



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

ALINE MYUKI OMORI

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO IMUNOLÓGICO PARA
DETECÇÃO DE *FUSARIUM VERTICILLIOIDES* EM RAÇÃO
DE AVES**

ALINE MYUKI OMORI

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO IMUNOLÓGICO PARA
DETECÇÃO DE *FUSARIUM VERTICILLIOIDES* EM RAÇÃO
DE AVES**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Patologia Experimental.

Orientador: Prof. Dr. Mario Augusto Ono

Londrina
2013

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

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

O56d Omori, Aline Myuki.

Desenvolvimento de método imunológico para detecção de *Fusarium verticillioides* em ração de aves / Aline Myuki Omori. – Londrina, 2013.
79 f. : il.

Orientador: Mario Augusto Ono.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2013.

Inclui bibliografia.

1. Fungos toxigênicos – Teses. 2. Fusário – Teses. 3. Anticorpos policlonais – Teses. 4. Técnicas imunoenzimáticas – Teses. 5. Rações – Teses. I. Ono, Mario Augusto. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. III. Título.

CDU 616-092

ALINE MYUKI OMORI

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO IMUNOLÓGICO PARA
DETECÇÃO DE *FUSARIUM VERTICILLIOIDES* EM RAÇÃO DE AVES**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Patologia Experimental.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Mario Augusto Ono
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Maria Angélica Ehara Watanabe
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Itabajara da Silva Vaz Junior
Universidade Federal do Rio Grande do Sul -
UFRGS

Londrina, 8 de março de 2013.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Mário e Angelina e ao meu irmão, Marcel.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Mario Augusto Ono pela oportunidade, orientação, paciência, dedicação, ensinamentos e sugestões indispensáveis para a realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação Araucária pelo apoio financeiro e concessão de bolsas de estudo.

À professora Dra. Elisabete Sataque Yurie Ono pela orientação e ensinamentos sobre os fungos do gênero *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium* e sobre as técnicas microbiológicas e bioquímicas; pelo fornecimento de exoantígenos das diferentes espécies e isolados fúngicos e de amostras de ração; pela disponibilidade, prestatividade, paciência e valiosas sugestões e pelas correções no Exame de Qualificação.

À professora Dra. Elisa Yoko Hirooka pelo fornecimento do isolado 97K de *Fusarium verticillioides*.

Ao professor Dr. João Waine Pinheiro pelo fornecimento de galinhas poedeiras.

À professora Dra. Maria Angélica Ehara Watanabe pelas correções e sugestões no Exame de Qualificação.

Aos técnicos de laboratório: Nelson Janeiro Rodriguez do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia e Nilson Jesus Carlos do Departamento de Ciências Patológicas pela colaboração, ensinamentos e auxílio na realização dos experimentos.

Ao funcionário do Hospital Universitário de Londrina e colega de laboratório, Donizete Rodrigues Belitardo, e aos ex-colegas de laboratório, Melina Bertolla Galvão e Atilio Sersun Calefi, pela colaboração e auxílio na imunização dos animais.

Aos colegas e ex-colegas de laboratório: Gabriela Gonçalves de Oliveira, Donizete Rodrigues Belitardo, Tatiane Ferreira Petroni, Jaqueline Bueno, Juliana Fritzen, Atilio Sersun Calefi,

Melina Bertolla Galvão, Isabele Kazahaya Borges, Aline Cavalcante do Amaral, Tatiana Reichert Assunção, Carolina Nachi Rossi, Igor Sugiura, Maria Luiza Azevedo, Mônica Raquel Sbeghen, Rafaela Macagnan, Giovana Gomes de Carvalho pelo companheirismo e colaboração. E em especial, às mestrandas em Biotecnologia, Carolina Nachi Rossi e Jaqueline Gozzi Bordini pela contribuição direta no desenvolvimento do trabalho através de ensinamentos e auxílio na realização dos experimentos.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental pela dedicação e ensinamentos.

Aos colegas de curso pelo companheirismo e auxílio durante as Disciplinas.

Aos meus pais, Mário e Angelina e ao meu irmão, Marcel, pelo carinho, companheirismo e incentivo em todos os momentos.

A Deus pela força e auxílio nos momentos difíceis.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

“Se vi mais longe, foi por estar de pé sobre ombros de gigantes.”

Isaac Newton

OMORI, Aline Myuki. **Desenvolvimento de Método Imunológico para Detecção de *Fusarium verticillioides* em ração de aves**. 2013. 79f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

RESUMO

O fungo *Fusarium verticillioides* é um patógeno primário de milho capaz de produzir diversas micotoxinas causando prejuízos econômicos e problemas à saúde humana e animal. Assim, é necessário o desenvolvimento de métodos para detectar esse fungo e fazer o controle de qualidade dos produtos à base de milho. Os métodos tradicionais de identificação e detecção geralmente consomem muito tempo e apresentam baixa especificidade e reprodutibilidade. A detecção de exoantígeno por meio de métodos imunológicos é uma alternativa rápida e sensível. O objetivo deste trabalho, portanto, foi desenvolver um método imunológico para detectar *F. verticillioides* em amostras de ração de aves. Inicialmente, anticorpos policlonais IgY contra exoantígeno de *F. verticillioides* 97K foram produzidos em galinhas e caracterizados por ELISA (“Enzyme-linked immunosorbent assay”) e “Western blot”. O anticorpo IgY reagiu com o exoantígeno de *F. verticillioides* 97K, porém apresentou reatividade cruzada com exoantígeno de outras espécies fúngicas. A análise da reatividade do anticorpo com exoantígeno de diferentes isolados de *F. verticillioides* por “Western Blot” mostrou que duas proteínas, de massas moleculares de 67 kDa e 113 kDa, foram reconhecidas em todos os exoantígenos dos diferentes isolados e portanto, apresentam potencial para serem antígenos espécie-específicos. Assim, visando anticorpos mais específicos, anticorpos policlonais de coelho contra a proteína de 67 kDa do exoantígeno de *F. verticillioides* 97K foram produzidos e caracterizados. Este anticorpo apresentou menor reatividade cruzada com exoantígeno de outras espécies fúngicas e foi utilizado na detecção de exoantígeno de *F. verticillioides* em amostras de ração por meio de ELISA competitivo indireto com limite de detecção de 0,029 µg/mL. A concentração de exoantígeno determinada por este método imunoenzimático apresentou forte correlação positiva com a concentração de fumonisina determinada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência na ração com coeficiente de correlação de Pearson de 0,76, sugerindo que o ELISA competitivo indireto desenvolvido neste estudo tem potencial para ser utilizado na imunodetecção de *F. verticillioides* em amostras de ração de aves

Palavras-chaves: *Fusarium verticillioides*. Exoantígeno. Anticorpos policlonais. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Imunodetecção.

OMORI, Aline Myuki. **Development of Immunological Method for Detection of *Fusarium verticillioides* in poultry feed**. 2013. 79p. Dissertation (Master's degree in Experimental Pathology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

ABSTRACT

The fungus *Fusarium verticillioides* is a primary corn pathogen, it is capable to produce several mycotoxins, causing economic losses and health problems in humans and animals. Therefore, the development of methods to detect this fungus and to make the quality control of the products derivative from maize is necessary. The traditional methods of identification and detection are usually time consuming and present low specificity and reproducibility. The detection of exoantigen by immunological methods is a rapid and sensitive alternative. Thus, the objective of this study was to develop an immunological method to detect *F. verticillioides* in poultry feed samples. Initially, polyclonal antibodies of laying hens against *F. verticillioides* exoantigen were produced and characterized by ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) and “Western blot”. These antibodies reacted with the *F. verticillioides* exoantigen, however showed cross-reactivity with exoantigens from other fungal species. The analysis of the reactivity with exoantigen of different *F. verticillioides* isolates by “Western blot” showed that two bands, which present molecular weights of 67 kDa and 113 kDa, were recognized in all different isolates exoantigens and therefore, they present potential to be specie-specific antigens. In order to produce more specific antibodies, polyclonal antibodies of rabbit against the 67 kDa protein of *F. verticillioides* exoantigen were produced and characterized. These antibodies presented less cross-reactivity with other fungal species exoantigen and was used for detection of *F. verticillioides* exoantigen in feed samples by indirect competitive ELISA with detection limit of 0,029 µg/mL. The exoantigen concentration determined by this immunoenzymatic method presented high positive correlation with the fumonisin concentration determined by High Performance Liquid Chromatography in feed with Pearson's correlation coefficient of 0,76, suggesting that indirect competitive ELISA developed in this study has potential to be used in immunodetection of *F. verticillioides* in poultry feed samples.

Keywords: *Fusarium verticillioides*. Exoantigen. Polyclonal antibodies. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Immunodetection.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 -** Espécie de *Fusarium* em microscopia óptica produzindo macroconídios septados (A), microconídios (B) e clamidósporos (C)..... 16
- Figura 2 -** Apodrecimento moderado (A) e grave (B) da espiga e da base do caule do milho (C) causado por *F. verticillioides*..... 17
- Figura 3 -** Estrutura química da FB₁ e dos principais metabólitos dos esfingolípideos 20
- Figura 4 -** Amostragem da ração destinada à alimentação de galinhas poedeiras..... 35
- Figura 5 -** Perfil eletroforético do exoantígeno de *F. verticillioides* 97K: (1) Padrão de massa molecular; (2) 3µg; (3) 5µg; (4) 7µg de exoantígeno..... 39
- Figura 6 -** Reatividade da IgY das galinhas poedeiras ao exoantígeno de *F. verticillioides* 97K avaliada por ELISA indireto 40
- Figura 7 -** Resposta da galinha Fus3 às imunizações avaliada por ELISA indireto utilizando IgY na diluição 1:200 e exoantígeno de *F. verticillioides* 97K a 12,5 µg/mL. As setas indicam as semanas em que foram aplicadas as doses de exoantígeno de *F. verticillioides* 97K na galinha 41
- Figura 8 -** Perfil eletroforético da IgY extraída da gema da galinha Fus3: (1) Padrão de massa molecular; (2) 50µg; (3) 30 µg; (4) 20 µg; (5) 10 µg de IgY..... 42
- Figura 9 -** Reatividade do anticorpo anti-97K contra exoantígeno de *F. verticillioides* 97K avaliada por “Western blot”: (1) Padrão de massa molecular; (2) Exoantígeno de *F. verticillioides* 97K 43

