amostras de milho provenientes do Estado do Paraná e 9 dos Estados do Mato Grosso do Sul e Goiás, coletadas entre 1990 e 1991. As fumonisinas foram detectadas em 100% das amostras do Estado do Paraná, com níveis de FB_1 variando de 3.250 a $4.790 \mu\text{g}/\text{kg}$ e 2.340 a $3.450 \mu\text{g}/\text{kg}$ para FB_2 .

Ono et al. (1999) avaliaram a ocorrência de fumonisinas em 150 amostras de milho recém colhido das regiões Centro-Sul, Centro-Oeste e Norte do Paraná. A FB_1 foi detectada em 100% das amostras (média $2.390 \mu\text{g}/\text{kg}$) e FB_2 em 97,7% (média $1.090 \mu\text{g}/\text{kg}$).

Camargos et al. (2000) analisaram a presença de FB_1 e FB_2 em 19 amostras de milho cultivada em campos experimentais de diferentes cidades do interior do Estado de São Paulo, durante a safra de 1997/1998. Todas as amostras estavam contaminadas com fumonisinas, sendo que os níveis de FB_1 variaram de 1.630 a $25.690 \mu\text{g}/\text{kg}$ (média de $5.610 \mu\text{g}/\text{kg}$) e a FB_2 de 380 a $8.600 \mu\text{g}/\text{kg}$ (média de $1.860 \mu\text{g}/\text{kg}$).

Orsi et al. (2000) avaliaram a ocorrência de fumonisinas em 195 amostras, em milho recém colhido e armazenado no Estado de São Paulo. Do total das amostras, em 90,2% foi detectada a FB_1 , enquanto que em 97,4% a FB_2 . Os níveis de FB_1 variaram de 870 a $49.310 \mu\text{g}/\text{kg}$ e de FB_2 de 960 a $29.160 \mu\text{g}/\text{kg}$.

Kawashima & Soares (2006) pesquisaram a presença de FB₁ em 74 amostras de produtos à base de milho, provenientes da cidade de Recife (PE), durante 1999 e 2001. As fumonisinas foram detectadas em 94,6% das amostras, com concentração variando de 20 a 8.600 µg/kg.

Rocha et al. (2009) investigaram a ocorrência de fumonisinas em 200 amostras de milho recém colhido provenientes de Várzea Grande (Mato Grosso, MT), Nova Odessa (São Paulo, SP), Santa Maria (Rio Grande do Sul, RS) e Oliveira do Campinhos (Bahia, BA). A FB₁ foi detectada em 98% (n = 196) das amostras e a contaminação por FB₁ + FB₂ foi detectada em 74,5% (n = 149).

Moreno et al. (2009) analisaram 300 amostras de milho da safra 2003/2004 da região norte do Paraná. A coleta foi realizada em dois pontos da cadeia produtiva, sendo detectadas fumonisinas em 100% das amostras com concentrações médias de 2.540 µg/kg na recepção e 3.120 µg/Kg na pré-secagem. Na safra de 2004, foram detectadas fumonisinas em 98,9% e 95% das amostras, na recepção e pré-secagem, respectivamente.

O Laboratório de Análises Mitoxicológicas - LAMIC (2011) analisando 26,29 mil amostras de milho procedentes da região sul do Brasil, no período de 1996 a 2011, detectou fumonisinas em 76% das amostras.

Através dos resultados obtidos pelos diversos estudos sobre ocorrência de fumonisinas, pode-se concluir que a contaminação de milho por fumonisinas abrange os cinco continentes. Em muitos casos os níveis de fumonisinas são superiores aos que os valores estabelecidos pela União EUROPEIA e pelo FDA.

2.3 ESTRATÉGIAS DE PREVENÇÃO DO CRESCIMENTO FÚNGICO E DA CONTAMINAÇÃO POR MICOTOXINAS

A contaminação de alimentos por fungos toxigênicos e micotoxinas é recorrente em todo o mundo. No Brasil, estima-se que cerca de 10% da produção de grãos são perdidos devido a contaminantes advindos das fases de pré e pós-colheita (LORINI; BACALTCHUK, 2007). Portanto, é de suma importância que haja o desenvolvimento de estratégias de prevenção e controle de micotoxinas, no intuito de minimizar a contaminação por fungos toxigênicos e micotoxinas. É cada vez mais frequente a preocupação com a segurança alimentar tanto por parte dos produtores, armazenadores, processadores, exportadores e consumidores.

A prevenção da contaminação de plantas com fungos toxigênicos consiste na forma mais eficaz para a diminuição da contaminação dos cereais por micotoxinas. O gerenciamento da produção agrícola por meio de boas práticas agrícolas e boas práticas na manipulação, no processamento, no armazenamento e na distribuição, consistem nas principais formas de prevenção. Porém, mesmo adotando as melhores estratégias de gerenciamento não é possível eliminar totalmente a contaminação por micotoxinas (AWAD et al., 2010; JOUANY, 2007).

As estratégias de prevenção são classificadas em pré e pós-colheita. Na fase de pré-colheita existem algumas medidas importantes para redução das micotoxinas: redução do estresse da planta por meio de irrigação, nutrição mineral; proteção contra danos causados por insetos; redução dos resíduos vegetais e outras fontes de inóculo do fungo; utilização de cultivares resistentes à infecção fúngica; utilização de antifúngicos; rotação de culturas (JOUANY, 2007; RILEY; NORRED, 1999).

As principais estratégias da fase de pós-colheita consistem de colheita do milho apenas quando apresentar umidade ideal; remoção de grãos danificados; secagem do grão antes do armazenamento; controle de insetos, roedores, umidade e temperatura; limpeza frequente dos locais de armazenamento (JOUANY, 2007; RILEY; NORRED, 1999).

Uma estratégia de prevenção ideal seria aquela com uma abordagem múltipla e integrada (CAST, 2003). Entretanto, é importante ressaltar que essas estratégias de pré e pós-colheita dependem, na maioria das vezes, das condições climáticas do ambiente, sendo assim, dificilmente controlada (AWAD et al., 2010).

2.4 MÉTODOS DE DESCONTAMINAÇÃO DE MICOTOXINAS

Os métodos de descontaminação referem-se aos tratamentos pós-colheita, que tem como objetivo principal a inativação ou eliminação da micotoxina (MALLMANN et al., 2006). Os métodos são classificados em físicos, químicos e biológicos (HUWIG, et al., 2001). Um método é considerado ideal, quando apresentar características como completa inativação, destruição ou remoção da toxina; não formação de compostos intermediários tóxicos; promoção da destruição dos esporos e do micélio do fungo para prevenir a produção de micotoxina; preservação das características organolépticas e nutricionais do grão (BEAVER, 1991; MAGAN; OLSEN, 2004; PARK, 1993; POMERANZ et al., 1990).

2.4.1 Métodos Químicos e Físicos

Os principais métodos físicos de descontaminação incluem a separação física, a moagem, a inativação térmica, a radiação gama, a luz ultravioleta e a adição de adsorventes (SORIANO; DRAGACCI, 2004).

A separação física de grãos de milho consiste em um método preliminar na descontaminação de fumonisinas. A eliminação do germe ou do pericarpo pode reduzir os níveis de fumonisinas de 26,2% e 64,4% (SORIANO; DRAGACCI, 2004).

Outro método físico importante consiste na inativação térmica. As fumonisinas são compostos termoestáveis, porém, a utilização de temperaturas acima de 150°C no processamento do grão resulta na diminuição dos níveis de fumonisinas. Entretanto, este método transforma a fumonisina intacta em fumonisina hidrolisada, que em alguns estudos *in vitro* apresenta maior toxicidade (HUMPF; VOSS, 2004; SEEFELDER et al., 2003).

Os adsorventes são compostos que se ligam às micotoxinas, limitando sua absorção no trato gastrointestinal. A eficiência da ligação depende das características físicas e químicas de ambas as moléculas (AVANTAGGIATO, HAVENAAR, VISCONTI, 2004). Alguns exemplos de adsorventes são o carvão ativado, montimorilonita, bentonita e extrato de parede celular de levedura (ABDEL-WAHHAB; NADA; AMRA, 1999; BORDINI et al., 2014; HUEBNER et al., 1999; LI et al., 2012).

Os métodos químicos envolvem a utilização de um agente capaz de degradar estruturalmente a molécula da micotoxina. Alguns exemplos de compostos incluem o hipoclorito de sódio, peróxido de hidrogênio, ozônio, bissulfito de sódio, ácidos, álcalis e amônia. Apesar de alguns estudos demonstrarem a eficiência destes métodos, em certos casos ocorre perda do valor nutricional do alimento, além de ocasionar a formação de compostos tóxicos (BATA; LÁSZTITY, 1999).

Os métodos químicos e físicos vêm sendo bastante desenvolvidos no intuito de obter um método ideal de descontaminação de micotoxinas. No entanto, muitos destes métodos requerem equipamentos sofisticados ou reagentes muito caros (REDDY; NURDIJATI; SALLECH, 2010).

2.4.2 Métodos Biológicos

Os métodos biológicos consistem na utilização de micro-organismos, que atuam no controle do fungo toxigênico por meio de diversos mecanismos, como competição por nutrientes ou espaço, interações ou antibiose (FAZELI et al., 2009). Alguns micro-organismos (leveduras, fungos filamentosos, bactérias lácticas e algas) também são capazes de detoxificar micotoxinas, devido a capacidade de degradação de diversos compostos orgânicos, incluindo a micotoxina ou pela adsorção da micotoxina pela estrutura da parede do microrganismo (MEGHARAJ et al., 1997).

Os métodos de controle biológico surgem como uma alternativa para substituição aos métodos químicos, uma vez que o apelo por um método “natural” vem crescendo entre os consumidores (BATA; LASZTITY, 1999). É cada vez maior o número de estudos referentes aos métodos biológicos, sendo que um método ideal para a utilização na descontaminação comercial de micotoxinas em alimentos, deve apresentar especificidade, eficiência, baixo custo e ser ambientalmente correto (WU et al., 2009).

2.4.2.1 Bactérias lácticas

As bactérias do ácido láctico (BAL) ou bactérias lácticas são conhecidas como importantes antagonistas biológicos naturais, e vêm sendo amplamente utilizadas em diversos estudos com o objetivo de garantir a descontaminação de alimentos com micotoxinas (CORASSIN et al., 2013; DALIÉ; DESCHAMPS; RICHARD- FORGET, 2010; KHOURY; ATOUI; YAGHI, 2011; OLIVEIRA et al., 2015). Alguns autores descrevem as BALs como agentes antifúngicos adequados, pois além de inibir o crescimento de alguns fungos (EL-GENDY; MARTH, 1980) promovem a diminuição da produção de micotoxinas (EL-GENDY; MARTH, 1981; KARUNARATNE; WEZCNBERG; BULLERMAN, 1990).

O grupo das bactérias lácticas é composto por bactérias diversificadas, mas que apresentam as seguintes características em comum: cocos ou bacilos Gram-positivos, não esporuladas, catalase negativa, anaeróbias e aerotolerantes, ácido tolerantes e nutricionalmente exigentes. Além disso, são fermentadoras e tem como principal produto da fermentação o ácido láctico (EARLY, 2000).

As BALs compõem um grupo de aproximadamente 20 gêneros, entretanto, são considerados mais importantes os *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Oenococcus*, *Carnobacterium*, *Vagococcus*, *Enterococcus*, *Tetragenococcus* e

Weisella (AXELSSON, 2004). Os principais gêneros reconhecidos por sua capacidade de prevenir ou limitar o crescimento de fungos toxigênicos são *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* e *Pediococcus* (DALIÉ; DESCHAMPS; RICHARD-FORGET, 2010).

Este grupo de bactérias é amplamente utilizado em alimentos fermentados, por serem reconhecidos como “GRAS” (*generally recognized as safe*), além de ocorrer naturalmente em diversos alimentos e compor a microbiota intestinal. Diversos estudos demonstram a importância dessas bactérias na saúde dos seres humanos e animais e na biopreservação de alimentos (OUWEHAND et al., 2002; SAXELIN et al., 2005; WOOD; HOLZAPFEL, 1995).

2.4.2.1.1 Bactérias lácticas no antagonismo de fungos toxigênicos

As BALs produzem compostos antagônicos capazes de controlar o crescimento de bactérias patogênicas e outros micro-organismos indesejáveis, como alguns fungos toxigênicos (DALIÉ; DESCHAMPS; RICHARD-FORGET, 2010). Segundo Gourama & Bullerman (1995), a utilização de bactérias lácticas em alimentos poderia aumentar a vida útil de muitos produtos, além de reduzir os riscos à saúde pela exposição a micotoxinas.

O primeiro efeito antimicrobiano da BAL é devido a produção de ácido láctico, que causa a redução do pH, inibindo o crescimento de uma diversidade de micro-organismos patogênicos e deteriorantes (DAESCHEL, 1989; DE MUYNCK et al., 2004).

Outras substâncias com potencial antagônico também são produzidas como os ácidos orgânicos (ácido acético e ácido propiônico), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e dióxido de carbono (CO₂) (EKLUND, 1984; EKLUND, 1989; KONG; DAVISON, 1980; GEREZ et al., 2009). Também são produzidos compostos antimicrobianos de baixa massa molecular (reuterina), ácidos graxos, dipeptídeos cíclicos e compostos protéicos (ONILUDE et al., 2005; ROUSE et al., 2008; SJÖGREN et al., 2003; YANG; CHANG, 2010).

Os ácidos orgânicos, como o ácido láctico, propiônico e acético têm sido relatados como os principais envolvidos na atividade antifúngica. O ácido láctico atua sobre a membrana plasmática, neutralizando seu potencial eletroquímico e aumentando a permeabilidade pelas formas não dissociadas. A forma mais hidrofóbica atravessa a membrana e libera íons H⁺, acidificando o citoplasma e causando um colapso eletroquímico no gradiente de prótons, causando a morte do microrganismo suscetível (AXELSSON, 1990; BATISH et al., 1997; EKLUND, 1989; PIARD; DESMAZEAUD, 1991).

O ácido acético e o ácido propiônico atuam de modo similar ao ácido láctico, alterando o gradiente eletroquímico das membranas celulares. Porém, o efeito destes dois ácidos depende da diminuição do pH ocasionado pela presença do ácido láctico (EKLUND, 1989).

Outro produto da fermentação é o H_2O_2 que apresenta efeito oxidante sobre a célula de alguns micro-organismos, destruindo estruturas moleculares de origem protéica (DAVIDSON et al., 1983). A presença do CO_2 pode criar um ambiente anaeróbico que inibe a descarboxilação enzimática e acúmulo de CO_2 na bicamada lipídica alterando a permeabilidade da membrana (EKLUND, 1984). A inibição varia de acordo com o tipo de micro-organismo e de CO_2 , porém uma concentração entre 20 a 50% resulta numa forte atividade antifúngica (LINDGREN; DOBROGOSZ, 1990).

A reuterina (3-hidroxi-propionaldeído) é um antimicrobiano de amplo espectro que apresenta baixa massa molecular, originalmente é produzido por *Lactobacillus reuteri* (AXELSSON et al., 1987, 1989; TALARICO; DOBROGOSZ, 1989). A reuterina atua contra vários tipos de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, leveduras e bolores. É resistente a presença de enzimas lipolíticas e hidrolíticas e estável a diferentes variações de pH (CHUNG et al., 1989; EL-ZINEY; DEBEVERE; JAKOBSEN, 2000; TALARICO et al., 1988, 1989).

Os ácidos graxos podem ser produzidos por algumas bactérias do gênero *Lactobacillus* e *Lactococcus* em determinadas condições. Os ácidos graxos insaturados apresentam atividade contra bactérias Gram-positivas e fungos, sendo que a atividade antifúngica depende do comprimento da cadeia, concentração e pH do meio (GOULD, 1991; SANZ et al., 1988).