Figura 10 -	Reatividade dos anticorpos policlonais IgY pré-imune e imune contra exoantígenos de outras espécies fúngicas avaliada por ELISA indireto.....	45
Figura 11 -	Reatividade da IgY anti-97K contra exoantígenos de diferentes espécies fúngicas analisada por “Western blot”: (1) Padrão de massa molecular; (2) <i>F. verticillioides</i> 97K; (3) <i>F. subglutinans</i> ; (4) <i>F. sporotrichioides</i> ; (5) <i>F. graminearum</i> ; (6) <i>A. flavus</i> ; (7) <i>A. niger</i> ; (8) <i>A. ochraceus</i> ; (9) <i>P. brevicompactum</i> ; (10) <i>P. purpurogenum</i>	46
Figura 12 -	Reatividade da IgY anti-97K contra exoantígenos de diferentes isolados de <i>F. verticillioides</i> avaliada por “Western blot”: (1) Padrão de massa molecular; (2) 97K; (3) 119Br; (4) 104Ga; (5) 164G ; (6) 103Br.....	49
Figura 13 -	Resposta do coelho às imunizações com a proteína de 67 kDa avaliada por ELISA indireto utilizando soros nas diluições 1:400 e 1:800 e exoantígeno de <i>F. verticillioides</i> 97K bruto. As setas indicam as semanas em que foram aplicadas as doses da proteína no coelho	50
Figura 14 -	Resposta imune humoral do coelho à imunização com a proteína de 67 kDa avaliada por ELISA indireto utilizando soro na diluição 1:400 e proteína de 67 kDa purificada. As setas indicam as semanas em que foram aplicadas as doses da proteína no coelho	51
Figura 15 -	Reatividade da IgG de coelho anti-proteína de 67 kDa às proteínas do exoantígeno de <i>F. verticillioides</i> 97K bruto em diferentes concentrações avaliada por “Western blot”: Concentrações do exoantígeno – (1) Padrão de massa molecular; (2) 50µg/mL; (3) 35µg/mL; (4) 17µg/ML.....	52
Figura 16 -	Reatividade da IgG de coelho pré-imune e imune contra o exoantígenos de outras espécies fúngicas avaliada por ELISA indireto.....	54
Figura 17 -	Relação entre a reatividade dos anticorpos imune e pré-imune contra o exoantígenos de diferentes espécies fúngicas	55

- Figura 18 -** Reatividade da IgG de coelho aos exoantígenos de *F. verticillioides* 97K e de outras espécies fúngicas avaliada por “Western blot”: (1) Padrão de massa molecular; (2) *F. verticillioides* 97K; (3) *F. subglutinans*; (4) *F. sporotrichioides*; (5) *F. graminearum*; (6) *A. flavus*; (7) *A. niger*; (8) *A. ochraceus*; (9) *P. brevicompactum*; (10) *P. purpurogenum*..... 56
- Figura 19 -** Reatividade do soro de coelho pré-imune (acima) e imune (abaixo) contra exoantígenos de diferentes isolados de *F. verticillioides* avaliada por “Western blot”: (1) Padrão de massa molecular; (2) 97K; (3) 119Br; (4) 103Br; (5) 164G; (6) 104Ga..... 58
- Figura 20 -** Curva de calibração do exoantígeno no ELISA competitivo indireto. A seta indica o limite de detecção do ELISA competitivo indireto (0,029 µg/mL) para o exoantígeno de *F. verticillioides*..... 59
- Figura 21 -** Correlação entre a contagem de *Fusarium* spp. e a concentração de exoantígeno de *F. verticillioides* em amostras de ração à base de milho (n=81 e coeficiente de correlação de Pearson = 0,29) (Programa: Statistica 7.0)..... 63
- Figura 22 -** Correlação entre a concentração de exoantígeno e de fumonisinas em amostras de ração à base de milho (n=81), sendo o coeficiente de correlação de Pearson igual a 0,76 (Programa: Statistica 7.0)..... 63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Composição da ração utilizada na alimentação de galinhas poedeiras em diferentes períodos de 2010	34
Tabela 2 -	Reatividade cruzada da IgY de galinha anti-exoantígeno de <i>F. verticillioides</i> 97K com exoantígenos de outras espécies fúngicas avaliada por ELISA indireto	44
Tabela 3 -	Massa molecular aparente das proteínas reconhecidas pela IgY anti-exoantígeno de <i>F. verticillioides</i> 97K nos exoantígenos de diferentes fungos analisados	47
Tabela 4 -	Reatividade cruzada da IgG de coelho anti-proteína de 67 kDa do exoantígeno de <i>F. verticillioides</i> 97K com exoantígenos de outras espécies fúngicas avaliada por ELISA indireto	54
Tabela 5 -	Massa molecular aparente das proteínas reconhecidas pelo anticorpo de coelho anti-proteína de 67 kDa do exoantígeno de <i>F. verticillioides</i> 97K nos exoantígenos de diferentes fungos analisados	57
Tabela 6 -	Contagem de <i>Fusarium</i> spp., nível de fumonisinas e exoantígeno em 81 amostras de ração à base de milho	61
Tabela 7 -	Nível de contaminação por <i>Fusarium</i> spp. em 81 amostras de ração à base de milho	61

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	15
2.	OBJETIVOS	24
2.1	OBJETIVOS GERAIS	24
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1	CULTURAS FÚNGICAS	25
3.2	OBTENÇÃO DE EXOANTÍGENOS.....	25
3.2.1	Exoantígeno de <i>F. Verticillioides</i> 97K.....	25
3.2.2	Outros Exoantígenos.....	26
3.3	DOSAGEM DE PROTEÍNAS DOS EXOANTÍGENOS, DA PROTEÍNA PURIFICADA E DOS ANTICORPOS	26
3.4	DETERMINAÇÃO DO PADRÃO PROTEICO DOS EXOANTÍGENOS E DOS ANTICORPOS	26
3.5	IMUNIZAÇÃO DE GALINHAS POEDEIRAS.....	27
3.6	TITULAÇÃO DOS SOROS DAS GALINHAS.....	27
3.7	AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE DAS GEMAS	28
3.8	EXTRAÇÃO DE IGY DA GEMA	28
3.9	AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE DA IGY EXTRAÍDA.....	29
3.9.1	ELISA Indireto.....	29
3.9.2	“Western Blot”.....	29
3.10	IMUNIZAÇÃO DE COELHO.....	30
3.11	AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE DOS SOROS DO COELHO.....	31
3.11.1	ELISA Indireto.....	31
3.11.2	“Western Blot”.....	32
3.12	PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA DE 67 KDA DO EXOANTÍGENO <i>DE F.</i> <i>VERTICILLIOIDES</i> 97K	32
3.13	AMOSTRAS DE RAÇÃO	33
3.13.1	Contagem de <i>Fusarium spp</i>	35
3.13.2	ELISA Competitivo Indireto.....	36
3.13.3	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	37

3.14	ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.	CONCLUSÃO	64
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

1. INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é um dos cereais mais cultivados no mundo e tem grande importância socioeconômica por constituir a base da alimentação de muitos povos e apresentar um amplo espectro de aplicações que vão desde a alimentação animal até a indústria de alta tecnologia (DUARTE, 2000). Devido às suas propriedades nutricionais, é o principal componente da ração animal (cerca de 60% da composição) e constitui a base alimentar em diversos países (KIM et al., 2008; ROSTAGNO et al., 2011). Não obstante, este fator o torna também passível de contaminação por microrganismos, principalmente fungos toxigênicos, que afetam a produtividade e a qualidade dos grãos e sementes.

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de milho, totalizando 53,2 milhões de toneladas na safra 2009/2010 (MAPA, 2012). O levantamento Junho/2012 realizado pela CONAB estima que a safra 2011/2012 de milho no país chegará a 67,8 milhões de toneladas. O Estado do Paraná é o maior produtor nacional, sendo responsável por 24% da produção brasileira (CONAB, 2012), e conseqüentemente, o Estado mais afetado economicamente pelas perdas causadas pela contaminação fúngica.

Entre os fungos contaminantes de produtos agrícolas, o gênero *Fusarium* destaca-se por ser um patógeno primário do milho (GHIASIAN et al., 2004; ORSI et al., 2000). Este gênero pertence à classe Sordariomycetes, subdivisão Pezizomycotina e inclui espécies que formam colônias com colorações diversas (branca, rosa pálida, roxa, alaranjada, púrpura), produzem macroconídios hialinos septados que podem ou não apresentar microconídios e clamidósporos (LESLIE; SUMMERELL, 2006) (Figura 1). As espécies toxigênicas mais importantes que ocorrem em grãos e rações são: *F. graminearum*, *F. poae*, *F. proliferatum*, *F. sporotrichoides*, *F. subglutinans* e *F. verticillioides* (CVETNIC; PEPELJNJAK; SEGVIC, 2005; GLENN, 2007; SROBAROVA et al., 2002).

Estudos no Estado do Paraná mostraram que 98,7 a 100% das amostras de milho analisadas estavam contaminadas por alguma espécie de *Fusarium* (MEIRELLES et al., 2006b; ONO et al., 1999). No Estado de São Paulo, Almeida et al. (2000) analisaram a contaminação natural de 66 amostras de milho em diferentes regiões e observaram uma contaminação de 55,5 a 80% por fungos deste gênero.

Figura 1 – Espécie de *Fusarium* em microscopia óptica produzindo macroconídios septados (A), microconídios (B) e clamidósporos (C).



Fonte: THE UNIVERSITY OF GEORGIA – College of Agricultural & Environmental Sciences. Acesso em: 14 de novembro de 2012.

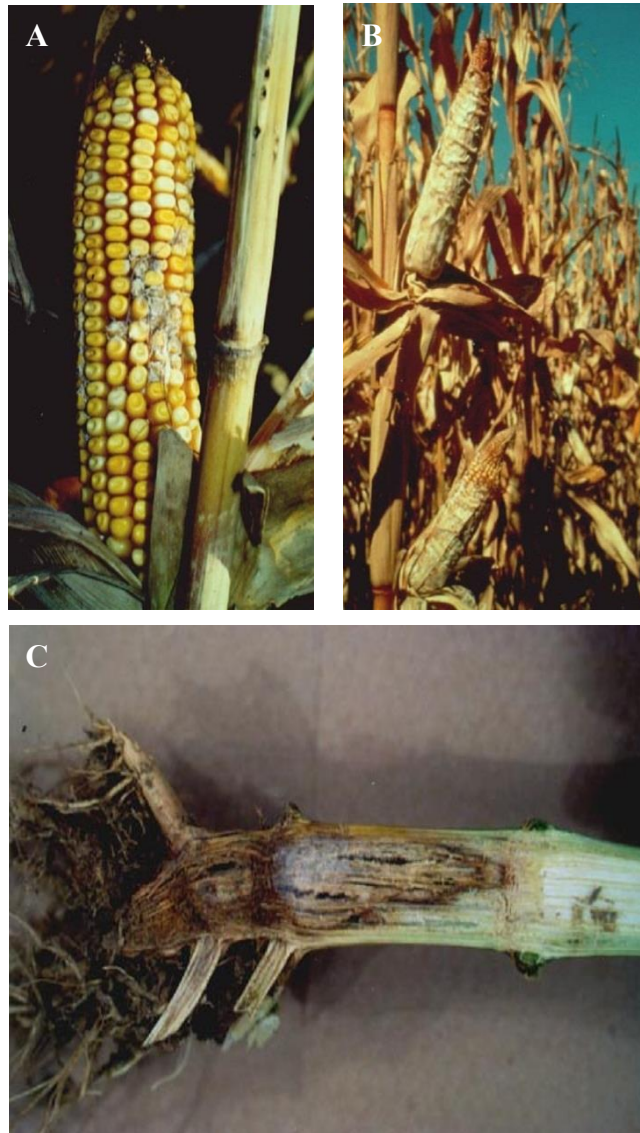
O ascomiceto fitopatogênico *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg (= *Fusarium moniliforme* Sheldon) é a espécie de *Fusarium* predominante no milho (KEDERA; PLATTNER; DESJARDINS, 1999; VAN DER WESTHUIZEN et al., 2003) e pode causar uma infecção endofítica (assintomática) ou uma grave doença, provocando danos em plântulas e podridão de raiz, caule, espiga e grãos (BACON et al., 1992; DAVIS et al., 1989; MUNKVOLD; DESJARDINS, 1997; OREN et al., 2003; YATES; BACON; HINTON, 1997) (Figura 2).

A contaminação do milho por *F. verticillioides* ocorre principalmente por meio da infecção dos estigmas por conídios carregados pelo ar ou água. No entanto, a doença pode estabelecer-se de outras maneiras: via contaminação da semente chegando à espiga e grãos por meio da circulação sistêmica caulinar; pela infecção da raiz atingindo os grãos através do colmo e espiga; e via injúrias causadas por insetos, os quais, também podem atuar como vetores de inoculo (GILBERTSON et al., 1986; LAWRENCE; NELSON; AYERS, 1981; MUNKVOLD; CARLTON, 1997; SOBEK; MUNKVOLD, 1999).

Sendo fungo saprofítico de campo, a infecção de milho por *F. verticillioides* está relacionada a diversos fatores: adubação, tipo de híbrido, condições de umidade e temperatura durante o desenvolvimento da planta e ataque de insetos, que isoladamente e principalmente em associação permitem a manutenção desta espécie no campo (BLANDINO; REYNERI;

VANARA, 2008; GILBERTSON et al., 1986; KING; SCOTT, 1981; LIDDELL; BURGESS, 1985; MUNKVOLD; HELLMICH; SHOWERS, 1997; SOBEK; MUNKVOLD, 1999).

Figura 2 – Apodrecimento moderado (A) e grave (B) da espiga e da base do caule do milho (C) causado por *F. verticillioides*.



Fonte: MUNKVOLD; DESJARDINS, 1997.

Além de causar perdas econômicas para agricultores por afetar a produtividade e qualidade do milho, o fungo *F. verticillioides* também é responsável por produzir várias micotoxinas, como fumonisinas, moniliformina, ácido fusárico e fusarina C, sendo esta última um potente mutagênico (BACON et al., 1996; COLE et al., 1973; GELDERBLOM et al., 1988; WIEBE; BJELDANES, 1981).

As micotoxinas são metabólitos secundários, produzidos por fungos filamentosos que se desenvolvem naturalmente em alimentos, capazes de causar vários efeitos tóxicos em animais e seres humanos (SMITH; MOSS, 1985). Constituem um grupo diversificado de compostos orgânicos de baixa massa molecular, que possuem tanto estruturas químicas quanto propriedades toxicológicas variadas (BETINA, 1989).

A exposição às micotoxinas ocorre, predominantemente, por meio da ingestão de alimentos e rações contaminados, no entanto, a intoxicação por via dérmica e por inalação também pode ocorrer (BOONEN et al., 2012; CROFT; JARVIS; YATAWARA, 1986; EMANUEL; WENZEL; LAWTON, 1975).

As toxinas apresentam, de modo geral, grande estabilidade térmica e química, permitindo sua persistência no alimento mesmo após a inativação dos fungos pelos processos usuais de industrialização e, ao serem metabolizadas pelos animais podem ocorrer em carne, ovos e leite (BULLERMAN; BIANCHINI, 2007; HERZALLAH, 2009; NORRED et al., 1988; YOSHIZAWA et al., 1981).

As enfermidades causadas por micotoxinas são denominadas micotoxicoses e seus efeitos gerais sobre a saúde animal e humana são dependentes da dose, toxicidade, tempo de exposição, espécie, raça, gênero e idade (BENNETT, 1987).

Embora animais e seres humanos sejam suscetíveis a esses efeitos, os animais apresentam maior probabilidade de contaminação devido à ingestão de grãos de baixa qualidade, sendo o maior problema das micotoxicoses atribuído aos prejuízos relacionados à queda no desempenho produtivo do animal (SMITH; MOSS, 1985).

As micotoxicoses podem ser de natureza aguda ou crônica. As micotoxicoses agudas ocorrem quando há consumo de doses moderadas a altas de micotoxinas e são caracterizadas, geralmente, por hepatite, hemorragia, nefrite, necrose das mucosas digestivas e morte. A micotoxicose crônica é mais frequente, e ocorre quando existe o consumo de doses moderadas a baixas de micotoxinas e é caracterizada por redução da eficiência reprodutiva, diminuição da conversão alimentar, da taxa de crescimento e do ganho de peso (SMITH; MOSS, 1985).

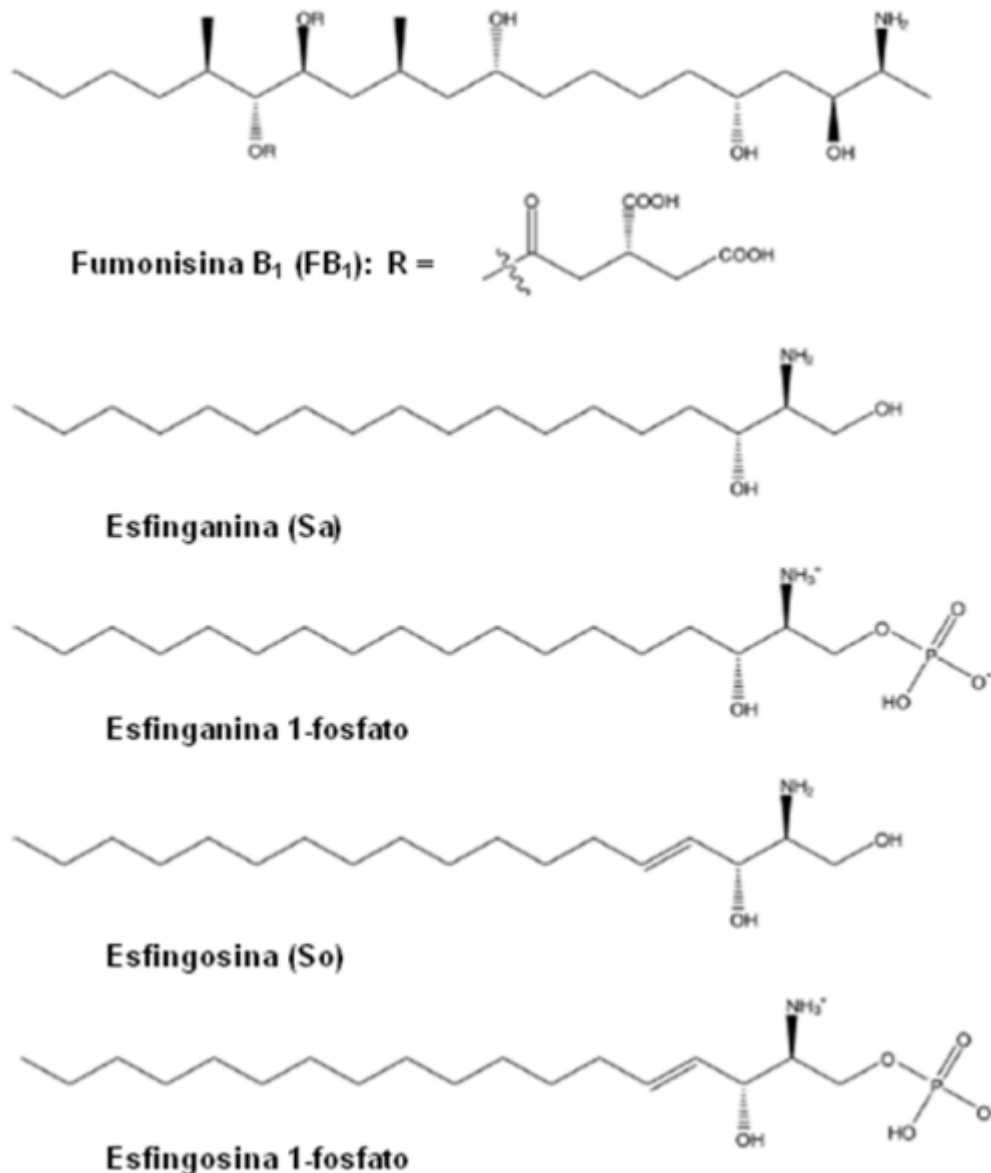
As fumonisinas (F), descobertas em 1988, constituem um grupo de micotoxinas produzidas principalmente por *F. verticillioides* e *F. proliferatum* (ROSS et al., 1990; THIEL et al., 1991). Dentre os análogos do grupo, as FB₁, FB₂, FB₃, FB₄, FC₁, FC₃ e FC₄ são contaminantes naturais de milho e derivados, sendo a FB₁ a mais tóxica e abundante (HOPMANS; MURPHY, 1993; HOWARD et al., 2002; SEO; LEE, 1999; SYDENHAM et al., 1990). Esta toxina é produzida no estágio de pré-armazenagem e o processamento

industrial do milho não elimina eficientemente a fumonisina pré-existente nos grãos, sendo detectada em seus produtos derivados (BUSH et al., 2004; HUMPF; VOSS, 2004).