Os dipeptídeos cíclicos são compostos de baixa massa molecular que apresentam múltiplas propriedades bioativas. Estes compostos estão associados com atividade anticancerígena, antiviral, antihiperlicemiante, neuroprotetora, além das propriedades antibacterianas e antifúngicas (AXEL et al., 2014; BORTHWICK, 2012).

Outros compostos que apresentam atividade antagônica são as bacteriocinas que são definidas como pequenos peptídeos antimicrobianos (20 a 50 aminoácidos) sintetizados ribossomalmente que apresentam uma extremidade hidrofílica e hidrofóbica (COTTER; HILL; ROSS, 2005; DAW; FALKINER, 1996; HAUGE et al., 1998; NISSENMEYER; NES, 1997).

As bacteriocinas geralmente apresentam uma estreita faixa de ação, atuando principalmente contra bactérias Gram-positivas (JACK; TAGG; RAY, 1995). Apesar disso,

alguns estudos vêm sendo realizados (ADEBAYO; ADERIYE, 2010; AHMADOVA et al., 2013; CODA et al., 2011; GUPTA; SRIVASTAVA, 2014; MAGNUSSON; SCHNURER, 2001; SATHE et al., 2007; STOYANOVA et al., 2011) evidenciando a sua ação antifúngica que em alguns casos é perdida por meio da utilização de enzimas proteolíticas (BATISH; GROVER; LA, 1989).

A atividade antifúngica das BALs consiste em um fenômeno complexo que não está completamente elucidado, entretanto estudos indicam que este fenômeno está relacionado com uma série de fatores, incluindo efeitos de sinergia entre os compostos antagonicos (VOULGARI et al., 2010; YANG; CHANG, 2010).

2.4.2.1.2 Bactérias lácticas na detoxificação de micotoxinas

Diversos estudos têm demonstrado a capacidade de diferentes linhagens de BAL na detoxificação de micotoxinas. Apesar dos resultados promissores, o mecanismo envolvido na detoxificação ainda não está completamente elucidado. Na maioria dos estudos, o principal mecanismo envolvido consiste na ligação da micotoxina com a parede celular bacteriana (SHETTY; JESPERSEN, 2006). Outros possíveis mecanismos seriam a atuação das bactérias lácticas na biossíntese da micotoxina ou ainda a produção de metabólitos que degradam a micotoxina (DALIÉ; DESCHAMPS; RICHARD- FORGET, 2010).

A estabilidade das ligações entre a micotoxina e a parede celular bacteriana depende da cepa, do tratamento utilizado (ácido, básico, térmico) e das condições do ambiente (HASKARD et al., 2001). Portanto, é importante que todos os parâmetros sejam elucidados e padronizados para garantir a ação da BAL na descontaminação de alimentos com micotoxinas (BOVO et al., 2013; EL-NEZAMI et al., 2002).

Stiles & Bullerman (2002) estudaram o efeito de *Lactobacillus rhamnosus* no crescimento e na produção de micotoxinas em diversas espécies de *Fusarium*, incluindo *F. proliferatum*, *F. verticillioides* e *F. graminearum*. Os resultados demonstraram que houve redução da produção de FB₁, FB₂, desoxinivalenol (DON) e zearalenona em 63,2%, 43,4%, 92% e 87,5%, respectivamente.

Niderkorn, Boudra & Morgavi (2006) avaliaram a capacidade de diversas espécies de bactérias lácticas em remover, *in vitro*, DON e FB₁ e FB₂ produzidas por *Fusarium*. A porcentagem de remoção da fumonisina variou entre as diversas espécies, sendo que as espécies que apresentaram melhores porcentagens foram *Leuconostoc mesenteroides* R1107 com 82% (FB₁) e 96% (FB₂), *Pediococcus pentosaceus* R1044 com 79% (FB₁) e 92%

(FB₂) e *Lactobacillus plantarum* R1096 74% (FB₁) e 97% (FB₂). Os autores ainda concluíram que o mecanismo responsável pela remoção foi o da ligação da micotoxina com a parede celular bacteriana, pois não houve diferença na remoção quando foram utilizadas bactérias viáveis e não viáveis e, além disso, não foram detectados produtos de degradação da toxina.

Niderkorn et al. (2009) investigaram componentes da parede celular das BALs e grupos funcionais da fumonisina (FB) envolvidos na interação BAL-FB. Foram utilizados diversos tratamentos físico-químicos, enzimáticos e genéticos, com o objetivo de remover ou inibir os grupos funcionais. Os autores concluíram que o peptidoglicano (PG) e o ácido tricarbóxico presentes, respectivamente, na BAL e na FB, eram os principais componentes envolvidos na interação.

Dalié et al. (2012) verificaram a capacidade *in vitro* e no milho de *Pediococcus pentosaceus* L006 na modulação da biossíntese de fumonisinas (FB₁, FB₂ e FB₃) produzida por *F. verticillioides*. Os estudos demonstraram que em certas condições de estresse, em que foram inoculados simultaneamente *P. pentosaceus* e *F. verticillioides*, houve aumento da produção de fumonisina. Porém, alguns compostos produzidos pela bactéria láctica foram capazes de reduzir significativamente a produção de fumonisinas em meio líquido e no milho. Após a incubação de *P. pentosaceus* em grãos de milho por cerca de 20 dias, verificou-se uma diminuição de 75% a 80% da fumonisina.

Hassan & Bullerman (2013) verificaram a capacidade de *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* na redução das concentrações de deoxinivalenol (DON) e FB₁ em meio líquido, utilizando células viáveis e inativadas por tratamento térmico. A porcentagem de ligação de DON foi dependente do pH do meio, sendo que a adsorção variou entre 47% e 99%. A redução dos níveis de FB₁ ocorreu quando foram utilizadas as células viáveis, porém a ligação entre a micotoxina e a BAL era muito fraca.

A parede celular das bactérias lácticas, assim como de todas as Gram-positivas, apresenta, na sua maior parte, uma estrutura espessa formada por múltiplas camadas de peptidoglicano (HASKARD et al., 2001), e em menores proporções de ácido teicóico e lipoteicóico, camada protéica S e polissacarídeos neutros. Os principais componentes relacionados com a interação da BAL e da micotoxina são os polissacarídeos e o peptidoglicano que compõe a parede celular (RAJENDRAN; OHTA, 1998).

Em vários estudos, os autores utilizam o tratamento térmico (aquecimento) das células bacterianas para verificar os possíveis mecanismos de detoxificação das micotoxinas (ELSANHOTYA et al., 2014; FRANCO et al., 2011; NIDERKORN; BOUDRA; MORGAVI, 2006). O aquecimento das células viáveis pode causar desnaturação das

proteínas ou formação de produtos da reação de Maillard. Além disso, pode ocasionar a diminuição da espessura do peptideoglicano e/ou aumento dos poros. Essas alterações são responsáveis pela ligação da micotoxina a estruturas que não estavam disponíveis quando a célula estava intacta (EL-NEZAMI et al., 2002).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar o potencial de antibiose de bactérias lácticas frente a cepas de *Fusarium verticillioides* e analisar a capacidade de detoxificação de fumonisina B₁

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade inibitória das bactérias lácticas comerciais frente a cinco cepas (97L, 97K, 103F, 113F e 103G) de *F. verticillioides*;
- Avaliar a influência da concentração do caldo MRS, do ácido acético e ácido láctico e do pH na atividade inibitória das cepas de *F. verticillioides*;
- Determinar a concentração inibitória mínima do ácido acético e do ácido láctico;
- Avaliar a capacidade de detoxificação *in vitro* da fumonisina B₁ das diferentes cepas de bactérias lácticas comerciais.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Cepas de *Fusarium verticillioides*

As cepas de *Fusarium verticillioides* foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Elisa Yoko Hirooka do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina. Foram utilizadas cinco cepas de *F. verticillioides* (97L, 97K, 103F, 113F e 103G) isoladas a partir de ração a base de milho associadas com intoxicação animal e identificadas morfolologicamente na Science University of Tokyo, Japão.

4.1.2 Bactérias Lácticas Comerciais

Um total de 11 bactérias lácticas provenientes de coleções de culturas internacionais (*American Type Culture Collection* - ATCC) e do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina e culturas comerciais foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Sandra Garcia do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina:

- *Lactobacillus plantarum* ATCC® 14917
- *Lactobacillus plantarum* ATCC® 94914
- *Lactobacillus fermentum* ATCC® 9339
- *Lactobacillus rhamnosus*
- *Lactobacillus paracasei*
- *Lactobacillus gasseri*
- *Lactobacillus plantarum*
- Lyofast LR-92 (*Lactobacillus reuteri*), Sacco.
- Lyofast LH3 (*Lactobacillus helveticus*), Sacco.
- Lyofast BG112 (*Lactobacillus plantarum*), Sacco.
- Lyofast LA3 (*Lactobacillus acidophilus*), Sacco.

4.2 AVALIAÇÃO DO ANTAGONISMO EM MEIO SÓLIDO

A avaliação da atividade antifúngica foi realizada por meio da técnica de semeadura em profundidade conforme Motomura e Hirooka (1996), na qual, as placas de Petri estéreis foram previamente inoculadas com 10^5 esporos/mL de *F. verticillioides* (5 cepas) e 20 mL de BDA (Ágar Batata Dextrose).

Após a solidificação, foi inoculada uma alíquota de 100 µL do cultivo dos micro-organismos citados no item 4.2.1 em orifícios (diâmetro 5 mm) no centro da placa. Em seguida as placas foram incubadas a 25°C durante 7 dias. Posteriormente, o diâmetro de inibição foi medido utilizando um paquímetro. Todos os testes foram realizados em triplicata.

4.2.1 *Bactérias Lácticas*

As culturas de bactérias lácticas foram ativadas por meio do cultivo em caldo MRS (De Man Rogosa Sharpe) (ANEXO B) a 37°C durante 24 h. Esse procedimento foi repetido 3 vezes até a obtenção do inóculo ativado. Em seguida, 5 mL do cultivo ativado foi inoculado em 50 mL de caldo MRS. O cultivo foi incubado a 37°C, sem agitação, durante 24 h. Para a utilização no teste de antagonismo, o cultivo foi ajustado de acordo com o tubo 10 da escala nefelométrica de Mc Farland que corresponde a uma concentração aproximada de $3,0 \times 10^9$ UFC/mL e uma absorvância de 2,180 (ANEXO A).

4.2.1.1 Avaliação da influência de outros parâmetros no antagonismo frente a *Fusarium verticillioides*

4.2.1.1.1 *Influência da concentração de ácido acético e ácido láctico*

A influência de ácido láctico e de ácido acético no desenvolvimento de *F. verticillioides* foi avaliada de acordo com a metodologia de Schnürer e Magnusson (2005). Foram preparadas soluções de caldo MRS contendo ácido acético e ácido láctico, cujas concentrações finais foram 10, 20, 30, 40 e 50% (v/v). Uma alíquota de 100 µL do caldo MRS foi adicionada nos orifícios (5 mm) no centro do BDA previamente inoculado com 10^5

esporos/mL de *F. verticillioides* seguidas das demais etapas, conforme descrito no item 4.2. Todos os ensaios foram realizados em triplicata (DE MUYNCK et al., 2004).

4.2.1.1.2 *Influência da concentração do caldo MRS*

Seguindo a metodologia proposta por De Muynck et al. (2004), o caldo MRS foi preparado com concentrações variando de 2, 4, 6, 8 e 10 vezes mais de meio de cultura em relação às instruções do fabricante. Foram aplicados 100 µL do caldo MRS modificado sobre os orifícios (5 mm) do ágar BDA previamente inoculado com 10⁵ esporos/mL de *F. verticillioides* seguidas das demais etapas, conforme descrito no item 4.2. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.2.1.1.3 *Influência do pH do meio*

A avaliação da influência do pH do meio foi realizada segundo De Muynck et al. (2004). As placas de Petri contendo BDA foram previamente inoculadas com 10⁵ esporos/mL de *F. verticillioides*. Após a solidificação do meio, foi inoculada uma alíquota de 100 µL de caldo MRS estéril com pH ajustado em orifícios (diâmetro 5 mm) no centro da placa. O pH foi ajustado para 1, 2, 3, 4, 5 e 6 utilizando HCl 3 mol/L. Os testes foram realizados em triplicata para as 5 cepas de *F. verticillioides* conforme descrito no item 4.2.

4.2.1.2 *Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) do ácido láctico e do ácido acético*

A concentração mínima inibitória (CMI) do ácido láctico e acético foi determinada para as cinco cepas de *F. verticillioides*. A CMI é definida como a menor concentração do ácido capaz de inibir o crescimento do fungo em um período de pelo menos 72 h. As concentrações utilizadas de ácido láctico e acético foram 0,4, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5 e 4,0% (m/v) e 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7 e 0,9% (m/v), respectivamente. Uma alíquota de 100 µL de cada solução foi adicionada nos orifícios (5 mm) no centro do BDA previamente inoculado com 10⁵ esporos/mL de *F. verticillioides*. As placas foram acondicionadas a 25°C durante 7 dias. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.3 ENSAIOS DE DETOXIFICAÇÃO DE FUMONISINA B₁

4.3.1 Preparo da Suspensão de Bactérias Lácticas

As bactérias lácticas comerciais foram cultivadas em caldo MRS a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 h, sendo o cultivo sucessivo repetido no mínimo 3 vezes para a ativação da bactéria. Posteriormente, foram inoculados 1 mL da cultura em um Erlenmeyer contendo 100 mL de caldo MRS e incubados a 37°C durante 24 h. O cultivo foi centrifugado (3000g, 10 minutos, 5°C) e no caso das amostras com tratamento térmico (inviáveis) a biomassa resultante foi ressuspensa em 100 mL de água ultrapura e autoclavadas durante 15 min a 121°C . A padronização do número de células foi realizada por meio da medida da absorvância em espectrofotômetro a 600 nm e a concentração final foi ajustada para $3,0 \times 10^9$ UFC/mL de acordo com a escala de Mc Farland. A suspensão de células foi centrifugada (3000g, 10 min, 5°C). A biomassa resultante foi lavada 3 vezes com tampão fosfato salino (PBS) pH 7,2 e 4 vezes com água ultra pura estéril. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.3.2 Preparo do Padrão de Fumonisina B₁

O padrão de Fumonisina B₁ – 98% pureza (SIGMA-ALDRICH®) foi ressuspensa em metanol:água (3:1) e sonicado durante 15 minutos. Em seguida, alíquotas com as concentrações desejadas foram colocadas em frasco âmbar e secas sob fluxo de N₂ gasoso a 40°C .

As alíquotas do padrão foram utilizadas na realização da curva de calibração e nos ensaios de detoxificação. No caso da curva de calibração os padrões foram ressuspensos em acetronitrila: água (1:1). No teste de detoxificação foi utilizado PBS pH 7,2.

4.3.3 Análise da Detoxificação de Fumonisina B₁ em meio líquido

A análise de detoxificação foi realizada segundo Pizzolitto, Salvano e Dalcero (2012), Niderkorn, Boudra e Morgavi (2006) e Hernandez-Mendoza, Garcia e Steele (2009) com algumas modificações. O *pellet* de bactérias lácticas (item 4.3.1) foi ressuspenso em uma solução de FB₁ 2,5 µg/mL diluído em PBS pH 7,2, resultando em um volume final de 2 mL. O experimento foi realizado em Tubo Falcon de 50 mL, acondicionados à 37 ± 1°C/ 1 h. Foram preparados controles positivos em Tubo Falcon de 50 mL contendo 2 mL de uma solução de FB₁ 2,5 µg/mL, os controles foram acondicionados e processados da mesma forma que as amostras. Após a incubação, a determinação da FB₁ no sobrenadante foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

4.4 DETERMINAÇÃO DE FUMONISINA B₁ POR CLAE

Uma alíquota de 1 mL do sobrenadante do ensaio (item 4.3.3) foi adicionada a 1 mL de metanol:água (3:1, v/v), sendo a mistura agitada em vortex durante 1 min, posteriormente filtrada em papel filtro Whatman nº IV.

O filtrado (1 mL) foi submetido à pré-limpeza utilizando cartucho de troca aniônica (Sep-Pak Accell Plus QMA – Waters), previamente acondicionada com 5 mL de metanol, seguido de 5 mL de metanol:água (3:1, v/v). Após aplicação de 1 mL de amostra, a coluna foi lavada com 6 mL metanol:água (3:1), seguidos de 3 mL de metanol, a fim de eliminar possíveis interferentes. As fumonisinas foram eluídas com 10 mL de solução de ácido acético a 0,5% em metanol. O eluato foi seco sob fluxo de nitrogênio gasoso a 45°C e o resíduo resultante dissolvido em 800 µL de metanol: água (3:1, v/v), a seguir fracionado em alíquotas de 200 µL. As alíquotas foram novamente secas sob fluxo de gás N₂ a 45°C, acondicionadas a -20°C para posterior determinação de fumonisinas por cromatografia líquida de alta eficiência.

A determinação de fumonisinas foi realizada segundo metodologia descrita por Shephard et al. (1990), modificada por Ueno et al. (1993). A alíquota de 200 µL foi redissolvida em acetonitrila: água (1:1, v/v), e derivatizada com o-ftaldialdeído (OPA - 40 mg de OPA, 1 mL de metanol, 5 mL de tetraborato de sódio 0,1M e 50 µL de 2-mercaptoetanol.

A análise foi realizada por CLAE, consistindo de sistema isocrático de fase reversa (bomba Shimadzu LC-10 AD e detector de fluorescência RF-10A XL), utilizando

coluna C18 (2) 5 μm 100 \AA (250 x 4,6 mm, Luna Phenomenex). Os comprimentos de onda de excitação e emissão foram 335 e 450 nm, respectivamente. A fase móvel consistiu de metanol: fosfato de sódio 0,1 mol/L (80: 20, v/v), com pH ajustado para 3,3 (ácido ortofosfórico). O fluxo foi de 1,0 mL/min a 25°C. A recuperação da FB₁ em nível de 2,5 $\mu\text{g/mL}$ foi de 88,3%.

A porcentagem da toxina removida foi calculada de acordo com a fórmula a seguir:

$$\text{Toxina removida (\%)} = 100 \times 1 - \frac{(\text{Área do pico do sobrenadante da amostra})}{(\text{Área do pico do controle})}$$

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As diferenças entre as médias das porcentagens de redução da FB₁ *in vitro* utilizando diferentes cepas de BAL e dois tratamentos (células viáveis e inviáveis) foram avaliadas estatisticamente utilizando ANOVA e teste de comparações múltiplas de Tukey ($p < 0,05$). As análises foram realizadas utilizando o software Statistica Versão 7 (Stat Soft Inc., Tulsa, OK, USA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão foram redigidos sob a forma de artigo científico a ser submetido para publicação de acordo com as normas do periódico Journal of Applied Microbiology.

5.1 ARTIGO A:

EFFECT OF LACTIC ACID BACTERIA ON *FUSARIUM VERTICILLIOIDES* GROWTH AND FUMONISIN B₁ DETOXIFICATION

Abstract

Aims: *Fusarium verticillioides* is a primary corn pathogen with global importance because it causes economic losses and risks to human and animal health due to production of fumonisins. This study aimed to evaluate the effect of lactic acid bacteria (LAB) strains on *F. verticillioides* growth and fumonisin B₁ (FB₁) detoxification.

Methods and Results: The antagonistic activity of eleven LAB strains was evaluated against five *F. verticillioides* strains. The influence of pH, MRS broth, acetic acid and lactic acid concentration on fungal antagonism and the minimal inhibitory concentration of lactic and acetic acids were evaluated. *In vitro* FB₁ detoxification assay was carried out in PBS using viable and unviable cells (heat inactivated cells). *Lactobacillus reuteri* LR-92 and *L. plantarum* BG112 strains showed the highest inhibition zone diameters, 30 mm and 23.7 mm, respectively. All the *F. verticillioides* strains showed altered growth due to lactic and acetic acids, and the 97L strain was shown to be the most susceptible strain, with inhibition zone diameter ranging from 26 to 55 mm and from 10 to 17 mm according to the concentration of acetic acid and lactic acid, respectively. All the LAB strains showed FB₁ removal ability *in vitro* with percentages ranging from 30.1% to 78.0% (viable cells) and 49.5% to 88.0% (unviable cells). *L. fermentum* ATCC 9339 and *L. reuteri* LR-92 strains showed the highest FB₁ removal ability, 78.0% and 80.7 (viable and unviable) and 71.9% and 88.0% (viable and unviable cells), respectively.

Conclusions: LAB strains showed antifungal activity and *in vitro* FB₁ detoxification ability.

Significance and Impact of the Study: The LAB strains can be used as an additive in food and feed to minimize health risks caused by FB₁.

1.Introduction

Fusarium verticillioides is the main fungal contaminant of maize in the world (Leslie 1996; Mills 1989). It is estimated that about 90% of world maize production is contaminated by this fungus (Rheeder *et al.* 2002).

Fumonisin is a group of toxic secondary metabolites produced mainly by *F. verticillioides* (Marasas 2001; Theumer *et al.* 2012). Although 28 analogs have been characterized, fumonisin B₁ is the most abundant and the most toxic (Galvano *et al.* 2002; Mallmann *et al.* 2001; Rheeder *et al.* 2002; Shephard *et al.* 1996). It is estimated that this mycotoxin is responsible for 70% of worldwide food contamination (Thiel *et al.* 1991).

In humans, the detection of this mycotoxin in maize has been associated with the incidence of esophageal cancer in Africa, China and North East Italy (Peraica *et al.* 1999), primary liver cancer (Sydenham *et al.* 1990; Ueno *et al.* 1997) and neural tube defects in Mexico and Guatemala (Meredith 1999; Missmer *et al.* 2006). The International Agency for Research on Cancer has classified FB₁ in group 2B, i.e, a probable human carcinogen (IARC 2002).

In animals, the most severe effects include leukoencephalomalacia in horses (Ledoux *et al.* 1992; Mallmann *et al.* 1999), decreased weight gain, enlargement of the liver, biliary hyperplasia in broilers and pigs, pulmonary edema, liver abnormalities, and sphingolipid metabolism (Harrison *et al.* 1990; Haschek *et al.* 2001).

The control methods for mycotoxins aim to decrease the concentration to a level considered safe or to use non-toxic compounds that degrade toxins, without loss in nutritional quality of food. These methods are classified into two main categories: prevention of contamination and fungal growth and detoxification of toxic compounds produced by the fungus (Mallmann *et al.* 2006).

Several lactic acid bacteria (LAB) have been evaluated for antimicrobial activity and detoxification ability of mycotoxins (Bovo *et al.* 2013; Corassin *et al.* 2013; Dalié *et al.* 2010; Franco *et al.* 2011; Fuchs *et al.* 2008; Khoury *et al.* 2011; Niderkorn *et al.* 2006; Niderkorn *et al.* 2009; Pizzolitto *et al.* 2012; Sezer *et al.* 2013). The mechanisms that may be involved in

the inhibitory effect on fungal growth are based on nutrient competition, production of secondary metabolites, pH, or a combination of these factors (Hansen 2002).

Some authors have reported that the major mechanism of *in vitro* FB₁ detoxification is probably the mycotoxin binding to bacterial cell wall (El-Nezami *et al.* 2002; Niderkorn *et al.* 2009). Other studies have demonstrated that some microorganisms produce enzymes that alter the structure of mycotoxin and its pathogenicity (Westby *et al.* 1997).

Considering the potential of LAB for mycotoxin detoxification and the few number of published manuscripts relating the LAB with antifungal activity against *F. verticillioides* and FB₁ detoxification, the aim of this study was to evaluate the effect of lactic acid bacteria on *F. verticillioides* growth and FB₁ detoxification *in vitro*.

2. Material and Methods

2.1. Micro-organisms and culture conditions

In this study the effect of LAB cultures on *F. verticillioides* growth and FB₁ removal was evaluated. The LAB (11) strains were *L. plantarum* ATCC 14917, *L. plantarum* ATCC 94917, *L. fermentum* ATCC 9339 (American Type Culture Collection); *L. rhamnosus*, *L. paracasei*, *L. gasseri*, *L. plantarum* (Culture collection by Department of Food Science and Technology – State University of Londrina) *L. reuteri* Lyofast LR-92 (Sacco), *L. helveticus* Lyofast LH3 (Sacco), *L. plantarum* Lyofast BG112 (Sacco) and *L. acidophilus* Lyofast LA3 (Sacco) (comercial cultures). Seven LAB strains were used for FB₁ removal experiments. The LAB strains were cultured in Man Rogosa Sharpe (MRS) broth at 37°C for 24 h and subcultured at least three times. They were maintained as frozen stock cultures at – 20°C in MRS supplemented with 25% (v/v) glycerol.

A total of five *F. verticillioides* strains (97L, 97K, 103F, 113F and 103G) was kindly provided by Dr. Elisa Yoko Hirooka from the Department of Food Science and Technology, State University of Londrina. These *F. verticillioides* strains were isolated from corn feed involved in animal intoxication outbreaks and morphologically identified at the Science

University of Tokyo, Japan. The strains were grown on PDA (Potato Dextrose Agar) at 25°C/7 days and stored at 4°C.

2.2 Evaluation of Antifungal activity

Evaluation of antifungal activity was performed by the agar diffusion assay according to Corsetti *et al.* (1998) with some modifications. Sterile Petri dishes were inoculated with a suspension of 10^5 propagules mL^{-1} of *F. verticillioides* strains and 20 ml of PDA (Potato Dextrose Agar).

After agar solidification, an aliquot of 100 μL of MRS broth with LAB adjusted concentrations of 3.0×10^9 CFU mL^{-1} was inoculated in holes (5 mm diameter) in the center of the plate (Ammor *et al.* 2006). Then the plates were incubated at 25°C for 7 days and the inhibition zone was measured. Inhibition zone was defined as the diameter without fungal growth around the hole. All the tests were performed in triplicate.

2.3 Evaluation of effect of pH, acetic acid, lactic acid and media concentration on antifungal activity

The agar diffusion method was carried out according to De Muynck *et al.* (2004) and Magnusson and Schnurer (2005). The antifungal activity was evaluated using sterile MRS broth with different concentrations of acetic acid and lactic acid (10%, 20%, 30%, 40% and 50% w/v). MRS broth ranging from 2, 4, 6, 8 and 10-fold more concentrated and MRS broth with pH adjusted at 1, 2, 3, 4, 5 and 6 using hydrochloric acid (5 mmol mL^{-1}) were evaluated. An aliquot of 100 μL of MRS broth was added in the holes (5 mm) in the center of the PDA agar previously inoculated with 10^5 propagules mL^{-1} *F. verticillioides*. All the assays were performed in triplicate

2.4 Determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) of lactic acid and acetic acid in the fungal growth

The minimum inhibitory concentrations of lactic and acetic acid were determined for the five *F. verticillioides* strains. The MIC was defined as the lowest concentration of acid capable of inhibiting fungal growth over a period of at least 72 h. Lactic and acetic acid were used at 0.4, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 and 4.0% (w/v) and 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7 and 0.9% (w/v), respectively. An aliquot of 100 μL of MRS broth was added in the holes (5 mm) in the center of the PDA agar previously inoculated with 10^5 propagules mL^{-1} *F. verticillioides*. All the assays were performed in triplicate

2.5 Fumonisin B₁ detoxification assay

The detoxification analysis was performed according to Pizzolito *et al.* (2012), Niderkorn *et al.* (2006) and Hernandez-Mendoza *et al.* (2009) with some modifications. The final concentration of LAB was standardized at 3.0×10^9 CFU mL^{-1} after centrifugation (5000 g, 10 min, 4°C), followed by subsequent washes with phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.2 and ultrapure water. In order to evaluate the effect of cell viability on detoxification, heat inactivated LAB cells (121°C for 15 min) were also used. The preparation procedure was the same as for viable cells (no heat treatment). The resulting pellet was resuspended in a FB₁ solution (2.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$). The toxin was prepared using FB₁ (Sigma, St. Louis, MO, USA) diluted in PBS (pH 7.2) to a final concentration of 2.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The experiment was carried out in 50 mL Falcon tubes at $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Positive controls were prepared in 50 mL Falcon tubes containing 2 ml of FB₁ solution (2.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$), and processed in the same way as the samples. After incubation, FB₁ determination in the supernatant was performed by high-performance liquid chromatography (HPLC).

The percentage of toxin removed was calculated according to the following formula:

$$\text{Toxin removed (\%)} = 100 \times 1 - \frac{(\text{Peak area of toxin in the supernatant})}{(\text{Peak area of positive control})}$$

2.6 Quantification of fumonisin B₁ by HPLC

An aliquot of 1 mL of test supernatants was mixed in 1 ml of methanol: water (3: 1, v/v), then 1 mL of the mixture was cleaned up using anion exchange cartridge (Sep-Pak Accell Plus QMA - Waters).

Fumonisin determination was performed according to Shephard *et al.* (1990), modified by Ueno *et al.* (1993). The aliquot of 200 μ L was redissolved in acetonitrile: water (1: 1, v/v) and derivatized with o-phthalaldehyde (OPA - 40 mg OPA in 1 ml methanol, 5 ml of 0.1 mmol l⁻¹ sodium tetraborate and 50 μ l of 2-mercaptoethanol).

The analysis was performed by reversed-phase isocratic high performance liquid chromatography (HPLC), system (Shimadzu LC-10 AD pump and RF-10A XL fluorescence detector) using Nucleosil 100-5 C18 column (4.6 x 250 mm, Macherey-Nagel GmbH & Co.). The excitation and emission wavelengths were 335 and 450 nm, respectively. The mobile phase consisted of CH₃OH: 0.1 mol l⁻¹ NaH₂PO₄ (80:20, v/v), pH adjusted to 3.3 (orthophosphoric acid). The flow rate was 1.0 ml min⁻¹ at 25°C.

The recovery rate of FB₁ from positive control sample with 2.5 μ g mL⁻¹ averaged 88.3%.

2.7 Statistical Analysis

Differences in mean FB₁ removal (%) among different LAB strains and viable and unviable (heat inactivated cells) were evaluated statistically using ANOVA followed by the Tukey multiple-comparison test (p<0.05). Statistical analysis was performed by Satitistic software, version 7 (Stat Soft, Inc., Tulsa, OK, USA).

3.Results

3.1 Evaluation of antifungal activity

The antifungal activity was based on the inhibition diameter and classified according to Rouse *et al.* (2008) in (-) no inhibition; (+) very weak inhibition (diameters from 1 to 15 mm), (++) moderate inhibition (diameters from 16 to 30 mm), (+++) medium inhibition (diameters from 31 to 45 mm) and (++++) great inhibition (diameters greater than 45 mm).

The antifungal activity of LAB against five *F. verticillioides* strains is shown in Table 1. The LAB strains showed different degrees of inhibition against the five *F. verticillioides* strains. *L. reuteri* LR-92 and *L. plantarum* BG112 showed the highest antagonistic activity against *F. verticillioides* 97L with inhibition diameters of 30.0 mm and 23.7 mm, respectively (moderate inhibition). Antifungal activity of other LAB strains ranged from 2.3 to 11.3 mm (*L. acidophilus* LA3 – 113 F and *L. gasseri* – 97L, respectively), but the inhibition was considered very weak.