A ingestão de milho e derivados contaminados com fumonisinas é preocupante devido à sua associação com doenças em seres humanos e outras espécies de animais. As fumonisinas causam leucoencefalomalácia em equinos (ELEM) (ROSS et al., 1993), edema pulmonar em suínos (HASCHEK et al., 1992) e redução no desenvolvimento e imunossupressão em aves (LEDOUX et al., 1992; TESSARI et al., 2006). Em ratos, foi comprovada a ação hepatotóxica, hepatocarcinogênica e nefrocarcinogênica (GELDERBLOM et al., 2001; HOWARD et al., 2001). Em seres humanos, estudos epidemiológicos indicam a sua associação com defeitos no tubo neural de fetos (MISSMER et al., 2006) e com o câncer esofágico e hepático primário (UENO et al., 1997; YOSHIZAWA; YAMASHITA; LUO, 1994), sendo classificada pela “International Agency for Research on Cancer” (IARC) (2012) como carcinógeno do grupo 2B (provavelmente carcinogênico para humanos). Estudos *in vivo* com camundongos mostraram que a exposição materna à FB₁ altera o metabolismo dos esfingolípídeos e a concentração de folato, resultando em um aumento dose-dependente nos defeitos do tubo neural dos fetos (GELINEAU-VAN WAES et al., 2005).

A atividade tóxica das fumonisinas é atribuída principalmente à sua ação no metabolismo dos esfingolípídeos, que são lipídeos de membrana importantes na estruturação da membrana plasmática das células, podendo atuar como sítios de reconhecimento em suas superfícies. Devido à semelhança estrutural das fumonisinas com as bases esfingóides (esfinganina e esfingosina) (Figura 3) ocorre uma competição pela enzima ceramida sintase, responsável por converter a esfinganina em dihidroceramida e a esfingosina em ceramida. As fumonisinas ao se ligarem à ceramida sintase promovem sua inibição, levando a inibição da biossíntese de ceramidas, aumento de esfinganina e esfingosina livres e redução da degradação dos esfingolípídeos provenientes da dieta (MERRILL et al., 1993; WANG et al., 1991). Estas alterações afetam a atividade de proteínas quinases, o crescimento e a diferenciação celular e a apoptose (EDSALL; PIRIANOV; SPIEGEL, 1997; MORITA et al., 2000; WANG et al., 1997). Além disso, as fumonisinas podem induzir a peroxidação lipídica e inibir a síntese de proteínas e de DNA (ABADO-BECOGNEE et al., 1998).

Figura 3 - Estrutura química da FB₁ e dos principais metabólitos dos esfingolípideos.



Fonte: CAI; TANG; WANG, 2007.

A contaminação do milho por fumonisinas também é motivo de preocupação uma vez que foram detectadas FB₁ e FB₂ em 90 a 100% de amostras recém-colhidas e em 75% de seus subprodutos (ONO et al., 1999; ORSI et al., 2000; ZHANG; CAUPERT, 2012).

Considerando a elevada contaminação de milho por *F. verticillioides* e fumonisinas, aliada à relevância nutricional e econômica deste cereal, os sérios riscos causados à saúde humana e animal pelas micotoxinas e a estabilidade das fumonisinas ao processamento industrial, medidas de controle da contaminação do milho pelo fungo e por suas toxinas são necessárias.

A melhor estratégia para o controle da contaminação por fumonisinas é a prevenção da infecção por *Fusarium* spp. e da produção de fumonisinas no campo e na armazenagem dos

grãos. Práticas que diminuem a presença de insetos nas plantações de grãos e a umidade durante o armazenamento das matérias primas e rações são de extrema importância para impedir as condições ótimas para o desenvolvimento fúngico e a consequente produção de toxinas. No entanto, em muitas situações, devido a questões de ordem prática e econômica, não é possível atender a essas exigências (BLANDINO et al., 2009; ONO et al., 2002; ORSI et al., 2000).

O calor é um método físico descrito por Dupuy et al. (1993) como sendo capaz de diminuir de 75% a 87% as concentrações de fumonisina B₁ em grãos de milho, no entanto a temperatura deve ser em torno de 125 a 150°C, o que pode levar a perda nutricional. Voss et al. (1996) descreveram que a simples lavagem dos grãos, usando água e solução de carbonato de sódio, pode reduzir as concentrações de fumonisina no milho. Entretanto essas técnicas são de pouca aplicabilidade para grandes quantidades de grãos.

Outra forma de reduzir as micotoxinas em alimentos é o uso de substâncias adsorventes. Vários minerais têm sido avaliados com esse intuito devido à facilidade com que são incorporados às rações sem a necessidade de equipamentos especiais (AVANTAGGIATO; HAVENAAR; VISCONTI, 2007; AVANTAGGIATO; SOLFRIZZO; VISCONTI, 2005; SOLFRIZZO et al., 2000). O principal mecanismo de adsorção desses materiais está relacionado com a troca de cargas entre o adsorvente e a micotoxina. Entretanto, como as estruturas das micotoxinas são diferentes, sua eficácia não é igual para todas elas (AVANTAGGIATO; SOLFRIZZO; VISCONTI, 2005), além de que, por compatibilidade de cargas elétricas essas substâncias também podem ser capazes de adsorver outros componentes da dieta e apresentar efeitos negativos sobre a biodisponibilidade de minerais (WARD et al., 1991).

Apesar de existirem essas práticas para controlar a contaminação por fungos e por suas toxinas, nenhuma delas é suficientemente eficaz para eliminar o fungo e suas toxinas dos alimentos. Portanto, é importante desenvolver ensaios adequados para a detecção do fungo, visando o controle de qualidade dos produtos destinados ao consumo humano e animal.

A identificação das espécies de *Fusarium* é complexa devido à variabilidade morfológica e às alterações resultantes de repiques sucessivos em meios de cultura normalmente utilizados em laboratório. Os métodos tradicionais de identificação e detecção de fungos incluem o cultivo em diversos meios, exame microscópico e análises químicas de quitina, ergosterol ou metabólitos secundários (HOPMANS; MURPHY, 1993; LESLIE; SUMMEREL, 2006; MATCHAM; JORDAN; WOOD, 1985; RIDE; DRYSDALE, 1972).

Com exceção da identificação de metabólitos secundários (incluindo as micotoxinas) por meio de cromatografia e espectrometria de massa, os demais métodos apresentam baixa especificidade, reprodutibilidade, consomem muito tempo (BERMINGHAM; MALTBY; COOKE, 1995; FLÓREZ et al., 2007; SHARMA; FISHER; WEBSTER, 1977). Os métodos microbiológicos, por exemplo, podem demorar em torno de uma semana e a detecção de micélio por microscopia não é precisa (FLÓREZ et al., 2007). Embora os métodos cromatográficos e de espectrometria de massa apresentem alta especificidade e sensibilidade na detecção de micotoxinas, apresentam algumas desvantagens, uma vez que são laboriosos, possuem custo elevado, consomem muito tempo para a execução da análise, utilizam reagentes tóxicos como o metanol; requerem equipamentos sofisticados e processos extensivos de limpeza da amostra (MUSCARELLA et al., 2008; SILVA et al., 2009). Os estudos de sistemática molecular apesar de possuírem boa especificidade, também apresentam custo elevado (STEENKAMP et al., 2000).

Por outro lado, os métodos imunológicos destacam-se por permitir a análise de várias amostras em um único teste, apresentar alta sensibilidade e especificidade e não necessitar da utilização de reagentes tóxicos (SHELBY; ROTTINGHAUS; MINOR, 1994). Dentre os métodos imunológicos, os ensaios imunoenzimáticos (ELISA – “enzyme-linked immunosorbent assay”) que utilizam exoantígenos são amplamente empregados na detecção e identificação de fungos patogênicos (ABRAMSON et al., 1998; LU et al., 1994; MEIRELLES et al., 2006b; ROHDE; RABENSTEIN, 2005), uma vez que a maioria dos fungos produz exoantígenos espécie-específicos (KAUFMAN; STANDARD, 1987).

Os exoantígenos são macromoléculas imunogênicas produzidas durante todo o período de crescimento do fungo e geralmente independem do meio de cultivo, temperatura ou idade do cultivo, sendo por isso sugerido que as características antigênicas dos fungos podem ser utilizadas como ferramentas taxonômicas (KAUFMAN; STANDARD, 1987).

O ELISA pode detectar a presença de fungos em alimentos mesmo após tratamento térmico possibilitando avaliar a contaminação em alimentos processados. Enquanto os métodos convencionais detectam o número de propágulos viáveis, os imunoenaios podem revelar a quantidade de biomassa fúngica (NOTERMANS; HEUVELMAN, 1985).

Meirelles et al. (2006a) produziram e caracterizaram exoantígenos de 8 isolados de *F. verticillioides* (97K, 164G, 113F, 103Br, 119Br, 103F, 162A e 104Ga). Destes isolados, o 162A, 113F e 97K apresentaram exoantígenos com maior concentração de proteínas e número de bandas proteicas na eletroforese, sendo assim selecionados para produção de anticorpos

policlonais em coelhos. O soro anti-97K produzido apresentou maior reatividade no teste de imunodifusão radial dupla e também o maior título de anticorpos (1:12.800) quando comparado com os soros anti-162A e anti-113F que apresentaram um título de 1:400 e 1:800, respectivamente. Seus resultados mostraram, portanto, que o anticorpo anti-97K é o mais adequado para utilização em imunoenaios e que os anticorpos produzidos contra os exoantígenos de *F. verticillioides* apresentam potencial para imunodeteccção deste fungo toxigênico.