3.2 Effect of pH, acetic acid, lactic acid and media concentration on antifungal activity

The effect of different concentrations of the MRS broth, lactic and acetic acid and pH on antifungal activity is shown in Table 2. The growth of the five *F. verticillioides* strains was inhibited by different concentrations of acetic acid and lactic acid. The inhibition diameters according to the increase in acetic acid concentration ranged from 26 -55 mm (97L), 18-47 mm (97K), 15-49 mm (103F), 20-43 mm (113F) and 15-37 mm (103G). The 97L strain was the most sensitive to the acetic acid. All the strains also showed growth inhibition by lactic acid. The inhibition diameters ranged from 10-17 mm (97L), 5-11 mm (97K), 7-13 mm (103F), 4-12 mm (113F) and 5-13 mm (103G).

Concerning the MRS broth concentration the *F. verticillioides* strains showed no growth inhibition. The MRS broth at pH 1 inhibited the growth of the 97L, 103F, 113F and 103G strains with inhibition zone diameter of 6, 3, 2 and 2 mm, respectively. Other pH values were unable to inhibit *F. verticillioides* growth, suggesting that the antagonism may be related to the presence of lactic and acetic acid.

3.3 The minimum inhibitory concentration (MIC) of lactic acid and acetic acid on fungal growth

The MIC values of lactic acid and acetic acid for the five *F.verticillioides* strains are shown in Table 3. The MIC of lactic and acetic acid for strains 97L, 97K, 103F, 113F and 103G were 0.4, 1.0, 2.0, 2.0, and 2.0% (w/v) and 0.2, 0.4, 1.0, 0.5 and 0.4% (w/v), respectively. The 97L strain showed the lowest MIC values, which was the most sensitive strain to the concentration of both acids.

3.4 Fumonisin B₁ detoxification assay

The ability of LAB strains to remove FB₁ from PBS solution is shown in Table 4. All the strains showed FB₁ removal ability and reduction rates ranged from 30.1% (viable cells) for *L. gasseri* to 88.0% for unviable cells of *L. reuteri* LR-92. FB₁ removal by the viable cells ranged from 30.1% (*L. gasseri*) to 78.0% (*L. fermentum* ATCC 9339), with a mean of 51.5%. *L. fermentum* ATCC 9339 showed the highest FB₁ removal ability (78.0%), but there was no significant difference ($p>0.05$) from *L. reuteri* LCR-92 (71.9%).

Inactivated cells by heat treatment showed FB₁ removal percentage ranging from 49.5% (*L. plantarum* BG112) to 88.0% (*L. reuteri* LR-92) and mean value was 67.4%. The *L. reuteri* LR-92 (88.0%), *L. paracasei* (80.7%), *L. fermentum* ATCC 9339 (80.7%) and *L. gasseri* (72.9%) strains showed the highest FB₁ removal ability, differing significantly ($p<0.05$) from other LAB strains.

Comparing the FB₁ removal (%) by the same strain, heat inactivated cells of *L. reuteri* LR-92, *L. paracasei*, *L. gasseri* strains showed the highest ability ($p<0.05$). Other strains showed no significant difference ($p>0.05$) in mean FB₁ removal (%) between viable and heat inactivated strains.

4. Discussion

The lactic acid bacteria (LAB) are important natural biological antagonists, and have been widely used in several studies of decontamination of foods by mycotoxins (Dalié *et al.* 2010). Some authors describe the LABs as appropriate antifungal agents, inhibiting the growth of some fungi (El-Gendy and Marth 1980) and promoting reduced production of mycotoxins (El-Gendy and Marth 1981; Karunaratne *et al.* 1990).

In this study, *F. verticillioides* 97L showed to be the most sensitive strain to LAB (Table 1). The *L. plantarum* BG112 and *L. reuteri* LR-92 strains showed the greatest inhibition. Considering the influence of other test compounds, *F. verticillioides* 97L was also the most susceptible to the lactic acid and acetic acid as shown by the MIC values (Table 3). This strain was inhibited by a lower concentration of these acids compared to the other strains under the same conditions. These results are in agreement with Plokcová *et al.* (2001) who reported that the antifungal activity of *L. reuteri* CCM3625 was associated with the production of the mixture of lactic acid (0.9% w/w), acetic acid (0.2% w/w) and succinic acid (0.2% w/w). In the same study, Plokcová *et al.* (2001) evaluated the possibility to control mould growth (*Fusarium* sp., *Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp.) by *L. rhamnosus* VT1 and *L. reuteri* CCM 3625 using the milk agar plate method. The most sensitive was *Fusarium* sp., whose growth was completely inhibited by both bacteria.

Although there are many studies reporting the antifungal activity of LABs, there are few studies using *F. verticillioides* strains. Some studies demonstrate the efficiency of LAB strains in controlling *Fusarium* sp. Growth (Hassan and Bullerman 2008; Mauch *et al.* 2010)

In the present study *L. plantarum* BG112 strain stood out for its inhibitory ability. Laitila *et al.* (2002) demonstrated the efficiency of *L. plantarum* E76 against *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. oxysporum* and *F. graminearum*. Lavermicocca *et al.* (2000) evaluated the antifungal activity of *L. plantarum* 21B, and reported inhibition against *Eurotium repens* IBT18000, *Eurotium rubrum* FTDC3228, *Penicillium corylophilum* IBT6978, *Penicillium roqueforti* IBT18687, *Penicillium expansum* IDM / FS2, and *Endomyces fibuliger* IBT605 IDM3812, *Aspergillus niger* FTDC3227/ IDM1, *Aspergillus flavus* FTDC3226, *Monilia sitophila* IDM / FS5, and *Fusarium graminearum* IDM623. Further, two novel antifungal

compounds (phenylactic and 4-hydroxyphenyllactic acids) were identified in the culture filtrate of *L. plantarum* 21B.

Although the inhibition growth of *F. verticillioides* 97L (Table 1) has been probably related to the production of lactic acid and acetic acid by *L. reuteri* LR-92, other compounds could be related to inhibition. This species can produce reuterin, antimicrobial compound that acts on several micro-organisms including *Fusarium* sp. (Chung *et al.* 1989).

The antifungal activity of LABs consists of a complex phenomenon, because these bacteria are capable of producing different antagonistic compounds that often act in synergy (Voulgari *et al.* 2010; Yang and Chang 2010). Thus, additional studies are required in order to elucidate which compounds are involved with fungal antagonism.

There are several studies on LABs and their properties of mycotoxin detoxification including fumonisins (Niderkorn *et al.* 2006; Niderkorn *et al.* 2009), aflatoxins (Bovo *et al.* 2013; El khoury *et al.* 2011), deoxynivalenol (DON) (Franco *et al.* 2011; Hassan and Bullerman 2013), ochratoxin (Fuchs *et al.* 2008), and patulin (Hatab *et al.* 2012). This study aimed to evaluate the ability of lactic acid bacterial strains (viable and unviable cells) to remove FB₁ from PBS solution (pH 7.2). All the seven strains (Table 4) were able to remove FB₁, and unviable cells showed higher removal percentages (49.5% - 88.0%) than viable cells (30.1% - 78.0%).

FB₁ removal percentages (Table 4) were higher than those reported by Pizzollito *et al.* (2012), probably because these authors used lower cell concentrations (6.5×10^8 cell mL⁻¹) and different LAB species. Pizzollito *et al.* (2012) evaluated the ability of *Saccharomyces cerevisiae* CECT 1891 and *Lactobacillus acidophilus* 24 to remove FB₁ from PBS solution. The authors concluded that the removal was dependent on the mycotoxin concentrations and bacterial cell and the mechanism involved in FB₁ removal was binding at the bacterial cell wall.

Niderkorn *et al.* (2006) evaluated DON and fumonisin B₁ and B₂ removal from MRS broth (pH 4.0) by twenty-nine LAB and propionic acid bacteria (PAB). Mycotoxin removal differed among the strains, and the highest values were obtained for DON (55%), FB₁ (82%) and FB₂ (100%). Probably, binding seemed to be the mode of action, as no toxin derivatives were detected and removal was not impaired in unviable bacteria.

Niderkorn *et al.* (2009) investigated the cell wall components of lactic acid bacteria (LAB) and the functional groups of fumonisin (FB) involved in the LAB-FB interaction of bacteria. The authors suggested that the peptidoglycan (PG) and tricarboxylic acid in LAB and FB, respectively, were the main components involved in the interaction. Other similar studies also indicated mycotoxin binding to the bacteria cell wall as the main mechanism involved and the highest removal were obtained using unviable cells (Franco *et al.* 2011; Haskard *et al.* 2000).

Heating of viable cells can cause protein denaturation or formation of Maillard reaction products. Furthermore, the heat treatment may decrease thickness of the peptidoglycan and/or increased pore sizes. These changes would be responsible for mycotoxin binding to the structures that were not available in the intact cell, therefore improving the detoxification process (El-Nezami *et al.* 2002; Niderkorn *et al.* 2006).

The variability in the detoxification ability can be explained by the difference in molecular structure of the peptidoglycans which varies with the bacterial species (Niderkorn *et al.* 2009). In this study FB₁ removal percentages (Table 4) differed among bacterial species, but strains of the same species (*L. plantarum*) showed similar results ($p>0.05$).

In summary, the possible mechanism involved in FB₁ removal is binding the mycotoxin by the bacterial cell wall. Some strains of LAB were able to inhibit the growth of *F. verticillioides* and to remove FB₁ from liquid medium. However, other studies should be carried out including the characterization of the antagonist compounds and the effect of these on mycotoxin production by *F. verticillioides* and the elucidation of the mechanisms involved in detoxification. Thus the use of LABs may be a promising and safe method for minimizing fungal contamination and mycotoxins in food and feed.

5.Acknowledgements

The authors thank the CAPES (Co-ordination for Formation of High Level Professionals), CNPq (the Brazilian Government Organization for Grant Aid and Fellowship to Brazilian Researchers), FINEP, the Araucária Foundation, Paraná Fund/ SETI for the financial support.

The CNPq (National Council for Scientific and Technological Development) research productivity fellowship is greatly appreciated by E.Y.S. Ono as well the CAPES/Dr scholarship by M. T. Hirozawa.

References

- Bettiol, W. and Ghini, R. (1995) Controle Biológico. In *Manual de Fitopatologia. Princípios e Conceitos*, 3 ed. Bergamin, A.F., Kimati, H. and Amorin, L. pp. 717-728. São Paulo: Agronômica Ceres.
- Bovo, F., Corassin, C.H., Rosim, R.E. and Oliveira, C.A.F. (2013) Efficiency of lactic acid bacteria strains for decontamination of aflatoxin M₁ in phosphate buffer saline solution and in skimmed milk. *Food Bioprocess Tech*, 6, 2230-2234.
- Chung, T. C., Axelsson, L., Lindgren, S. E. and Dobrogosz, W. J. (1989) *In vitro* studies on reuterin synthesis by *Lactobacillus reuteri*. *Microb Ecol Health D* 2, 137-144.
- Corassin, C.H., Bovo, F., Rosim, R.E. and Oliveira, C.A.F. (2013) Efficiency of *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria strains to bind aflatoxin M₁ in UHT skim milk. *Food Control* 31, 80-83.
- Corsetti, A., Gobetti, M., Rossi, J. and Damiani, P. (1998) Antimould activity of sourdough lactic acid bacteria: identification of a mixture of organic acids produced by *Lactobacillus sanfrancisco* CB1. *Appl Microbiol Biotechnol* 50, 253-256.
- Dalié, D.K.D., Deschamps, A.M. and Richard-Forget, F. (2010) Lactic acid bacteria - potential for control of mould growth and mycotoxins a review. *Food Control* 4, 370-380.
- De Muynck, C., Leroy, A.I.J., Maeseneire, S., Arnaut, F., Soetaert, W. and Vandamme, E.J. (2004) Potential of selected lactic acid bacteria to produce food compatible antifungal metabolites. *Microbiol Res* 54, 339-346.
- El-Gendy, S.M. and Marth, E.H. (1980) Growth of toxigenic and non-toxigenic *Aspergilli* and *Penicillia* at different temperatures and in the presence of lactic acid bacteria. *Arch Lebensm hyg* 31, 189-220.
- El-Gendy, S.M. and Marth, E.H. (1981) Growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* in the presence of *Lactobacillus casei*. *J Food Prot* 44, 211-212.
- El Khoury, A., Atoui, A. and Yaghi, J. (2011) Analysis of aflatoxin M₁ in milk and yogurt and AFM₁ reduction by lactic acid bacteria used in Lebanese industry. *J Food Control* 22, 1695-1699.

- El-Nezami, H., Polychronaki, N., Salminen, S. and Mykka, H. (2002) Binding rather than metabolism may explain the interaction of two food-grade *Lactobacillus* strains with zearalenone and its derivative α -zearalenone. *Appl Environ Microbiol* 68, 3545-3549.
- Franco, T., Garcia, S., Hirooka, E., Ono, Y. and dos Santos, J. (2011) Lactic acid bacteria in the inhibition of *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol detoxification. *J Appl Microbiol* 111, 739-748.
- Fuchs, S., Sontag, G., Stidl, R., Ehrlich, V., Kundi, M. and Knasmüller, S. (2008) Detoxification of patulin and ochratoxin A, two abundant mycotoxins, by lactic acid bacteria. *Food Chem Toxicol* 46, 1398-1407.
- Galvano, F., Russo, A., Cardile, V., Galvano, G., Vanella, A. and Renis, M. (2002) DNA damage in human fibroblasts exposed to fumonisin B₁. *Food Chem Toxicol* 40, 25-31.
- Hansen, E.B. (2002) Commercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future. *Int J Food Microbiol* 78, 119-131.
- Harrison, L.R., Colvin, B.M., Greene, J.T., Newman, L.E. and Cole, J.R. (1990) Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B₁ a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. *J Vet Diagn Investig* 2, 217-221.
- Haschek, W.M., Gumprecht, L.A., Smith, G., Tumbleson, E. and Constable, P.D. (2001) Fumonisin toxicosis in swine: An overview of porcine pulmonary edema and current perspectives. *Environ Health Perspect* 109, 251-257.
- Haskard, C.A., El-Nezami, H.S., Kankaanpää, P.E., Salminen, S. and Ahokas, J.T. (2001) Surface binding of aflatoxin B₁ by lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol* 67, 3086-3091.
- Hassan, Y.I. and Bullerman, L.B. (2008) Antifungal activity of *Lactobacillus paracasei* ssp. *Tolerans* isolated from a sourdough bread culture. *Int J Food Microbiol* 121, 112-115.
- Hassan, Y.I. and Bullerman, L.B. (2013) Cell-surface binding of deoxynivalenol to *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* isolated from sourdough starter culture. *J Microb Biotech Food Sci* 2, 2323-2325.
- Hatab S., Yue, T. and Mohamad, O. (2012) Reduction of patulin in aqueous solution by lactic acid bacteria. *J Food Sci* 77, 238-241.
- Hernandez-Mendoza, A., Garcia, H.S. and Steele, J.I. (2009) Screening of *Lactobacillus casei* strains for their ability to bind aflatoxin B₁. *Food Chem Toxicol* 47, 1064-1068.
- International Agency for Research on Cancer – IARC, 2002. Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene. Summary of Data Reported and Evaluation. Monographs Vol. 82. Lyon: IARC, p.171-300.
- Karunaratne, A., Wezcnberg, E. and Bullerman, L.B. (1990) Inhibition of mold growth and aflatoxins production by *Lactobacillus* spp. *J Food Prot* 53, 230-236.

- Khoury, A.El., Atoui, A. and Yaghi, J. (2011) Analysis of aflatoxin M₁ in milk and yogurt and AFM₁ reduction by lactic acid bacteria used in Lebanese industry. *Food Control* 22, 1695- 1699.
- Laitila, A., Alakomi, H.-L., Raaska, L., Mattila-Sandholm, T. and Haikara, A. (2002) Antifungal activities of two *Lactobacillus plantarum* strains against *Fusarium* moulds *in vitro* and in malting of barley. *J Appl Microbiol* 93, 566–576.
- Lavermicocca, P., Valerio, F., Evidente, A., Lazzaroni, S., Corsetti, A. and Gobbetti, M. (2000) Purification and characterization of novel antifungal compounds from sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B. *Appl Environ Microbiol* 66, 4084-4090.
- Ledoux, D.R., Brown, T.P., Weibking, T.S. and Rottinghaus, G.E. (1992) Fumonisin toxicity in broiler chicks. *J Vet Diagn Investig* 4, 330-333.
- Leslie, J.F. (1996) Introductory biology of *Fusarium moniliforme*. In *Fumonisin in food*. Jackson, L.S., De Vries, J.W. and Bullerman, L.B. pp. 153-164. New York: Plenum Press.
- Mallmann, C.A., Santurio, J.M. and Dilkin, P. (1999) Equine leukoencephalomalacia associated with ingestion of corn contaminated with fumonisin B₁. *Rev Microbiol* 30, 249-252.
- Mallmann, C.A., Santurio, J.M., Almeida, C.A.A. and Dilkin, P. (2001) Fumonisin B₁ levels in cereals and feeds from southern Brazil. *Arq Inst Biol* 68, 41-45.
- Mallmann, C.A., Dilkin, P., Giacomini, L.Z. and Rauber, R.H. *Critérios para seleção de um bom sequestrante para micotoxinas*. 2006. 20 p. Disponível em: <http://www.lamic.ufsm.br/papers/20060515_criterios.pdf>. Acesso em: 14 jun. 2014.
- Marasas, W.F.O. (2001) Discovery and occurrence of the fumonisins: a historical perspective. *Environ Health Perspect*, 109, 239-243.
- Mauch, A., Bello, F.D., Coffey, A., Arendt, E.K. (2010) The use of *Lactobacillus brevis* PS1 to *in vitro* inhibit the outgrowth of *Fusarium culmorum* and other common *Fusarium* species found on barley. *Int J Food Microbiol*, 141, 116-121.
- Meredith, F.I., Torres, O.R., Saenz de Tejada S., Riley, R.T., Merrill, A.H.Jr. (1999) Fumonisin B₁ and hydrolyzed fumonisin B₁ (AP₁) in tortillas and nixtamalized corn (*Zea mays* L.) from two different geographic locations in Guatemala. *J Food Prot* 62, 1218 - 1222.
- Mills, J.T. (1989) Ecology of mycotoxigenic *Fusarium* species on cereal seeds. *J Food Protect* 52, 737-742.
- Missmer, S.A., Suarez, L., Felkner, M., Wang, E., Merrill Júnior, A.H., Rothman, J. and Hendricks, K.A. (2006) Exposure to *Fumonisin*s and the occurrence of neural tube defects along the Texas-Mexico border. *Environ Health Perspect* 114, 237-241.

- Niderkorn, V., Boudra, H. and Morgavi, D.P. (2006) Binding of *Fusarium* mycotoxins by fermentative bacteria *in vitro*. *J Appl Microbiol* 101, 849-856.
- Niderkorn, V., Morgavi, D.P., Aboab, B., Lemaire, M. and Boudra, H. (2009) Cell wall component and mycotoxin moieties involved in the binding of fumonisin B₁ and B₂ by lactic acid bacteria. *J Appl Microbiol* 106, 977-985.
- Peraica, M., Domijan, A. M., Fuchs, R., Lucic, A. and Radic, B. (1999) The occurrence of ochratoxin A in blood in general population of Croatia. *Toxicol Lett* 110, 105-112.
- Pizzolitto, R.P., Salvano, M.A. and Dalcerro, A.M. (2012) Analysis of fumonisin B₁ removal by microorganisms in co-occurrence with aflatoxin B₁ and the nature of the binding process. *Int J Food Microbiol* 156, 214-221.
- Plockova, M., Stiles, J. and Chumchalova, J. (2001) Control of mould growth by *Lactobacillus rhamnosus* VT1 and *Lactobacillus reuteri* CCM 3625 on milk agar plates. *Czech J Food Sci* 19, 46-50.
- Rheeder, J.P., Marasas, W.F.O. and Vismer, H.F. (2002) Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species. *Appl Environ Microb*, 68, 2101-2105.
- Rouse, S., Harnett, D., Vaughan, A. and Van Sinderen, D. (2008) Lactic acid bacteria with potential to eliminate fungal spoilage in foods. *J Appl Microbiol* 104, 915-923.
- Schnüner, J. and Magnusson, J. (2005) Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trends Food Sci Tech* 16, 70-78.
- Sezer, C., Güven, A., Bilge Oral, N. and Vatansever, L. (2013) Detoxification of aflatoxin B₁ by bacteriocins and bacteriocinogenic lactic acid bacteria. *Turk J Vet Anim Sci* 37, 594-601.
- Shephard, G.S., Thiel, P.G., Stackenstrom, S. and Sydenham, E.W. (1996) Worldwide survey of fumonisin contamination of corn and corn-based products. *JAOAC* 79, 671-687.
- Shephard, G.S., Van Der Westhuizen, L., Thiel, P.G., Gelderblom, W.C.A., Marasas, W.F.O. and Van Schalkwyk, D. J. (1996) Disruption of sphingolipid metabolism in non-human primates consuming diets of fumonisin-containing *Fusarium moniliforme* culture material. *Toxicon* 34, 527-534.
- Sydenham, E.W., Thiel, P.G., Marasas, W.F.O., Shephard, G.S., Van Schalkwyk, D.J. and Koch, K.R. (1990) Natural occurrence of some *Fusarium* mycotoxins in corn from low and high esophageal cancer prevalence areas of the Transkei, Southern Africa. *J Agr Food Chem* 38, 1900-1903.
- Theumer, M.G., Canepa, M.C., Lopez, A.G. and Mary, V.S., Dambolena, J.S., Rubinstein, H.R. (2010) Subchronic mycotoxicoses in Wistar rats: assessment of the *in vivo* and *in vitro* genotoxicity induced by fumonisins and aflatoxin B₁, and oxidative stress biomarkers status. *Toxicology* 268, 104-110.

- Thiel, P.G., Shephard, G.S., Sydenham, E.W., Marasas, W.F.O., Nelson, P.E. and Wilson, T.M. (1991) Levels of fumonisins B₁ and B₂ in feeds associated with confirmed cases of equine leukoencephalomalacia. *J Agr Food Chem* 39, 109-111.
- Ueno, Y., Aoyama, S., Sugiura, Y., Wang, D.S., Lee, U.S., Hirooka, E.Y., Hara, S., Karki, T., Chen, G. and Yu, S.Z. (1993), A limited surveys of fumonisins in corn and corn-based products in Asian Countries. *Mycotoxin Res* 9, 27-34
- Ueno, Y., Iijima, K., Wang, S.-D., Sugiura, Y., Sekijima, M., Tanaka, T.; Chen, C. and YU, S.-Z. (1997) Fumonisins 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* 35, 1143-1150.
- Voulgari, K., Hatzikamari, M., Delepoglou, A., Georgakopoulos, P., Litopoulou- Tzanetaki, E. and Tzanetakis, N. (2010) Antifungal activity of non-starter lactic acid bacteria isolates from dairy products. *Food Control* 21, 136 -142.
- Westby, A., Reilly, A. and Bainbridge, Z. (1997) Review of the effect of fermentation on naturally occurring toxins. *Food Control* 8, 329-339.
- Yang, E.J. and Chang, H.C. (2010) Purification of a new antifungal compound produced by *Lactobacillus plantarum* AF₁ isolated from kimchi. *Int J Food Microbiol* 139, 56-63.

Table 1 Antagonistic activity of commercial cultures of lactic acid bacteria against five *F. verticillioides* strains (97L, 97K, 103F, 113F e 103G).

Microorganism	<i>Fusarium verticillioides</i> strains				
	97L	97K	103F	113F	103G
	Inhibition zone diameter (mm)*				
<i>L. plantarum</i> ATCC 14917	6.0	5.0	5.7	6.0	0
<i>L. plantarum</i> ATCC 94917	5.0	5.7	5.3	6.0	0
<i>L. fermentum</i> ATCC 9339	3.8	4.0	3.3	4.0	0
<i>L. rhamnosus</i>	9.7	6.4	6.3	6.0	0
<i>L. paracasei</i>	10.7	6.3	7.3	7.0	0
<i>L. gasseri</i>	11.3	5.7	5.7	5.3	0
<i>L. plantarum</i>	11.0	5.7	0	6.0	0
<i>L. reuteri</i> LR-92	30.0	0	0	0	4.0
<i>L. helveticus</i> LH3	0	0	0	5.3	0
<i>L. plantarum</i> BG112	23.7	0	0	7.7	6.3
<i>L. acidophilus</i> LA3	3.0	0	0	2.3	0

*Results correspond to the means of triplicate

Table 2 Effect of different concentrations of acetic acid, lactic acid, MRS broth and pH on fungal antagonism

Parameters	<i>Fusarium verticillioides</i> strains					
	97L	97K	103F	113F	103G	
	Inhibition zone diameter (mm)					
Acetic Acid Concentration	10	26	18	15	20	15
	20	39	23	38	24	25
	30	55	26	28	31	34
	40	55	38	40	41	37
	50	55	47	49	43	37
Lactic Acid Concentration	10	10	5	7	4	5
	20	13	6	5	7	5
	30	15	9	5	8	8
	40	17	9	10	10	12
	50	17	11	13	12	13
MRS Broth Concentration	2	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0
	8	0	0	0	0	0
	10	0	0	0	0	0
pH of culture medium	1	6	0	3	2	2
	2	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0

*Results correspond to the means of triplicate

Table 3 Minimum inhibitory concentrations of lactic and acetic acid against *F. verticillioides* strains (97L, 97K, 103F, 113F and 103G)

Strains	MIC % (m/v)	
	Lactic acid	Acetic acid
97L	0.4	0.2
97K	1.0	0.4
103F	2.0	1.0
113F	2.0	0.5
103G	2.0	0.4

*Results correspond to the means of triplicate

Table 4 Fumonisin B₁ binding levels (%) by viable and unviable cells of LAB strains at 2.5 µg mL⁻¹ FB₁ concentration

Micro-organism	% FB ₁ removal	
	Viable cells	Unviable Cells by heat treatment
<i>L.plantarum</i> ATCC 14917	35.6 ± 5.8 ^{deB}	50.9 ± 1.6 ^{bB}
<i>L.plantarum</i> ATCC 94917	46.2 ± 5.8 ^{cdB}	49.5 ± 4.9 ^{bB}
<i>L.fermentum</i> ATCC 9339	78.0 ± 1.9 ^{aA}	80.7 ± 0.8 ^{aA}
<i>L.paracasei</i>	57.2 ± 0.9 ^{bcB}	80.7 ± 1.9 ^{aA}
<i>L.gasseri</i>	30.1 ± 4.2 ^{eB}	72.9 ± 4.7 ^{aA}
<i>L.reuteri</i> LR-92	71.9 ± 3.1 ^{abB}	88.0 ± 0.1 ^{aA}
<i>L.plantarum</i> BG112	41.7 ± 5.2 ^{deB}	49.5 ± 3.4 ^{bB}

*Results correspond to the means and SD (standard deviation) from triplicate

Means followed by different lowercase letters (a-e) in the same column differ significantly (p<0.05) by the Tukey test

Means followed by different uppercase letters (A-B) in the same line differ significantly (p<0.05) by the Tukey test

REFERÊNCIAS

ABDEL-WAHHAB, M.A.; NADA, S.A.; AMRA, H.A. Effect of aluminosilicates and bentonite on aflatoxin-induced developmental toxicity in rat. **Journal of Applied Toxicology**, v.19, p.199-204, 1999.

ADEBAYO, C.O.; ADERIYE, B.I. Antifungal activity of bacetriocvins of lactic acid bacteria from some Nigerian fermented foods. **Research Journal of Microbiology**, v. 5, n. 11, p. 1070-1082, 2010.

AHMADOVA, A.; TODOROV, S.D.; CHOISET, Y.; RABESONA, H.; ZADI, T.M.; KULIYEV, A.; DE MELO FRANCO, B.D.G.; CHOBERT, J.-M.; HAERTLÉ, T. Evaluation of antimicrobial activity, probiotic properties and safety of wild strain *Enterococcus faecium* AQ71 isolated from Azerbaijani Motal cheese. **Food Control**, v. 30, n. 2, p. 631-41, 2013.

ALBERTS, J.F.; GELDERBLOM, W.C.A.; THIEL, P.G.; MARASAS, W.F.O.; VAN SCHALKWYK, D.J.; BEHREND, Y. Effects of temperature and incubation period on production of fumonisin B₁ by *Fusarium moniliforme*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 56, p. 1729-1733, 1990.

AVANTAGGIATO, G.; HAVENAAR, R.; VISCONTI, 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.

AXEL, C.; ZANNINI, E.; ARENDT, E.K.; WATERS, D.M.; CZERNY, M. Quantification of cyclic dipeptides from cultures of *Lactobacillus brevis* R2 by HRGC/MS using stable isotope dilution assay. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 406, p. 2433-2444, 2014.

AXELSSON, L.; CHUNG, T.C.; DOBROGOSZ, W.J.; LINDGREN, L.E. Discovery of a new antimicrobial substance produced by *Lactobacillus reuteri*. **FEMS Microbiol Ver**, v. 46, p.65-71, 1987.

AXELSSON, L.; CHUNG, T.C.; DOBROGOSZ, W.J.; LINDGREN, L.E. 1989. Production of a broad spectrum antimicrobial substance by *Lactobacillus reuteri*. **Microb Ecol Health Disease**, v.2, p.131-136, 1989.

AXELSSON, L. *Lactobacillus reuteri*, a member of the gut bacterial flora: studies on antagonismo, metabolism and genetics. 65 p. PhD Thsesis - Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala, Sweden, 1990.

AXELSSON, L. Lactic Acid Bacteria: Classification and physiology. In: SALMINEN, S.; WRIGHT, A.V.; OUWEHAND, A. **Lactic acid bacteria, microbiological and functional aspects**. 3. ed. New York: Marcel Dekker, 2004. p. 1-66.

AWAD, W.A.; GHAREEB, K.; BOHM, J.; ZENTEK, J. Decontamination and detoxification strategies for the *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol in animal feed and the effectiveness of microbial biodegradation. **Food Additives and Contaminants**, v. 4, n. 27, p. 510-520, 2010.

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.

BAILLY, J.D.; BENARD, G.; JOUGLAR, J.Y.; DURAND, S.; GUERRE, P. Toxicity of *Fusarium moniliforme* culture material containing known levels of fumonisin B₁ in ducks. **Toxicology**, v. 163, p. 11-22, 2001.

BATA, A.; LÁSZTITY, R. Detoxification of mycotoxin-contaminated food and feed by microorganisms. **Trends in Food Science & Technology**, v. 10, p. 223-228, 1999.

BATISH, V.K.; ROY, U.; LAL, R.; GROVER, S. Antifungal attributes of lactic acid bacteria – A review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 17, p. 2009-2225, 1997.

BEAVER, R.W. Decontamination of mycotoxin-containing foods and feedstuffs. **Trends in Food Science & Technology**, v. 2, p. 170-173, 1991.

BENNETT, J.W. Mycotoxins, mycotoxicoses, mycotoxicology and mycopathology. **Mycopathologia**, v. 100, p. 3-5, 1987.

BENNETT, J.W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 6; n. 3, p. 497-516, 2003.

BETTIOL, W.; GHINI, R. Controle Biológico. In: BERGAMIN, A. F.; KIMATI, H.; AMORIN, L. **Manual de Fitopatologia. Princípios e Conceitos**. 3.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. p. 717-728.