O ELISA indireto desenvolvido por Iyer e Cousin (2003) pode detectar espécies de *Fusarium* mais rapidamente do que o método tradicional de contagem em placa e o ELISA competitivo indireto desenvolvido por Meirelles et al. (2006b) apresentou potencial para detectar *Fusarium* spp. em amostras de milho quando comparado a métodos tradicionais de detecção de fungo (ergosterol e biomassa fúngica), uma vez que a concentração de exoantígeno determinada por este imunoenasiao apresentou coeficiente de correlação de 0,52 com concentração de ergosterol e de 0,84 com biomassa em caldo BHI em amostras de milho recém-colhido.

Portanto, a caracterização de anticorpos contra o exoantígeno de *F. verticillioides* para o desenvolvimento de um método imunológico prático e específico para detecção desse fungo em alimento é necessária, a fim de assegurar a qualidade e a segurança dos produtos destinados ao consumo e minimizar os potenciais riscos à saúde humana e animal.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

- Produzir e caracterizar anticorpos produzidos contra exoantígeno de *F. verticillioides* 97K e contra proteína de 67 kDa do mesmo.
- Desenvolver um método de imunodeteção de *F. verticillioides* em amostras de ração para galinhas poedeiras.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir exoantígenos de *F. verticillioides* 97K.
- Produzir anticorpos policlonais IgY contra exoantígeno de *F. verticillioides* 97K em galinhas poedeiras.
- Avaliar a reatividade dos anticorpos policlonais IgY produzidos com exoantígenos dos diferentes isolados de *F. verticillioides*.
- Avaliar a reatividade dos anticorpos policlonais IgY produzidos com exoantígenos de outras espécies fúngicas.
- Produzir anticorpos policlonais IgG contra proteína de 67 kDa do exoantígeno de *F. verticillioides* 97K em coelho.
- Avaliar a reatividade dos anticorpos de coelho com exoantígenos dos diferentes isolados de *F. verticillioides*.
- Avaliar a reatividade dos anticorpos de coelho com exoantígenos de outras espécies fúngicas.
- Purificar a proteína de 67 kDa do exoantígeno de *F. verticillioides* 97K
- Padronizar um novo método imunológico para deteção de *F. verticillioides* em amostras de ração destinadas à alimentação de galinhas poedeiras.
- Avaliar a correlação entre as concentrações de exoantígeno de *F. verticillioides*, a contagem de *Fusarium* sp. e as concentrações de fumonisinas em amostra de ração.

3. MATERIAIS E MÉTODOS:

3.1 CULTURAS FÚNGICAS

Foi utilizado o isolado de *F. verticillioides* 97K, obtido a partir de ração a base de milho envolvida em intoxicação animal, gentilmente cedido pela Profa. Dr^a. Elisa Yoko Hirooka do Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Londrina, Paraná.

A cultura fúngica foi mantida em Ágar Batata Dextrose (BDA) a 28°C por 7 dias.

3.2 OBTENÇÃO DE EXOANTÍGENOS

3.2.1 Exoantígeno de *F. Verticillioides* 97K

Após o cultivo do isolado em Ágar Batata Dextrose (BDA) a 28° C por 7 dias, foram preparadas suspensões de esporos (10^7 esporos mL⁻¹) em solução de Tween 80 a 0,1% em água destilada estéril (v/v). Alíquotas das suspensões foram transferidas para erlenmeyers contendo caldo BHI (Brain Heart Infusion) (Acumedia, Lansing, Estados Unidos), incubadas a 28° C em condição de agitação por 14 dias e inativadas com Thimerosal (Sigma, Saint Louis, Estados Unidos da América) 0,02% por 24 horas a 4° C.

Após a inativação com Thimerosal 0,02%, os cultivos foram filtrados a vácuo em papel filtro e centrifugados a 3100 xg a 4° C. O sobrenadante contendo os exoantígenos foi dialisado por 24 horas a 4°C contra tampão fosfato de sódio monobásico 5 mM pH 7, liofilizado e ressuspenso em água destilada. Em seguida, uma nova diálise contra PBS foi realizada e o material foi então armazenado a -20° C até o momento do uso.

3.2.2 Outros Exoantígenos

Os exoantígenos das espécies fúngicas *F. sporotrichioides*, *F. graminearum*, *F. subglutinans*, *Aspergillus flavus*, *A.niger*, *A. ochraceus*, *Penicillium brevicompactum*, *P. variabile*, *P. funiculosum* e *P. purpurogenum* e dos isolados de *F. verticillioides* 119Br, 104Ga, 164G e 103Br foram gentilmente cedidos pela Profa. Dra. Elisabete Yurie Sataque Ono, do departamento de Biotecnologia do Centro de Ciências Exatas da Universidade Estadual de Londrina, Paraná.

3.3 DOSAGEM DE PROTEÍNAS DOS EXOANTÍGENOS, DA PROTEÍNA PURIFICADA E DOS ANTICORPOS

A dosagem de proteínas dos exoantígenos e da proteína de 67 kDa purificada foi realizada pelo método de Bradford (1976) utilizando soroalbumina bovina como padrão.

A dosagem de proteínas do anticorpo purificado foi realizada pelo método de Biureto, utilizando como padrão a albumina bovina.

3.4 DETERMINAÇÃO DO PADRÃO PROTEICO DOS EXOANTÍGENOS E DOS ANTICORPOS

Os exoantígenos foram submetidos à Eletroforese Desnaturante em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) (LAEMMLI, 1970), utilizando gel de empilhamento (5%), gel de separação (10%) e padrão de massa molecular de 6 a 180 kDa (Invitrogen, Carlsbad, Estados Unidos da América). A eletroforese foi realizada a 100 V utilizando tampão Tris-glicina pH 8,8 e as bandas proteicas foram reveladas pelo método da prata (NIELSEN; BROWN, 1984) ou por Coomassie Brilliant Blue (Biorad, Hercules, Estados Unidos da América) (BENNETT; SCOTT, 1971).

O anticorpo IgY contra exoantígeno de *F. verticillioides* 97K também foi submetido a SDS-PAGE. Foi utilizado gel de empilhamento (5%), gel de separação (7,5%) e padrão de massa molecular de 47 a 202 kDa (Bio-Rad, Hercules, Estados Unidos da América). A

eletroforese foi realizada a 100 V utilizando tampão Tris-glicina pH 8,8 e o gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue.

3.5 IMUNIZAÇÃO DE GALINHAS POEDEIRAS

Os exoantígenos de *F. verticillioides* 97K foram utilizados para imunização de 3 galinhas poedeiras (*Gallus gallus domesticus*) em idade de postura, gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. João Waine Pinheiro do Departamento de Zootecnia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Londrina. As aves foram mantidas no Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina, com fornecimento de ração comercial e água *ad libitum*.

Os exoantígenos foram homogeneizados com adjuvante completo de Freund (Sigma, Saint Louis, Estados Unidos da América) na primeira dose e com adjuvante incompleto de Freund (Sigma, Saint Louis, Estados Unidos da América) nas doses subsequentes e aplicados via intramuscular em dois pontos da região peitoral com intervalos de uma semana. Os soros foram coletados durante as imunizações e uma semana após a terceira dose e titulados por ELISA.

A galinha que apresentou maior título de anticorpos contra exoantígeno de *F. verticillioides* 97K recebeu uma dose de reforço.

3.6 TITULAÇÃO DOS SOROS DAS GALINHAS

A titulação da IgY anti-exoantígeno de *F. verticillioides* 97K foi realizada por ELISA indireto desenvolvido por Engvall e Pearlmann (1972) com algumas modificações. Os anticorpos policlonais foram analisados nas diluições de 1:100 a 1:800.

A microplaca foi sensibilizada com exoantígeno de *F. verticillioides* 97K em tampão carbonato/bicarbonato 0,2 M pH 9,6. Após lavagens com PBS-Tween 20 0,05% (PBS-T) os poços foram bloqueados com PBS leite desnatado 5% a 25°C por uma hora. A placa foi lavada com PBS-T e então, foram adicionados 100 µL de soros imunes diluídos em PBS leite

desnatado 1%, procedendo a incubação a 25°C por uma hora. Após lavagens com PBS-T foram adicionados 100 µL do conjugado anti-IgY peroxidase (Sigma, Saint Louis, Estados Unidos da América), seguido de incubação a 25°C por uma hora. Após este período, a microplaca foi lavada com PBS-T, e 100 µL da solução de substrato/cromógeno (H₂O₂/tetrametilbenzidina) (Sigma, Saint Louis, Estados Unidos da América) foram adicionados, procedendo-se à incubação por 15 minutos. A reação foi bloqueada com 50 µL de H₂SO₄ 4 N e as absorvâncias determinadas a 450 nm em espectrofotômetro de microplaca (iMark™ microplate reader).

3.7 AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE DAS GEMAS

As gemas dos ovos da galinha que apresentou maior reatividade contra o exoantígeno de *F. verticillioides* 97K foram selecionadas para o teste de reatividade contra exoantígeno de *F. verticillioides* 97K por ELISA indireto utilizando a mesma metodologia do tópico acima, substituindo o soro pela gema na diluição 1:200 em PBS-leite 1%. Foram testadas gemas provenientes de ovos produzidos antes, durante e após as imunizações.

As gemas do período de maior reatividade ao exoantígeno foram selecionadas para a extração de IgY.

3.8 EXTRAÇÃO DE IGY DA GEMA

A gema foi separada da clara e foi diluída em água destilada acidificada pH 2,5 e congelada por 24 horas. Em seguida, foi descongelada, filtrada, precipitada com sulfato de amônio a 35%, incubada à temperatura ambiente por 1 hora e centrifugada a 4°C. O precipitado foi solubilizado em água destilada e dialisado por 24 horas contra água destilada e PBS. Após a diálise, foi adicionado thimerosal na concentração final 0,02% e a amostra foi armazenada no congelador até o momento de uso.

3.9 AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE DA IGY EXTRAÍDA

3.9.1 ELISA Indireto

A reatividade da IgY extraída contra o exoantígeno de *F. verticillioides* 97K e de outras espécies fúngicas (*F. sporotrichioides*, *F. graminearum*, *F. subglutinans*, *A. flavus*, *A.niger*, *A. ochraceus*, *P. brevicompactum*, *P. variabile*, *P. funiculosum* e *P. purpurogenum*) foi avaliada por ELISA indireto.