BEZUIDENHOUT, S.C., GELDERBLUM, 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*. **Journal of Chemical Society, Chemical Communications**, v. 11, p. 743-745, 1988.

BOJJA, R.S.; CERNY, R.L.; PROCTOR, R.H.; LIANGCHENG, D. Determining the biosynthetic sequence in the early steps of the fumonisin pathway by use of three gene – disruption mutants of *Fusarium verticillioides*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 2855-2860, 2004

BORDINI, J.G.; BORSATO, D.; OLIVEIRA, A.S.; ONO, M.A.; ZANINELLI, T.H.; HIROOKA, E.Y.; ONO, E.Y.S. *In vitro* zearalenone adsorption by a mixture of organic and inorganic adsorbents: application of the Box Behnken approach. **World Mycotoxin Journal**, v.8, p.291-299, 2014.

BORTHWICK, A.D. 2,5-Diketopiperazines: synthesis, reactions, medicinal chemistry, and bioactive natural products. **Chemical Reviews**, v. 112, n. 7, p. 3641-3716, 2012.

BOVO, F.; CORASSIN, C.H.; ROSIM, R.E.; OLIVEIRA, C.A.F. Efficiency of lactic acid bacteria strains for decontamination of aflatoxin M₁ in phosphate buffer saline solution and in skimmed milk. **Food Bioprocess Technolony**, v. 6, p. 2230-2234, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução RDC nº 7 de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília. 2011 fev 22; Seção 1. p. 72.

BROWN, T.P.; ROTTINGHAUS, G.E.; WILLIAMS, M.E. Fumonisin mycotoxicosis in broilers: performance and pathology. **Avian diseases**, v. 36, n. 2, p. 450-454, 1992.

BUIATE, E.A.S.; BRITO, C.H.; BATISTELLA, R.A.B.; BRANDÃO, A.M. **Reação de híbridos de milho e levantamento dos principais fungos associados ao complexo de patógenos causadores de “grão ardido” em Minas Gerais**. Horizonte científico, Uberlândia, v. 2, n. 1, 2008. Disponível em: <<http://www.seer.ufu.br/index.php/horizontecientifico/article/viewFile/4125/3072>> Acesso em: 17 jan. 2014

BURGESS, T.; DELL, B.; MALAJCZUK, N. Variation in mycorrhizal development and growth simulation by 20 *Pisolithus* isolates inoculated onto *Eucalyptus grandis*. **New Phytologist**, v. 127, p. 731-739, 1994.

BRYDEN, W.L.; RAVINDRAN, G.; SALAHIFAR, H.; GILL, R.J.; BURGESS, L.W. Fumonisin content of Australian maize. **Proceedings of the Nutrition Society of Australia**, v.19, p.46, 1995.

CAMARGOS, S.M.; SOARES, L.M.V; SAWAZAKI, E; BOLONHEZI, D; CASTRO, J.L.; BORTOLLETO, N. Fumonisin in corn cultivars in the State of São Paulo. **Brazilian Journal of Microbiology**, v .31, p. 225-229, 2000.

CAST - Council for Agricultural Science and Technology - Task Force Report. **Mycotoxins: Risks in plant, animal, and human systems**. Ames, Iowa, n. 139, 2003, 191p.

CAVAGLIERI, L.; ORLANDO, J.; RODRÍGUEZ, M.I.; CHULZE, S.; ETCHEVERRY, M. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticillioides* *in vitro* and at the maize root level. **Research in Microbiology**, v. 156, p. 748-754, 2005.

CHEN, J.; MIROCHA, C.J.; XIE, W.; HOGGE, L.; OLSON, D. Production of the Mycotoxin Fumonisin B₁ by *Alternaria alternata* f. sp. *Lycopersicit*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 12, p. 3928-3931, 1992

CHEN, W.B.; HAN, Y.F.; JONG, S.C.; CHANG, S.C. Isolation, purification, and characterization of a killer protein from *Schwanniomyces occidentalis*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 66, p. 5348-5352, 2000.

CHUNG, T.C.; AXELSSON, L.; LINDGREN, S.E.; DOBROGOSZ, W.J. *In vitro* studies on reuterin synthesis by *Lactobacillus reuteri*. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v. 2, p. 137-144, 1989.

CIFUENTES, G. Perfil epidemiológico de las anomalías del tubo neural en Guatemala, durante el año 2000. 2000. Graduation Thesis of the School of Medicine of Universidad San Carlos de Guatemala.

CODA, R.; CASSONE, A.; RIZZELLO, C.G.; NIONELLI, L.; CARDINALI, G.; GOBBETTI, M. Antifungal activity of *Wickerhamomyces anomalus* and *Lactobacillus plantarum* during sourdough fermentation: identification of novel compounds and long-term effect during storage of wheat bread. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, p. 3484-92, 2011.

COMISSÃO EUROPEIA. Recomendação da comissão de 17 de Agosto de 2006 sobre a presença de desoxinivalenol, zearalenona, ocratoxina A, toxinas T-2 e HT-2 e fumonisinas em produtos destinados à alimentação animal. **Jornal Oficial da União EUROPEIA**, L 229/7- L 229/9, 2006.

COMISSÃO EUROPEIA. Regulamento (CE) No 1126/2007 da Comissão de 28 de Setembro de 2007 que altera o Regulamento (CE) No 1881/2006 que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios, no que se refere às toxinas do *Fusarium* no

milho e nos produtos à base de milho. **Jornal Oficial da União EUROPEIA**, L255/14-L255/17, 2007.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Produtos e serviços – safras – levantamento de safra – 5º Levantamento Grãos safra 2014/2015 fevereiro de 2015. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_02_13_10_34_06_boletim_graos_fevereiro_2015.pdf>. Acesso em 25 fevereiro. 2015.

CORASSIN, C.H.; BOVO, F.; ROSIM, R.E.; OLIVEIRA C.A.F. Efficiency of *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria strains to bind aflatoxin M₁ in UHT skim milk. **Food Control**, v. 31, p. 80-83, 2013.

COTTER, P.D.; HILL, C.; ROSS, R.P. Bacterial lantibiotics: Strategies to improve therapeutic potential. **Current Protein and Peptide Science**, v. 6, p. 61-75, 2005.

DAESCHEL, M.A. Antibacterial substances from lactic acid bacteria for use a food preservatives. **Food Technology**, v. 43, p. 164-167, 1989

DALIÉ, D.K.D.; DESCHAMPS, A.M.; RICHARD-FORGET, F. Lactic acid bacteria - potential for control of mould growth and mycotoxins a review. **Food Control**, v. 4, p. 370-380, 2010.

DALIÉ, D.; PINSON-GADAIS, L.; ATANASOVA-PENICHON, V.; MARCHEGAY, G.; BARREAU, C.; DESCHAMPS, A.; RICHARD-FORGET, F. Impact of *Pediococcus pentosaceus* strain L006 and its metabolites on fumonisin biosynthesis by *Fusarium verticillioides*. **Food Control**, v. 23, p. 405-411, 2012.

DAVIDSON, P.M.; POST, L.S.; BRANEN, A.L.; MCCURDY, A.R. Naturally occurring and miscellaneous food antimicrobials. In: Branen, A.L.; Davidson, P.M. **Antimicrobials in Foods**. New York: Marcel Dekker 1983. p. 385-92.

DAW, A. M.; FALKINER, F. R. Bacteriocins: nature, function and structure. **Micron**, v. 27, p. 467-479, 1996.

DEL FAVA, C.; LARA, M.C.C.S.H.; VILLALOBOS, E.M.C.; NASSAR, A.F.C.; CABRAL, A.D.; TORELLI, C.S.; CUNHA, M.S.; CUNHA, E.M.S. Ocorrência de leucoencefalomalácia (LEME) em equídeos no Estado de São Paulo, Brasil: achados anatomopatológicos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 47, n. 6, p. 488-494, 2010.

DE MUYNCK, C.; LEROY, A.I.J.; DE MAESENEIRE, S.; ARNAUT, F.; SOETAERT, W.; VANDAMME, E.J. Potential of selected lactic acid bacteria to produce food compatible antifungal metabolites. **Microbiological Research**, v. 159, p. 339-346, 2004.

DE NIJS, M.; SIZOO, E.A.; VERMUNT, A.E.M.; NOTERMANS, S.H.W.; VAN EGMOND, H.P. The occurrence of fumonisin B₁ in maize-containing foods in the Netherlands. **Food Additives and Contaminants**, v. 15, p. 385-388, 1998.

DESJARDINS, A.E. **Fusarium mycotoxins: chemistry, genetics and biology**. St Paul: Amer Phytopathological Society, 2006. 206p.

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

DOKO, M.B.; RAPIOR, S.; VISCONTI, A.; SCHJOTH, J.E. Incidence and levels of fumonisin contamination in maize genotypes grown in Europe and Africa. **Journal of Agricultural Chemistry**, v. 43, p. 429-434, 1995.

DUTTON, MF. Fumonisin, mycotoxins of increasing importance: their nature and their effects. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 70, p. 137-161, 1996.

EARLY, R. **Tecnología de los productos lácteos**. Zaragoza: Acribia. 2000. p. 128-141.

EKLUND, T. The effect of carbon dioxide on bacterial growth and on uptake processes in the bacterial membrane vesicles. **International Journal of Food and Microbiology**, v. 1, p. 179-185, 1984.

EKLUND, T. Organic acids and esters. In: GOULD, G.W. **Mechanisms of action of food preservation procedures**. London: Springer, 1989. p. 161-200.

ELSANHOTYA, R.M.; SALAMA, S.A.; RAMADANC, M.F.; BADR, F.H. Detoxification of aflatoxin M₁ in yoghurt using probiotics and lactic acid bacteria. **Food Control**, v.43, p.129-134.

CRUZ, J.C.; PEREIRA FILHO, I.A.; ALVARENGA, R.C.; GONTIJO NETO, M.M.; VIANA, J.H.M.; OLIVEIRA, M.F.; SANTANA, D.P. Manejo da cultura do milho. In: EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo. **Cultivo do milho**. 2. ed. Sete Lagoas, MG, 2006, 12p. (EMBRAPA. Circular técnica, 87).

DUARTE, J.O.; CRUZ, J.C.; GARCIA, J.C.; MATTOSO, M.J. Economia de Produção. In: EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo. Cultivo do milho. **Cultivo do milho**. 6. ed. Sete Lagoas, MG, 2010. (EMBRAPA. Sistema de produção, 1).

EL-GENDY, S.M.; MARTH, E.H. Growth of toxigenic and non-toxigenic *Aspergilli* and *Penicillia* at different temperatures and in the presence of lactic acid bacteria. **Archiv für Lebensmittelhygiene**, v. 31, p. 189-220, 1980.

EL-GENDY, S.M.; MARTH, E.H. Growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* in the presence of *Lactobacillus casei*. **Journal of Food Protection**, v. 44, p. 211-212, 1981.

EL-NEZAMI, H.; POLYCHRONAKI, N.; SALMINEN, S.; MYKKA, H. Binding rather than metabolism may explain the interaction of two food-grade *Lactobacillus* strains with zearalenone and its derivative α -zearalenone. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 3545-3549, 2002.

EL-ZINEY, M.G.; DEBEVERE, J.M.; JAKOBSEN, M. Reuterin. In: Naidu, A.S. **Natural Food Antimicrobial Systems**. Boca Raton, FL., USA: CRC Press, 2000, p. 567-588.

FANCELLI, A. L. Tecnologia da produção. In: FANCELLI, A. L.; LIMA, U. A. **Milho: produção, processamento e transformação industrial**. São Paulo: Secretaria da Indústria e Comércio, Ciência e Tecnologia, 1983. p. 1-68

FANDOHAN, P.; HELL, K.; MARASAS W.F.O; WINGFIELD, M. Infection of maize by *Fusarium* species and contamination with fumonisin in Africa. **African Journal of Biotechnology**, v. 12, p. 570-579, 2003.

FANDOHAN, P.; GNONLONFINA, B.; HELLB, K.; MARASAS, W.F.O.; WINGFIELD, M.J. Natural occurrence of *Fusarium* and subsequent fumonisin contamination in preharvest and stored maize in Benin, West Africa. **International Journal of Food Microbiology**, v. 99, p. 173-183, 2005.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations- Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. Rome, Italy, 2004.

FDA - FOOD AND DRUG ADMINISTRATION CENTER FOR VETERINARY MEDICINE, November 9, 2001. Background Paper in Support of Fumonisin Levels in Animal Feed: Executive Summary of this Scientific Support Document - Guidance for Industry: Fumonisin Levels in Human Foods and Animal Feeds.

FAZELI, M.R.; HAJIMOHAMMADALI, M.; MOSHKANI, A.; SAMADI, N.; JAMALIFAR, H.; KHOSHAYAND, M. R.; VAGHARI, E.; POURAGAH, S. Aflatoxin B₁ binding capacity of autochthonous strains of Lactic Acid Bacteria. **Journal of Food Protection**, v. 72, n.1, p. 189-192, 2009.

FERROCHIO, L.; CENDOYA, E.; FARNOCHI, M.C.; MASSAD, W.; RAMIREZ, M.L. Evaluation of ability of ferulic acid to control growth and fumonisin production of *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* on maize based media. **International Journal of Food Microbiology**, v. 167, p. 215-220, 2013.

FINK-GREMMELS, J.H. Micotoxins: Their implications for human and animal health. **Veterinary Quarterly**, v. 21, n. 4, p. 115-120, 1999.

FRANCO, T.; GARCIA, S.; HIROOKA, E.; ONO, Y.; dos SANTOS, J. Lactic acid bacteria in the inhibition of *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol detoxification. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111, p. 739-748, 2011.

FUCHS, S.; SONTAG, G.; STIDL, R.; EHRLICH, V.; KUNDI, M.; KNASMULLER, S. Detoxification of patulin and ochratoxin A, two abundant mycotoxins, by lactic acid bacteria. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 1398-1407, 2008.

GALVANO, F.; RUSSO, A.; CARDILE, V.; GALVANO, G.; VANELLA, A.; RENIS, M. DNA damage in human fibroblasts exposed to fumonisin B₁. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p. 25-31, 2002.

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

GEREZ, C.L.; TORINO, M.I.; ROLLAN, G.; FONT DE VALDEZ, G. Prevention of bread mould spoilage by using lactic acid bacteria with antifungal properties. **Food Control**, v. 20, p. 144-148, 2009.

GOULD, G.W. Antimicrobial compound. In: GOLDBERG, I.; WILLIAMS, R **Biotechnology and Food Ingredients**. New York: Springer Science & Business Media, 1991. p. 461-483.

GOURAMA, H.; BULLERMAN, L.B. Detection of molds in foods and feed: potential rapid methods. **Journal of Food Protection**, v. 58, p. 1389-1394, 1995.

GUMPRECHT, L.A.; SMITH, G.W.; CONSTABLE, P.C.; HASCHEK, W.M. Species and organ specificity of fumonisin-induced endothelial alterations: potential role in porcine pulmonar. **Edema. Toxicology**, v. 160, p. 71-79, 2001.

GUPTA, R.; SRIVASTAVA, S. Antifungal effect of antimicrobial peptides (AMPs LR14) derived from *Lactobacillus plantarum* strain LR/14 and their applications in prevention of grain spoilage. **Food Microbiology**, v. 42, v. 1-7, 2014.

HANSEN, E.B. Commercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future. **International Journal of Food Microbiology**, v. 78, v. 119- 131, 2002.

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

HASCHEK, W.M.; GUMPRECHT, L.A.; SMITH, G.; TUMBLESON, E.; CONSTABLE, P.D. Fumonisin toxicosis in swine: An overview of porcine pulmonary edema and current perspectives. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, p. 251-257, 2001.

HASKARD, C.A.; EL-NEZAMI, H.S.; KANKAANPAA, P.E.; SALMINEN, S.; AHOKAS, J.T. Surface binding of aflatoxin B₁ by lactic acid bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 3086-3091, 2001.

HASSAN, Y.I.; BULLERMAN, L.B. Antifungal activity of *Lactobacillus paracasei* ssp. Tolerans isolated from a sourdough bread culture. **International Journal of Food Microbiolology**, v.121, p.112-115, 2008.

HASSAN, Y.I.; BULLERMAN, L.B. Cell-surface binding of deoxynivalenol to *Lactobacillus paracasei* subsp. tolerans isolated from sourdough starter culture. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 2, n. 5, p. 2323-2325, 2013.

HATAB, S.; YUE, T.; MOHAMAD, O. Reduction of patulin in aqueous solution by lactic acid bacteria. **Journal of Food Science**, v. 77, v. 238-241, 2012.

HAUGE, H.H.; MANTZILAS, D.; MOLL, G.N.; KONINGS, W.N.; DRIESSEN, A.J.M.; EIJSINK, V.G.H.; NISSEN-MEYER, J. Plantaricin A is an amphiphilic R-Helical bacteriocin-like pheromone which exerts antimicrobial and pheromone activities through different mechanisms. **Biochemistry**, v. 37, p. 16026-16032, 1998.

HERNANDEZ-MENDOZA, A.; GARCIA, H.S.; STEELE, J.I. Screening of *Lactobacillus casei* strains for their ability to bind aflatoxin B₁. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p. 1064-1068, 2009.

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

HOCKING, A.D.; PITT, J.I.; SAMSON, R.A.; THRANE, U. **Advances in Food Mycology**, 1ed. New York, USA: Springer Science Business Media, 2006, 372p.

HUEBNER, H.J., LEMKE, S.L., OTTINGER, S.E., MAYURA, K., PHILLIPS, T.D. Molecular characterization of high affinity, high capacity clays for the equilibrium sorption of ergotamine. **Food Additives and Contaminants**, v.16, p.159-171, 1999.

HUMPF, H.U.; VOSS, K.A. Effects of thermal food processing on the chemical structure and toxicity of fumonisin mycotoxins. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 48, p. 255-269, 2004.

HUSSEIN, H.S.; BRASEL, J.M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, p. 167, p. 101-134, 2001.

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

International Agency for Research on Cancer – IARC, 2002. Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene. Summary of Data Reported and Evaluation. Monographs Vol. 82. Lyon: IARC, p.171-300.

JACK, R.W.; TAGG, J.R.; RAY, B. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. **Microbiological Reviews**, v. 59, p. 171-200, 1995.

JOUANY, J.P. Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds. **Animal feed science and technology**. v. 137, n. 3, p. 342-362, 2007.

JUODEIKIENE, G.; BARTKIENE, E.; VISKELIS, P.; URBONAVICIENE, D.; EIDUKONYTE, D.; BOBINAS, C. Fermentation processes using lactic acid bacteria

producing bacteriocins for preservation and improving functional properties of food products. In: Petre, M. **Advances in applied biotechnology**. Rijeka, Croatia: InTech, 2012. p. 63-100. .
KARUNARATNE, A.; WEZCNBERG, E.; BULLERMAN, L.B. Inhibition of mold growth and aflatoxins production by *Lactobacillus* spp. **Journal of Food Protection**, v. 53, p. 230-236, 1990.

KAWASHIMA, L.M.; SOARES, L.M.V. Incidência de fumonisina B₁, aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, ocratoxina a e zearalenona em produtos de milho. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 516-521, 2006.

KEDERA, C.J.; PLATTNER, R.D.; DESJARDINS, A.E. Incidence of *Fusarium* spp. and levels of Fumonisin B₁ in maize in Western Kenya. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 41-44, 1999.

KHOURY A.EL.; ATOUI, A.; YAGHI, J. Analysis of aflatoxin M₁ in milk and yogurt and AFM₁ reduction by lactic acid bacteria used in Lebanese industry. **Food Control**, v. 22, p. 1695- 1699, 2011.

KONG, S.; DAVISON, A.J. The role of interactions between O₂, H₂, OH , e⁻ and O₂⁻ in free radical damage to biological systems. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 204, p. 18-29, 1980.

KROMBERG, J.G.R.; JENKINS, T. Common birth defects in South African blacks. **South African Medical Journal**, v. 62, p. 599-602, 1982.

LAFIS – Brasil: Agricultura Milho, 02/mai/2003 [on line]. Disponível em <http://www.lafis.com.br/site2002/portugues/produtos/estudos/demos/I055013P.DOC>.

LAITILA, A.; ALAKOMI, H.-L.; RAASKA, L.; MATTILA-SANDHOLM, T.; HAIKARA, A. Antifungal activities of two *Lactobacillus plantarum* strains against *Fusarium* moulds *in vitro* and in malting of barley. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, p. 566-576, 2002.

LAMIC - LABORATÓRIO DE ANÁLISES MICOTOXICOLÓGICAS, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil. Tabelas de resultados, 2011. Disponível em: <<http://www.lamic.ufsm.br>>.

LAVERMICOCCA, P.; VALERIO, F.; EVIDENTE, A.; LAZZARONI, S.; CORSETTI, A.; GOBBETTI, M. Purification and characterization of novel antifungal compounds from sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 4084-4090, 2000.

LEDOUX, D.R.; BROWN, T.P.; WEIBKING, T.S.; ROTTINGHAUS, G.E. Fumonisin toxicity in broiler chicks. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 4, p. 330-333, 1992.

LESLIE, J.F. Introductory biology of *Fusarium moniliforme*. In: JACKSON, L.S.; DE VRIES, J.W.; BULLERMAN, L.B. **Fumonisin in food**. New York: Plenum Press, 1996, p. 153-164.

LESLIE, J.F.; SUMMERELL, B.A. **The *Fusarium* laboratory manual**. Ames, Iowa: Blackwell Professional, 2006. 388 p.

LI, Z.; YANG, Z.B.; YANG, W.R.; WANG, S.J.; JIANG, S.Z.; WU, Y.B. effects of feed-borne fusarium mycotoxins with or without yeast cell wall adsorbent on organ weight, serum biochemistry, and immunological parameters of broiler chickens. **Poultry Science**, v. 91, p.2487-2495.

LINDGREN, S.E.; DOBROGOSZ, W.J. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 7, p. 149-163, 1990.

LOGRIECO, A.; MULÉ, G.; MORETTI, A.; BOTTALICO, A. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe. **European Journal of Plant Pathology**, v. 108, p. 597-609, 2002.

LORINI, I.; BACALTCHUK, B. **A qualidade desejada na armazenagem de grãos no país. Ambiente em Foco**, 2007. Disponível em: <<http://www.ambienteemfoco.com.br/?p=5019>>. Acesso em: 06 jan. 2014.

MAGAN, N.; OLSEN, M. **Mycotoxins in Food: Detection and control**. Cambridge, UK: Wood head Publishing Ltd., 2004. 461 p.

MAGNUSSON, J.; SCHNÜRER, J. *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. **Applied Environmental Microbiology**, v. 67, v. 1-5, 2001.

MALLMANN, C.A.; SANTURIO, J.M.; DILKIN, P. Equine leukoencephalomalacia associated with ingestion of corn contaminated with fumonisin B₁. **Revista de Microbiologia**, v. 30, p. 249-252, 1999.

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

MALLMANN, C.A.; DILKIN, P.; GIACOMINI, L.Z.; RAUBER, R.H. **Crêterios para sele o de um bom sequestrante para micotoxinas**. 2006. 20 p. Disponível em: <http://www.lamic.ufsm.br/papers/20060515_criterios.pdf>. Acesso em: 14 jun. 2014.

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

MARASAS, W.F.; RILEY, R.T.; HENDRICKS, K.A.; STEVENS, V.L.; SADLER, T.W.; GELINEAU-VAN WAES, J.; MISSMER, S.A.; CABRERA, J.; TORRES, O.; GELDERBLOM, W.C.; ALLEGOOD, J.; MARTINEZ, C.; MADDOX, J.; MILLER, J.D.; STARR, L.; SULLARDS, M.C.; ROMAN, A.V.; VOSS, K.A.; WANG, E.; MERRILL JÚNIOR, A.H. Fumonisin disrupt sphingolipid metabolism, folate transport, and neural tube development in embryo culture and *in vivo*: a potential risk factor for human neural tube defects among populations consuming fumonisin-contaminated maize. **Journal of Nutrition**, v. 134, n. 4, p. 711-716, 2004.

MARÍN, S.; COMPANYS, E.; SANCHIS V.; RAMOS, A.J. Effect of water activity and temperature on competing abilities of common maize fungi. **Mycological Research**, v. 120, p. 959-964, 1998.

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

MAUCH, A.; BELLO, F.D.; COFFEY, A.; ARENDT, E.K. The use of *Lactobacillus brevis* PS1 to *in vitro* inhibit the outgrowth of *Fusarium culmorum* and other common *Fusarium* species found on barley. **International Journal of Food Microbiology**, v. 141, 116-121, 2010.

MEGHARAJ, M.; GARTHWAITE, I.; THIELE, J.H. Total biodegradation of the oestrogenic mycotoxin zearalenone by a bacterial culture. **Letters in Applied Microbiology**, v. 24, p. 329-333, 1997

MELO FILHO, G. A.; RICHIETTI, A. Aspectos socioecon micos da cultura do milho. In: EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro de Pesquisa Agropecuarias do Oeste. **Milho: informa es técnicas**. Dourados, 1997. p. 13-38. (EMBRAPA-CPAO. Circular Técnica, 5).

MERRILL JÚNIOR, A.H.; SCHMELZ, E.M.; WANG, E.; DILLEHAY, D.L.; RICE, L.G MEREDITH, F.; RILEY, R.T. Importance of sphingolipids and inhibitors of sphingolipid metabolism as components of animal diets. **The Journal of Nutrition**, v. 127, p. 830-833, 1997.

MILLS, J.T. Ecology of mycotoxigenic *Fusarium* species on cereal seeds. **Journal of Food Protection**, v. 52, p. 737-742, 1989.

MISSMER, S.A.; SUAREZ, L.; FELKNER, M.; WANG, E.; MERRILL JÚNIOR, A.H.; ROTHMAN, J.; HENDRICKS, K.A. Exposure to *Fumonisin*s and the occurrence of neural tube defects along the Texas-Mexico boarder. **Environmental Health Perspectives**, v. 114, p. 237-241, 2006.

MOBIO, T.A.; ANANE, R.; BAUDRIMONT, I.; CARRATU, M.R.; SHIER, W.T.; DANO-DJEDJE, S.; UENO, Y.; CREPPY, E. E. Epigenetic properties of fumonisin B₁: cell cycle arrest and DNA base modification in C6 glioma cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 164, p. 91-96, 2000.

MOLIN, R. Micotoxinas em grãos: contaminantes naturais de alimentos e rações. In: MOLIN, R.; VALENTINI, M.L. **Simpósio Sobre Micotoxinas em Grãos**. São Paulo: Fundação Cargil, 1999.

MOORE, C.A.; LI, S.; LI, Z.; HONG, S.X.; GU, H.Q.; BERRY, R.J.; MULINARE, J.; ERICKSON, J.D. Elevated rates of severe neural tube defects in a high-prevalence area in Northern China. **American Journal of Medical Genetics**, v. 73, n. 2, p. 113-118, 1997.

MORENO, E.C.; GARCIA, G.T.; ONO, M.A.; VIZONI, E.; KAWAMURA, O.; HIROOKA, E.Y.; ONO, E.Y.S. Cooccurrence of mycotoxins in corn samples from the Northern region of Paraná State, Brazil. **Food Chemistry**, v. 116, p. 220-226, 2009.

MOTOMURA, M.; HIROOKA, E.Y. Micro-organismos produtores de substâncias antifúngicas com perspectivas para aplicação no controle de *Fusarium moniliforme*. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 39, p. 471-479, 1996.

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

MURPHY, P.A.; HENDRICH, S.; LANDGREN, C.; BRYANT, C.M. Food mycotoxins: An update. **Journal of Food Science**, v. 71, p. 51-65, 2006.

NCAIYANA, D.J. Neural tube defects among rural blacks in a Transkei district. A preliminary report and analysis. **South African Medical Journal**, v. 69, n. 10, p. 618-620, 1986.

NIDERKORN, V.; BOUDRA, H.; MORGAVI, D.P. Binding of *Fusarium* mycotoxins by fermentative bacteria *in vitro*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 101, p. 849-856, 2006.

NIDERKORN, V.; MORGAVI, D.; ABOAB, B.; LEMAIRE, M.; BOUDRA, H. Cell wall component and mycotoxin moieties involved in binding of fumonisin B₁ and B₂ by lactic acid bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, p. 977-985, 2009.

NISSEN-MEYER, J.; NES, I.F. Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: their function, structure, biogenesis, and mechanism of action. **Archives of Microbiology**, v. 167, p. 67-77, 1997.

NORRED, P.; VOSS, K.A. Toxicity and role of fumonisins in foods. **Food Research International**, v. 37, p. 522-527, 1994.

OLIVEIRA, P.; BROSNAN, B.; JACOB, F.; FUREY, A.; COFFEY, A.; ZANNINIA, E.; ARENDT, E.K. Lactic acid bacteria bioprotection applied to the malting process. Part II: Substrate impact and mycotoxin reduction. **Food Control**, v.51, p.444-452, 2015.

ONILUDE, A.A.; FAGADE, O.E.; BELLO, M.M.; FADAHUNSI, I.F. Inhibition of aflatoxin-producing aspergilli by lactic acid bacteria isolates from indigenously fermented cereal gruels. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 12, p. 1404-1408, 2005.

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

ONO, E.Y.S.; FUNGARO, M.H.P.; SOFIA, S.H.; FIGUEIRA, E.L.Z.; GERAGE, A.C.; ICHINOE, M.; SUGIURA, Y.; UENO, Y.; HIROOKA, E.Y. Trends of fumonisin contamination and animal intoxication through monitoring 1991 to 1997 corn crop in the State of Paraná, Brazil. **Mycopathologia**, v. 158, p. 451-455, 2004

ONO, E.Y.S.; SILVA, M.; ONO, M.A.; VIZONI, E.; GARCIA, G.T.; KAWAMURA, O.; SABINO, M.; SUGIURA, Y.; HIROOKA, E.Y. Implication of pre-drying steps with natural fumonisin contamination levels in freshly harvested corn. **World Mycotoxin Journal**, v. 1, n. 3, p. 341-347, 2008.

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

OSWEILER, G.D.; ROSS, P.F.; WILSON, T.M.; NELSON, P.E.; WITTE, S.T.; CARSON, T.L.; RICE, L.G.; NELSON, H.A. Characterization of an epizootic of pulmonary edema in swine associated with fumonisin in corn screenings. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 4, p. 53-59, 1992.

OUWEHAND, A.C.; SALMINEN, S.; TOLKKO, S.; ROBERTS, P.; OVASKA, J.; SALMINEN, E.: Resected human colonic tissue: new model for characterizing adhesion on lactic acid bacteria. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, p. 184-186, 2002.

PAES, M.C.D. Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão de milho. In: EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo. **Cultivo do milho: A cultura do milho**. Sete Lagoas, MG: Embrapa Milho e Sorgo, 2006. 6p. (EMBRAPA. Circular Técnica, 75).

PARK, D.L. Controlling aflatoxin in food and feed. **Food technology**, v. 47, p. 92-96, 1993.

PERAICA, M.; DOMIJAN, A.M.; FUCHS, R.; LUCIC, A.; RADIC, B. The occurrence of ochratoxin A in blood in general population of Croatia. **Toxicology Letters**, v. 110, p. 105-112, 1999.