A microplaca foi sensibilizada com 100 µL/poço de exoantígeno das diferentes espécies fúngicas em tampão carbonato/bicarbonato 0,2 M pH 9,6 seguido de incubação a 4°C por 16 horas. Após lavagens com PBS-T os poços foram bloqueados com PBS leite desnatado 5% a 25°C por uma hora. A placa foi lavada com PBS-T e foram adicionados 100 µL da IgY na diluição 1:200 em PBS leite desnatado 1%, procedendo a incubação a 25°C por uma hora. Após lavagens com PBS-T foram adicionados 100 µL do conjugado anti-IgY peroxidase em PBS leite desnatado 1%, seguido de incubação a 25°C por uma hora. Após este período, a microplaca foi lavada com PBS-T, e 100 µL da solução de substrato/cromógeno (H₂O₂/tetrametilbenzidina) foram adicionados, procedendo-se à incubação por 15 minutos. A reação foi bloqueada com 50 µL de H₂SO₄ 4 N e as absorvâncias determinadas a 450 nm em espectrofotômetro de microplaca (iMark™ microplate reader).

A reatividade cruzada apresentada pelo anticorpo policlonal de galinha com exoantígeno de outras espécies fúngicas foi calculada pela fórmula a seguir:

$$\text{Reatividade Cruzada} = \frac{\text{Média da absorvância com exoantígeno do fungo teste}}{\text{Média da absorvância com exoantígeno de } F. \textit{verticillioides} \text{ 97K}}$$

3.9.2 “Western Blot”

A reatividade da IgY extraída contra o exoantígeno de diferentes isolados de *F. verticillioides* (97K, 119Br, 104Ga, 164G e 103Br) e de outras espécies fúngicas (*F. sporotrichioides*, *F. graminearum*, *F. subglutinans*, *A. flavus*, *A.niger*, *A. ochraceus*, *P. brevicompactum*, *P. purpurogenum*) foi avaliada por “Western blot”.

Os exoantígenos foram separados por eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida, utilizando gel de empilhamento 5% e gel de separação 10% e padrão de massa molecular de 6 a 180 kDa. A eletroforese foi realizada a 100 V utilizando tampão Tris-glicina pH 8,8. As bandas proteicas foram transferidas para membrana de nitrocelulose 0,45 µm (Bio-Rad, Hercules, Estados Unidos da América) a 30 V a 4°C por 18 horas utilizando tampão tris-glicina-metanol. Após a transferência, a membrana foi bloqueada com PBS leite 5% por 1 hora. Em seguida, a membrana foi lavada com PBS-T e incubada com anticorpo IgY anti-97K por 1 hora. Após lavagem com PBS-T a membrana foi incubada com conjugado anti-IgY peroxidase por 1 hora. Por fim, a membrana foi lavada com PBS-T e imersa na solução do substrato (H₂O₂/diaminobenzidina) (Sigma, Saint Louis, Estados Unidos da América) até a revelação das bandas na membrana. O desenvolvimento da cor foi interrompido com água destilada.

3.10 IMUNIZAÇÃO DE COELHO

Um coelho fêmea de seis meses de idade (*Oryctolagus cuniculus*) da raça Nova Zelândia, com aproximadamente 4 kg, foi mantido no biotério do Hospital Universitário de Londrina com fornecimento de ração comercial e água *ad libitum*.

O coelho foi imunizado com a proteína de 67 kDa destacada do gel de poliacrilamida resultante da eletroforese do exoantígeno de *F. verticillioides* 97K bruto corado com Coomassie Brilliant Blue. A proteína foi macerada em PBS e misturada com Adjuvante Incompleto de Freund. Foram aplicadas três doses via subcutânea com intervalo de uma semana entre elas e uma dose de reforço 3 semanas após a terceira dose.

Amostras de soro foram coletadas antes da primeira imunização, uma semana após cada imunização, no dia da aplicação da dose de reforço e uma semana após a dose de reforço e foram avaliadas por ELISA indireto e por “Western blot”.

3.11 AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE DOS SOROS DE COELHO

3.11.1 ELISA Indireto

A resposta do coelho às imunizações e a reatividade dos anticorpos produzidos contra o exoantígeno de diferentes espécies fúngicas (*F. sporotrichioides*, *F. graminearum*, *F. subglutinans*, *A. flavus*, *A.niger*, *A. ochraceus*, *P. brevicompactum*, *P. variabile*, *P. funiculosum* e *P. purpurogenum*) foram avaliadas por ELISA indireto.

A microplaca foi sensibilizada com 100 µL/poço de exoantígenos em tampão carbonato/bicarbonato 0,2 M pH 9,6 seguido de incubação a 4°C por 16 horas. Após lavagens com PBS-T os poços foram bloqueados com PBS leite desnatado 5% a 25°C por uma hora. A placa foi lavada com PBS-T e então, foram adicionados 100 µL de soros imunes e pré-imunes na diluição 1:400 e 1:800 em PBS leite desnatado 1% para avaliar a resposta do coelho às imunizações e na diluição 1:400 para avaliar a reatividade ao exoantígeno de outras espécies fúngicas, procedendo à incubação a 25°C por uma hora. Após três lavagens com PBS-T foram adicionados 100 µL do conjugado anti-IgG de coelho peroxidase (Sigma, Saint Louis, Estados Unidos da América), seguido de incubação a 25°C por uma hora. Após este período, a microplaca foi lavada com PBS-T, e 100 µL da solução de substrato/cromógeno (H₂O₂/tetrametilbenzidina) foram adicionados, procedendo-se à incubação por 15 minutos. A reação foi bloqueada com 50 µL de H₂SO₄ 4 N e as absorvâncias determinadas a 450 nm em espectrofotômetro de microplaca (iMark™ microplate reader).

A reatividade cruzada apresentada pelo anticorpo do coelho com exoantígeno de outras espécies fúngicas foi calculada pela fórmula a seguir:

$$\text{Reatividade Cruzada} = \frac{\text{Média da absorvância com exoantígeno do fungo teste}}{\text{Média da absorvância com exoantígeno de } F. verticillioides \text{ 97K}}$$

Foi avaliada também a reatividade do soro do coelho imunizado à proteína de 67 kDa purificada pela cromatografia de afinidade descrita na seção 3.12 por ELISA indireto. A placa foi sensibilizada com 100 µL/poço da proteína de 67 kDa na concentração 2,5 µg/mL. O soro imune foi testado na diluição 1:400.

3.11.2. “Western Blot”

A reatividade do soro de coelho imunizado contra exoantígenos de diferentes isolados de *F. verticillioides* (97K, 119Br, 104Ga, 164G e 103Br) e de outras espécies fúngicas (*F. sporotrichioides*, *F. graminearum*, *F. subglutinans*, *A. flavus*, *A.niger*, *A. ochraceus*, *P. brevicompactum*, *P. purpurogenum*) foi avaliada por “Western blot”

Os exoantígenos foram separados por eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida, utilizando gel de empilhamento 5% e gel de separação 10% e padrão de massa molecular de 6 a 180 kDa e de 5 a 160 kDa (Invitrogen, Carlsbad, Estados Unidos da América). A eletroforese foi realizada a 100 V utilizando tampão Tris-glicina pH 8,8. As bandas proteicas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose 0,45 µm a 30 V por 18 horas a 4°C utilizando tampão tris-glicina-metanol. Após a transferência, a membrana foi bloqueada com PBS leite desnatado 5% por 1 hora. Em seguida, a membrana foi lavada com PBS-T e incubada com IgG anti-proteína de 67 kDa (diluição 1:400) em PBS leite desnatado 1% por 1 hora. Após lavagem com PBS-T a membrana foi incubada com conjugado anti-IgG de coelho peroxidase em PBS leite desnatado 1% por 1 hora. Por fim, a membrana foi lavada com PBS-T e imersa na solução do substrato (H₂O₂/diaminobenzidina) até a revelação das bandas. O desenvolvimento da cor foi interrompido com água destilada.

3.12 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA DE 67 KDA DO EXOANTÍGENO DE *F. VERTICILLIOIDES* 97K

A proteína de 67 kDa foi purificada por cromatografia de afinidade, utilizando resina Sepharose 4B ativado com brometo de cianogênio (Sigma, Steinheim, Alemanha) ligada ao anticorpo de coelho anti-proteína de 67 kDa.

Primeiramente, o anticorpo de coelho foi purificado por cromatografia de afinidade em coluna HiTrap Protein G HP (GE Healthcare, Piscataway, Estados Unidos da América). Em seguida, foi dialisado contra tampão carbonato de sódio 0,1 M contendo cloreto de sódio 0,5 M pH 8,4 e foi ligado à 0,5 mL de resina Sepharose 4B ativada com brometo de cianogênio em condições alcalinas por 2 horas. A resina foi então lavada para a retirada dos anticorpos que não se ligaram à coluna e foi bloqueada com solução de glicina 0,2 M pH 8 por 2 horas. A resina foi extensivamente lavada para a remoção da solução de bloqueio primeiro com

solução básica (tampão de ligação), depois com solução ácida (tampão acetato de sódio 0,1 M pH 4,0, contendo 0,5 M de NaCl). O ciclo de lavagem foi completado alternando solução básica e ácida.

Por fim, a coluna foi equilibrada com PBS, e 0,5 mL do exoantígeno de *F. verticillioides* 97K foi aplicado. A coluna foi lavada com PBS para retirada de proteínas que não se ligaram à resina e as proteínas ligadas foram eluídas com solução glicina 0,1 M pH 2,7 sendo coletadas em microtubos contendo Tris 1 M pH 9,0.

As proteínas das frações coletadas foram quantificadas pelo método de Bradford e a reatividade da proteína purificada com o anticorpo anti-proteína de 67 kDa foi avaliada por ELISA indireto.

3.13 AMOSTRAS DE RAÇÃO

As amostras de ração foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Elisabete Yurie Sataque Ono, do Departamento de Biotecnologia do Centro de Ciências Exatas da Universidade Estadual de Londrina, Paraná. As amostras eram destinadas a galinhas poedeiras e foram coletadas na Granja Experimental da Fazenda Escola da Universidade Estadual de Londrina. A ração (lote de 500Kg) era preparada em intervalos de 7 a 10 dias, de acordo com a constituição elaborada pela zootecnista responsável (Tabela 1). Foram realizadas amostragens com intervalos de aproximadamente dois a três dias compreendendo amostras do início, meio e final do lote durante o período de janeiro a dezembro de 2010 (ROSSI, 2011).

Tabela 1 – Composição da ração utilizada na alimentação de galinhas poedeiras em diferentes períodos de 2010.

Composição da Ração				
Quantidade (Kg)				
	Período			
	08/jan – 23/jan	24/jan – 22/abr	23/abr – 19/jun	20/jun – 30/ago
Milho grão	64,8	65,0	61,2	61,0
Farelo de soja	23,8	24,0	25,6	25,6
Calcário	8,8	9,0	8,2	9,0
Fosfato bicálcico	1,2	1,2	2,1	1,6
Premix postura	0,4	0,5	0,5	0,4
Óleo de soja	0,4	0,1	1,9	1,7
Sal	0,3	0,3	0,3	0,3
DL – metionina	0,12	-	0,11	0,18
Lisina	-	-	0,036	-

Fonte: ROSSI, 2011.

A amostragem consistiu na coleta de subamostras em vários pontos a diferentes profundidades do “baú” no qual a ração era armazenada (Figura 4). Após a homogeneização do material, as amostras de ração foram conduzidas ao laboratório e estocadas a 4°C. Posteriormente, foram trituradas até a granulometria de 50 mesh e armazenadas a -20°C até o momento de uso (ROSSI, 2011).

Figura 4 - Amostragem da ração destinada à alimentação de galinhas poedeiras.



Fonte: ROSSI, 2011.

No presente trabalho, 81 amostras de ração foram analisadas quanto a presença de *Fusarium* spp. pelo método de contagem em placa, a contaminação por fumonisinas por cromatografia líquida de alta eficiência e para se avaliar o potencial do ELISA competitivo indireto desenvolvido com anticorpo de coelho específico para a proteína de 67 kDa do exoantígeno de *F. verticillioides* 97K na detecção e quantificação de exoantígeno em ração à base de milho.

3.13.1 Contagem de *Fusarium* spp.

Dez gramas de amostras de ração foram misturadas com 90 mL de PBS 0,15 M estéril e diluições seriadas foram realizadas em tubos contendo 9 mL da mesma solução diluente (1 mL da suspensão de amostra em 9 mL de solução diluente) até a diluição 10^{-4} . De cada diluição, 1 mL foi transferido para placas de Petri (triplicata) contendo 25mL de BDA adicionado de cloranfenicol (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e ácido tartárico, seguido de incubação a 28°C por 7 dias. Após esse período, a contagem de colônias de *Fusarium* spp foi realizada.

A suspensão restante foi filtrada utilizando papel filtro Whatman No. 1 e estocada a -20°C para a análise da presença de exoantígeno de *F. verticillioides* por ELISA competitivo indireto.

3.13.2 ELISA Competitivo Indireto

A detecção e a determinação da concentração de exoantígeno de *F. verticillioides* nas amostras de ração foram realizadas através de ELISA competitivo indireto descrito por Meirelles et al. (2006b) com algumas modificações.

A placa de ELISA foi sensibilizada com exoantígeno de *F. verticillioides* 97K em tampão carbonato bicarbonato 0,2 M por 16 horas a 4°C. Após lavagens com PBS-T os poços foram bloqueados com PBS leite desnatado 1% por 3 horas a 25°C. Após nova lavagem com PBS-T, 50 µL de IgG de coelho anti-proteína de 67 kDa do exoantígeno de *F. verticillioides* 97K e 50 µL do filtrado das amostras de ração foram adicionados aos poços e a placa foi incubada por 16 horas a 4°C. Após uma nova lavagem com PBS-T, 100 µL de conjugado peroxidase anti-IgG de coelho na diluição 1:8000 em PBS leite desnatado 1% foram adicionados e a placa foi incubada por 1,5 h a 25°C. Posteriormente à nova lavagem com PBS-T, 100 µL de substrato (H₂O₂/tetrametilbenzidina) foram adicionados e sucedeu-se a incubação por 8 minutos a 25°C. A reação foi bloqueada pela adição de 50 µL de H₂SO₄ 1 M e a absorvância foi determinada a 450nm (iMark™ microplate reader). O resultado foi expresso em porcentagem de ligação:

$$\text{Ligação (\%)} = \frac{\text{Absorvância na presença de antígeno solúvel}}{\text{Absorvância na ausência de antígeno solúvel}} \times 100$$

O limite de detecção foi estimado como a concentração mínima que apresenta inibição de 22% (3 vezes SD de 0ng de exoantígeno/mL) detectado por ELISA competitivo indireto (IIJIMA et al. 1996).

3.13.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

As fumonisinas B₁ e B₂ foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) de acordo com Shephard et al. (1990) com algumas modificações (UENO et al., 1993).

Para extração de fumonisinas, uma alíquota de 10 g de ração misturada a 30 mL de metanol:água (3:1, v/v) foi agitada a 150 rpm por 30 minutos e filtrada em papel filtro Whatman n° 1. O filtrado (1 mL) foi submetido à pré-limpeza em minicoluna de troca aniônica Sep-Pak accell plus QMA (Waters Co., Ltda, Milford, Estados Unidos da América), previamente acondicionada com 5 mL de metanol seguido de 5 mL de metanol:água (3:1, v/v). Após lavagem da coluna com 6 mL de metanol:água (3:1, v/v) seguidos por 3 mL de metanol, as fumonisinas foram eluídas com 10 mL de ácido acético 0,5% em metanol. O eluato foi seco a 45°C em chapa aquecedora e o resíduo ressuspensa em 800 µL de metanol:água (3:1, v/v). Este foi fracionado em alíquotas de 200 µL, as quais foram secas sob fluxo de gás N₂ a 45°C, procedendo-se o acondicionamento em freezer (-20°C) para posterior análise de fumonisinas.

A alíquota de 200 µL foi ressuspensa em acetonitrila:água (1:1, v/v) e submetida à derivatização com 200 µL de o-ftaldialdeído (OPA) (40 mg de OPA, 1 mL de metanol, 5 mL de tetraborato de sódio 0,1 M e 50 µL de 2-mercaptoetanol). A amostra foi injetada em 1 minuto no sistema cromatográfico (isocrático de fase reversa) utilizando como fase móvel metanol:fosfato de sódio (CH₃OH:NaH₂PO₄) 0,1 mol/L (80:20, v/v) pH 3,3 ajustado com ácido orto-fosfórico e fluxo de 1 mL/min. O sistema constitui-se de bomba Shimadzu LC-10 AD, detector de fluorescência RF-10AXL e coluna C18 Luna 5µ 100Å (4,6 x 250mm, Phenomenex). Os comprimentos de onda de excitação e emissão foram de 335 nm e 450 nm, respectivamente. Os limites de detecção para FB₁ e FB₂ foram de 0,030µg/g para ambos, definidos como a quantidade mínima de toxina que gerou um pico cromatográfico cinco vezes maior que a razão altura/ruído da linha base (baseline).

3.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

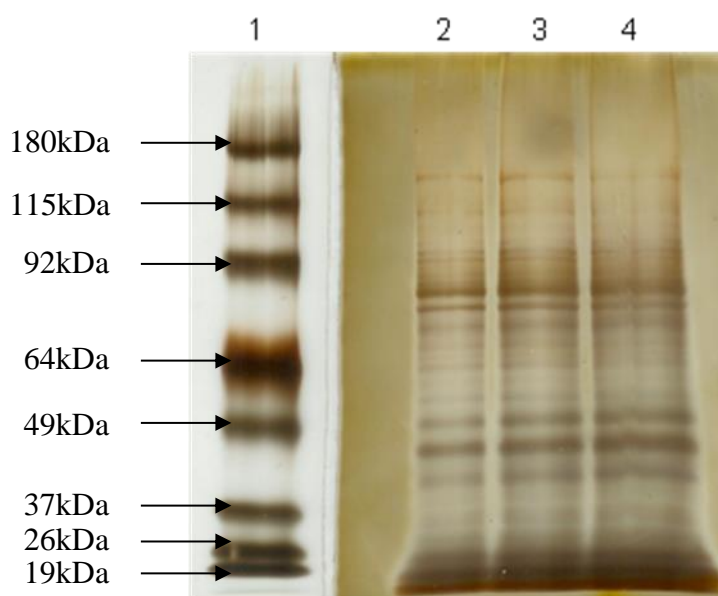
O Teste de Correlação de Pearson foi utilizado para analisar a correlação entre a concentração de exoantígeno de *F. verticillioides* e a contagem de *Fusarium* spp. e a concentração de fumonisinas. E a presença de correlação entre as variáveis do Teste de Correlação de Pearson foi avaliada pelo teste t, onde $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. A Análise Estatística foi realizada pelo programa STATISTICA versão 7.0 (Statsoft Inc., Tulsa, Estados Unidos da América).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O exoantígeno de *F. verticillioides* 97K apresentou concentração de proteína de 112 $\mu\text{g/mL}$.

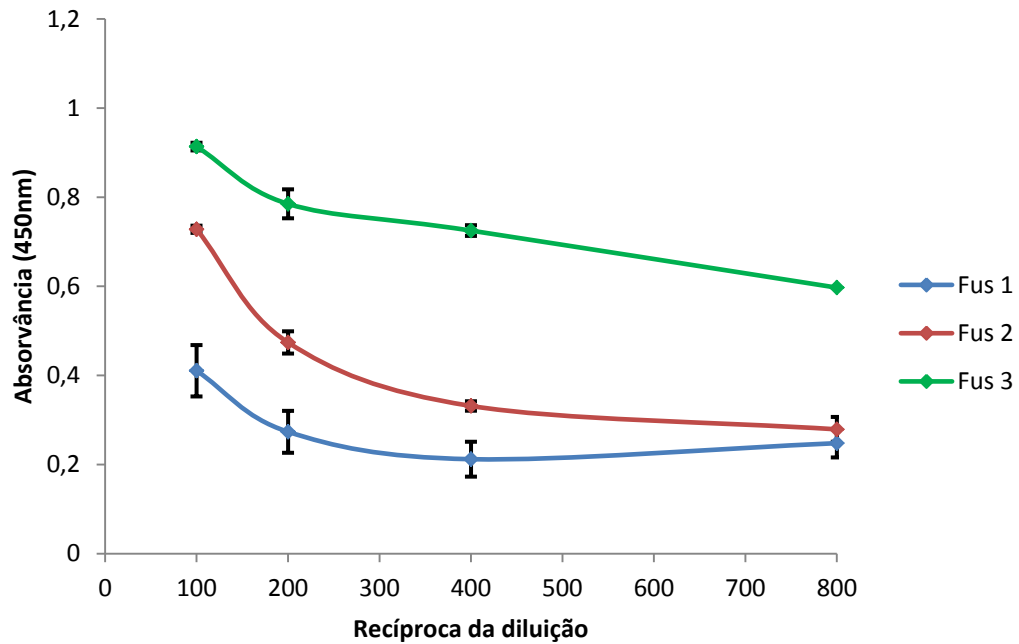
Na eletroforese, o exoantígeno apresentou proteínas com massas moleculares aparentes entre 26 a 145 kDa (Figura 5).