PIARD, J.C.; DESMAZEAUD, M. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. Oxygen metabolites and catabolism end-products. **Le Lait**, v. 71, p. 525-541, 1991.

PIZZOLITTO, R.P.; SALVANO, M.A.; DALCERO, A.M. Analysis of fumonisin B₁ removal by microorganisms in co-occurrence with aflatoxin B₁ and the nature of the binding process. **International Journal of Food Microbiology**, v. 156, p. 214-221, 2012.

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

PLOCKOVA, M.; STILES, J.; CHUMCHALOVA, J. Control of mould growth by *Lactobacillus rhamnosus* VT1 and *Lactobacillus reuteri* CCM 3625 on milk agar plates. **Czech Journal of Food Science**, v. 19: p. 46-50, 2001.

POMERANZ, Y.I.; BECHTEL, D.B.; SAUER, D.R.; SEITZ, L.M. Fusarium Headblight (scab) in Cereal Grain. In: Y. Pomeranz (Ed.). **Advances in Cereal Science and Technology**. St.Paul: AACC, 1990. v.10, p. 373-473

POZZI, C.R.; ARCARO, J.R.P.; JÚNIOR, I.A.; FAGUNDES, H., CORRÊA, B. Aspectos relacionados à ocorrência e mecanismo de ação das fumonisinas. **Ciência Rural**, v. 32, p. 901-907, 2002.

RAJENDRAN, R.; OHTA, Y. Binding of heterocyclic amines by lactic acid bacteria from miso, a fermented Japanese food. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 44, p. 109-115, 1998.

REDDY, K.R.N.; NURDIJATI, S.B.; SALLEH, B. An overview of plant-derived products on control of mycotoxigenic fungi and mycotoxins. **Asian journal of plant sciences**, v. 9, p. 126-122, 2010.

REED, S.M.; BAYLY, W.M. **Medicina interna equina**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 864-865.

RHEEDER, J.P.; MARASAS, W.F.O.; THIEL, P.G.; SYDENHAM, E.W.; SHEPHARD, G. G.; SCHALKWYK, D.J.V. *Fusarium moniliforme* and fumonisins in corn in relation to human esophageal cancer in Transkei. **Phytopathology**, v. 82, p. 353-357, 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.

RILEY, R.T.; WANG, E.; SCHROEDER, J.J.; SMITH, E.R.; PLATTNER, R.D.; ABBAS, H.; YOO, H.S.; MERRILL JÚNIOR, A.H. Evidence for disruption of sphingolipid metabolism as a contributing factor in the toxicity and carcinogenicity of fumonisins. **Natural Toxins**, v. 4, p. 3-15, 1996.

RILEY, R.T.; NORRED, W.P. Mycotoxin prevention and decontamination: a case study on maize. **Food, Nutrition and Agriculture**, v. 23, p. 31-36, 1999.

RILEY, R.T.; ENONGENE, E.; VOSS, K.A.; NORRED, W.P.; MEREDITH, F.I.; SHARMA, R.P.; SPITSBERGEN, J.; WILLIAMS, D.E.; CARLSON, D.B.; MERRILL JÚNIOR, A. H. Sphingolipid perturbations as mechanisms for fumonisin carcinogenesis. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, n. 2, p. 301-308, 2001.

ROCHA, L.O.; NAKAI, V.K.; BRAGHINI, R.; REIS, T.A.; KOBASHIGAWA, E.; CORRÊA, B. Mycoflora and co-occurrence of fumonisins and aflatoxins in freshly harvested corn in different regions of Brazil. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, p. 5090-5103, 2009.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Occurrence of micotoxins and micotoxin-producing fungi in Latin America. In: DE KOE, W.J.; SAMSON, R.A.; VAN EGMOND, H.P.; GILBERT, J.; SABINO, M. **Mycotoxins and phycotoxins in perspective at the turn of the millennium**. Wageningen: Ponsen and Looyen, 2000. p. 309-320

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

ROUSE, S.; HARNETT, D.; VAUGHAN, A.; VAN SINDEREN, D. Lactic acid bacteria with potential to eliminate fungal spoilage in foods. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, p. 915-923, 2008.

SANZ, B.; SELGAS, D.; PAREJO, I.; ORDONEZ, J.A. Characteristics of lactobacilli isolated from dry fermented sausages. **International Journal of Food Microbiology**, v. 6, p. 199-205, 1988

SATHE, S.J.; NAWANI, N.N.; DHAKEPHALKAR, P.K.; KAPADNIS, B.P. Antifungal lactic acid bacteria with the potential to prolong shelf – life of fresh vegetables. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, p. 2622-2628, 2007.

SAXELIN, M.; TYNKKYNNEN, S.; MATTILA-SANDHOLM, T.; de VOS, W.M. Probiotic and other functional microbes: from markets to mechanisms. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 16: p. 204-211, 2005.

SCHNÜRER, J.; MAGNUSSON, J. Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. **Trends in Food Science and Technology**, v. 16, p. 70-78, 2005.

SEEFELDER, W.; KNECHT, A.; E HUMPT, H.–U. Bound fumonisin B₁ analysis of fumonisin-B₁ glyco and amino acid conjugates by Liquid Chromatography – Electrospray Ionization – Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 151, p. 5567-5573, 2003.

SHARMA, R.R.; SINGH, D.; SINGH, R. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. **Biological Control**, v. 50, n. 3, p. 205-221, 2009.

SINDIRAÇÕES. Sindicato Nacional da Indústria de Alimentação animal. **Boletim Informativo**. Setor de alimentação animal. Setembro de 2014.

SHEPHARD, G.S.; THIEL, P.G.; STACKENSTROM, S.; SYDENHAM, E.W. Worldwide survey of fumonisin contamination of corn and corn-based products. **Journal of Association of Official Analytical Chemists**, v. 79, p. 671-687, 1996.

SHEPHARD, G.S.; VAN DER WESTHUIZEN, L.; THIEL, P.G.; GELDERBLUM, W.C.A.; MARASAS, W.F.O.; VAN SCHALKWYK, D. J. Disruption of sphingolipid metabolism in non-human primates consuming diets of fumonisin-containing *Fusarium moniliforme* culture material. **Toxicon**, v. 34, n. 5, p. 527-534, 1996

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

SHETTY, P.H.; JESPERSEN, L. *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents. **Trends in Food Science and Technology**, v. 17, p. 48-55, 2006.

SJÖGREN, J.; MAGNUSSON, J.; BROBERG, A.; SCHNÜRER, J.; KENNE, L. Antifungal 3- hydroxy fatty acids from *Lactobacillus plantarum* MiLAB 14. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 7554-7557, 2003.

SMITH, J.E.; MOSS, M.O. **Mycotoxins formation, analysis and significance**. Great Britain: John Wiley & Sons Ltd., 1985. 148 p.

SMITH, T.K.; SEDDON, I.R. Toxicological synergism demonstrated between *Fusarium* mycotoxins in feeds. **Feedstuffs**, p. 12-17, 1998.

SORIANO, J.M.; DRAGACCI, S. Intake, decontamination and legislation of fumonisins in foods. **Food Research International**, v. 37, p. 367-374, 2004.

SORIANO, J.M.; GONZÁLEZ, L.; CATALÁ, A.I. Mechanism of action on sphingolipids and their metabolites in the toxicity of fumonisin B₁. **Progress in Lipid Research**, v. 44, p. 345-56, 2005.

STILES, J.; BULLERMAN, L.B. Inhibition of *Fusarium* species and mycotoxin production by *Bacillus pumilus* NEB1 and *Lactobacillus rhamnosus* VT1. In: **13th International Reinhardtsbrunn Symposium on Modern Fungicides and Antifungal Compounds III**. 14-18., 2001, Germany. Germany: Deutsche Phyto-medizinische Gesellschaft – Selbstverlag, 2002.

STOYANOVA, L.G.; USTYUGOVA, E.A.; NETRUSOV, A.I. Antibacterial metabolites or lactic acid bacteria: their diversity and properties. **Applied Biochemistry and Microbiology** v. 48, p. 229-243, 2011.

SUN, G.; WANG, S.; HU, X.; SU, J.; HUANG, T.; YU, J.; TANG, L.; GAO, W.; WANG, J.S. Fumonisin B₁ contamination of home-grown corn in high-risk areas for esophageal and liver cancer in China. **Food Additives and Contaminants**, v.24, p.181-185, 2007.

SWEENEY, J.; DOBSON, A. D. W. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. **International Journal of Food Microbiology**, v. 43, p. 141-158, 1998.

SYDENHAM, E.W.; THIEL, P.G.; MARASAS, W.F.O.; SHEPHARD, G.S.; Van SCHALKWYK, D.J.; KOCH, K.R. Natural occurrence of some *Fusarium* mycotoxins in corn from low and high esophageal cancer prevalence areas of the Transkei, Southern Africa. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 38, n. 10, p. 1900-1903, 1990.

SYDENHAM, E.W., SHEPHARD, G.S., THIEL, P.G., MARASAS, W.F.O., RHEEDER, J.P., SANHUEZA, C.E.P., GONZÁLEZ, H.H.L.; RESNICK, S.L. Fumonisin in argentinian field-trial corn. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, p. 891-895, 1993.

TALARICO, T.L.; CASAS, I.A.; CHUNG, T.C.; DOBROGOSZ, W.J. Production and isolation of reuterin, a growth inhibitor produced by *Lactobacillus reuteri*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 32, p. 1854-1858, 1988.

TALARICO, T.L.; DOBROGOSZ, W.J. Chemical characterization of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus reuteri*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 33, p. 674-679, 1989.

THEUMER, M.G.; CANEPA, M.C.; LOPEZ, A.G.; MARY, V.S.; DAMBOLENA, J.S.; RUBINSTEIN, H.R. Subchronic mycotoxicoses in Wistar rats: assessment of the in vivo and in vitro genotoxicity induced by fumonisins and aflatoxin B₁, and oxidative stress biomarkers status. **Toxicology**, v. 268, p. 104-110, 2010.

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

TSENG, T-C.; LIU, C-Y. Occurrence of fumonisin B₁ in maize imported into Taiwan. **International Journal of Food Microbiology**, v. 65, p. 23-26, 2001.

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 surveys of fumonisins in corn and corn-based products in Asian Countries. **Mycotoxin Research**, v. 9, p. 27-34, 1993.

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

VIQUEZ, O.M.; CASTELL-PEREZ, M.E.; SHELBY, R.A. Occurrence of Fumonisin B₁ in Maize Grown in Costa Rica. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 2789-2791, 1996.

VISCONTI, A.; DOKO, M.B.; SCHURER, B.; BOENKE, A. Intercomparison study for the analysis of fumonisins B₁ and B₂ in an unknown solution. In: **Proceedings of the United Kingdom Workshop on Occurrence and Significance of Mycotoxins**. Slough, United Kingdom, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Central Science Laboratory, 1993. p. 200-202.

VOULGARI, K.; M. HATZIKAMARI, A.; DELEPOGLOU, P.; GEORGAKOPOULOS, E.; LITOPOULOU- TZANETAKI, TZANETAKIS, N. Antifungal activity of non-starter lactic acid bacteria isolates from dairy products. **Food Control**, v. 21, p. 136-142, 2010.

WANG, H.; WEI, H.; MA, J.; LUO, X. The fumonisin B₁ content in corn from North China, a high-risk area of oesophageal cancer. **Journal of Environmental Pathology Toxicology and Oncology**, v.19, p. 139-141, 2000.

WESTBY, A.; REILLY, A.; BAINBRIDGE, Z. Review of the effect of fermentation on naturally occurring toxins. **Food Control**, v. 8, n.5/6, p. 329-339, 1997.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Environmental health criteria 219 - fumonisin B₁. International programme on chemical safety. Geneva: World Health Organization; 2000.

WOOD, B.J.B.; HOLZAPFEL, W.H. **The Genera of Lactic Acid Bacteria**. Glasgow, UK: Blackie Academic and Professional, 1995. 398 p.

WU, Q.; JEZKOVA, A.; YUAN, Z.; PAVLIKOVA, L.; DOHNAL, V.; KUCA, K. Biological degradation of aflatoxins. **Drug Metabolism Reviews**, v. 41, n. 1, p. 1-7, 2009.

XIAO, K.Z.; ZHANG, Z.Y.; SU, Y.M.; LIU, F.Q.; YAN, Z.Z.; JIANG, Z.Q.; ZHOU, S.F.; HE, W.G.; WANG, B.Y.; JIANG, H.P. Central nervous system congenital malformations, especially neural tube defects in 29 provinces, metropolitan cities and autonomous regions of China: Chinese Birth Defects Monitoring Program. **International Journal of Epidemiology**, v. 19, n. 4, p. 978-982, 1990.

YANG, E.J.; CHANG, H. C. Purification of a new antifungal compound produced by *Lactobacillus plantarum* AF₁ isolated from kimchi. **International Journal of Food Microbiology**, v. 139, p. 56-63, 2010.

YOSHIZAWA, T.; YAMASHITA, A.; LUO, Y. Fumonisin occurrence in corn from high- and low risk areas for human esophageal cancer in China. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 1626-1629, 1994.

ANEXOS

ANEXO A – Considerações sobre Escala nefelométrica de Mc Farland

A escala nefelométrica de Mc Farland é um padrão de turvação utilizado para determinar a intensidade da multiplicação em meios de cultivo líquidos. Esta multiplicação se manifesta nos meios líquidos por aumento das partículas (bactérias) que se opõe a livre passagem da luz, ocasionando na turvação do meio. Quanto maior o número de células, maior será a turvação do meio.

A escala consiste em uma série de 11 tubos numerados de 0,5 a 10, com diferentes volumes de BaCl₂ (1%) e H₂SO₄ (1%). Assim obtém-se uma série de tubos contendo uma suspensão com turbidez crescente de acordo com a quantidade de BaSO₄ formado, como demonstrado na Tabela a seguir:

Tabela – Valores correspondentes a escala de Mc farland em relação ao número do tubo, concentração bacteriana em unidade formadoras de colônia por mL, composição do tubo e os valores correspondentes de absorvância para cada padrão.

Nº da escala	Composição em mL		Concentração bacteriana/ mL	Padrão de absorvância (Densidade ótica)
	BaCl ₂ (1%)	H ₂ SO ₄ (1%)		
0,5	0,05	9,95	1,5 x 10 ⁸	0,159
1	0,10	9,90	3,0 x 10 ⁸	0,334
2	0,20	9,80	6,0 x 10 ⁸	0,630
3	0,30	9,70	9,0 x 10 ⁸	0,750
4	0,40	9,60	1,2 x 10 ⁹	0,855
5	0,50	9,50	1,5 x 10 ⁹	1,259
6	0,60	9,40	1,8 x 10 ⁹	1,470
7	0,70	9,30	2,1 x 10 ⁹	1,730
8	0,80	9,20	2,4 x 10 ⁹	1,920
9	0,90	9,10	2,7 x 10 ⁹	2,070
10	1,00	9,00	3,0 x 10 ⁹	2,180

Fonte: BIER (1990); AVELLAR (2006)

ANEXO B – Composição do caldo MRS

Composição g/L	
Peptona protease	10,00
Extrato de carne	10,00
Extrato de levedura	5,00
Dextrose	20,00
Polisorbato 80	1,00
Citrato de amônio	2,00
Acetato de sódio	5,00
Sulfato de magnésio	0,10
Sulfato de manganês	0,05
Fosfato dipotássico	2,00

pH: 6,5 ±0,2

A peptona protease, o extrato de carne e o extrato de levedura são as fontes de carbono, nitrogênio e vitaminas necessárias para satisfazer os requisitos gerais de crescimento da bactéria. A dextrose é o carboidrato fermentescível e o polisorbato 80 fornece os ácidos graxos requeridos para o metabolismo dos Lactobacilos. O acetato de sódio e o citrato de amônio inibem o crescimento de alguns micro-organismos.