Figura 5 – Perfil eletroforético do exoantígeno de *F. verticillioides* 97K: (1) Padrão de massa molecular; (2) 3 μg ; (3) 5 μg ; (4) 7 μg de exoantígeno.



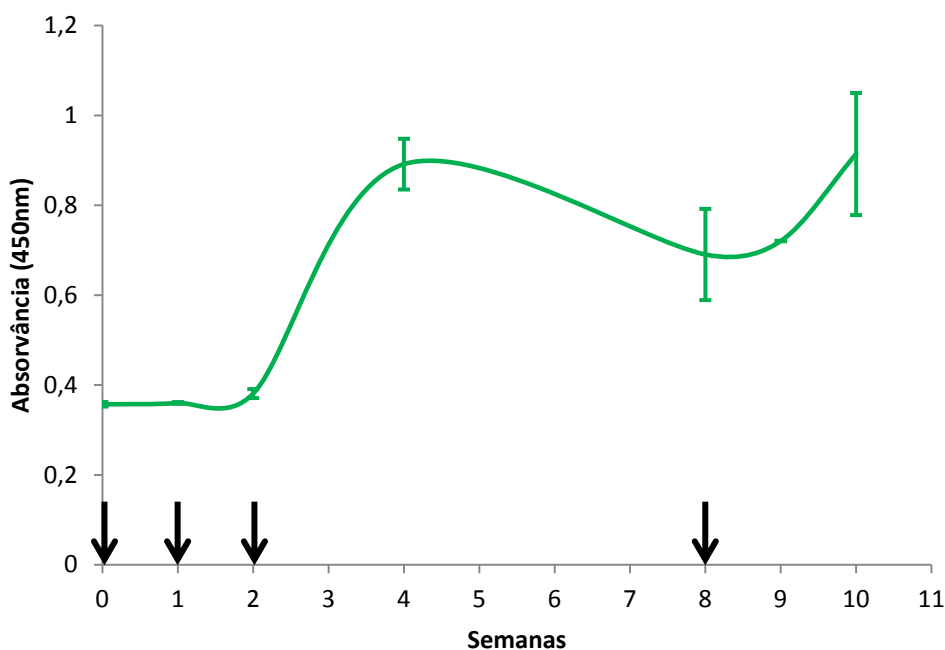
No ELISA indireto, os anticorpos policlonais da galinha Fus3 apresentaram a maior reatividade contra exoantígeno de *F. verticillioides* 97K, seguido da galinha Fus2 (Figura 6).

Figura 6 – Reatividade da IgY das galinhas poedeiras ao exoantígeno de *F. verticillioides* 97K avaliada por ELISA indireto.



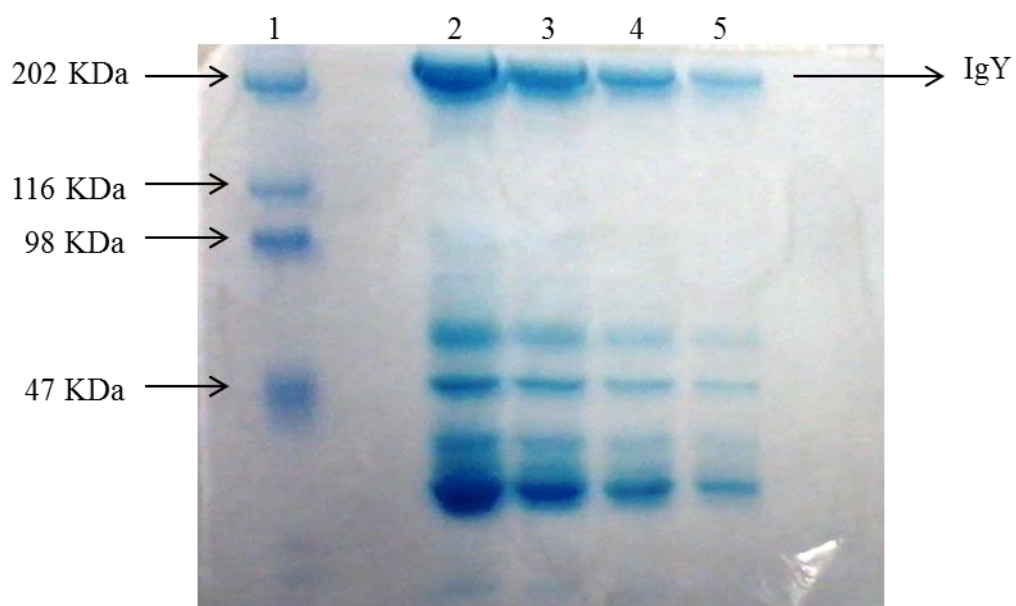
A galinha Fus3 que produziu anticorpos com maior reatividade contra exoantígeno de *F. verticillioides*, recebeu uma dose de reforço 5 semanas após a terceira dose e duas semanas depois a resposta imune humoral foi avaliada por ELISA indireto (Figura 7).

Figura 7 – Resposta da galinha Fus3 às imunizações avaliada por ELISA indireto utilizando IgY na diluição 1:200 e exoantígeno de *F. verticillioides* 97K a 12,5 µg/mL. As setas indicam as semanas em que foram aplicadas as doses de exoantígeno de *F. verticillioides* 97K na galinha.



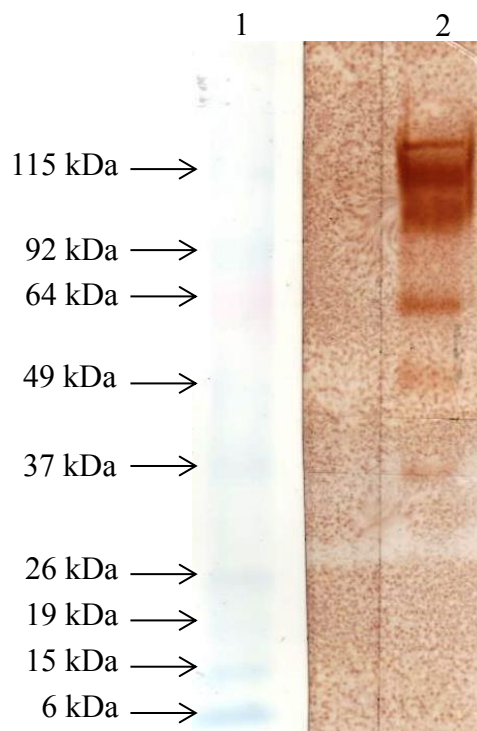
Foi realizada então a extração de IgY de três gemas. As gemas foram obtidas dos ovos coletados na segunda semana após a dose de reforço, pois apresentaram maior reatividade contra o exoantígeno do fungo. A IgY extraída apresentou uma concentração de proteína de 30 mg/mL e a sua análise por SDS-PAGE (Figura 8) demonstrou a presença de IgY que possui massa molecular de 206 kDa (TENENHOUSE; DEUTSCH, 1966), além de outras proteínas contaminantes de massas moleculares de aproximadamente 160 kDa, 95 kDa, 80 kDa, 72 kDa, 62 kDa, 59 kDa, 47 kDa e 36 kDa, 30 kDa e 27 kDa.

Figura 8 – Perfil eletroforético da IgY extraída da gema da galinha Fus3: (1) Padrão de massa molecular; (2) 50µg; (3) 30 µg; (4) 20 µg; (5) 10 µg de IgY.



Foi realizado então o “Western blot” utilizando exoantígeno de *F. verticillioides* 97K puro e anticorpo anti-97K purificado na diluição 1:250 (Figura 9). A IgY reconheceu 8 proteínas do exoantígeno de *F. verticillioides* 97K com massas moleculares aparentes de 158 kDa; 134 kDa; 113 kDa; 95 kDa; 91 kDa; 67 kDa; 46 kDa; 29 kDa.

Figura 9 – Reatividade do anticorpo anti-97K contra exoantígeno de *F. verticillioides* 97K avaliada por “Western blot”: (1) Padrão de massa molecular; (2) Exoantígeno de *F. verticillioides* 97K.



A reatividade da IgY anti-97K contra outras espécies fúngicas (*F. sporotrichioides*, *F. graminearum*, *F. subglutinans*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *P. brevicompactum*, *P. variable*, *P. funiculosum* e *P. purpurogenum*) foi avaliada por ELISA indireto (Figura 10) e mostrou que a IgY anti-97K apresenta reatividade cruzada com antígenos de outras espécies fúngicas variando de 8% (*P. brevicompactum*) a 103% (*F. subglutinans*) (Tabela 2). Essa reatividade foi mais evidente com exoantígeno de espécies do mesmo gênero (*F. subglutinans*, *F. sporotrichioides* e *F. graminearum* com reatividade cruzada de 103%, 93% e 39% respectivamente) e com o exoantígeno de *A. niger* (73%). Com as demais espécies fúngicas, a reatividade cruzada variou de 8 a 31% (*P. purpurogenum*).

A comparação da reatividade dos anticorpos IgY pré-imune e imune contra o exoantígeno de outras espécies fúngicas (Figura 10) indicou contato prévio por *A. niger*, uma vez que o anticorpo pré-imune apresentou reatividade semelhante ao anticorpo imune. Por outro lado, a reatividade ao exoantígeno das outras espécies de *Fusarium* (*F. sporotrichioides*, *F. graminearum* e *F. subglutinans*) aumentou de forma acentuada após as imunizações, sugerindo que neste caso houve reatividade cruzada do anticorpo IgY produzido contra o exoantígeno dessas espécies fúngicas. Além disso, a imunização da galinha também resultou

em aumento da reatividade dos anticorpos contra os exoantígenos de *A. ochraceus*, *P. variabile*, *P. funiculosum* e *P. purpurogenum*, sugerindo uma possível reatividade cruzada com essas espécies fúngicas.

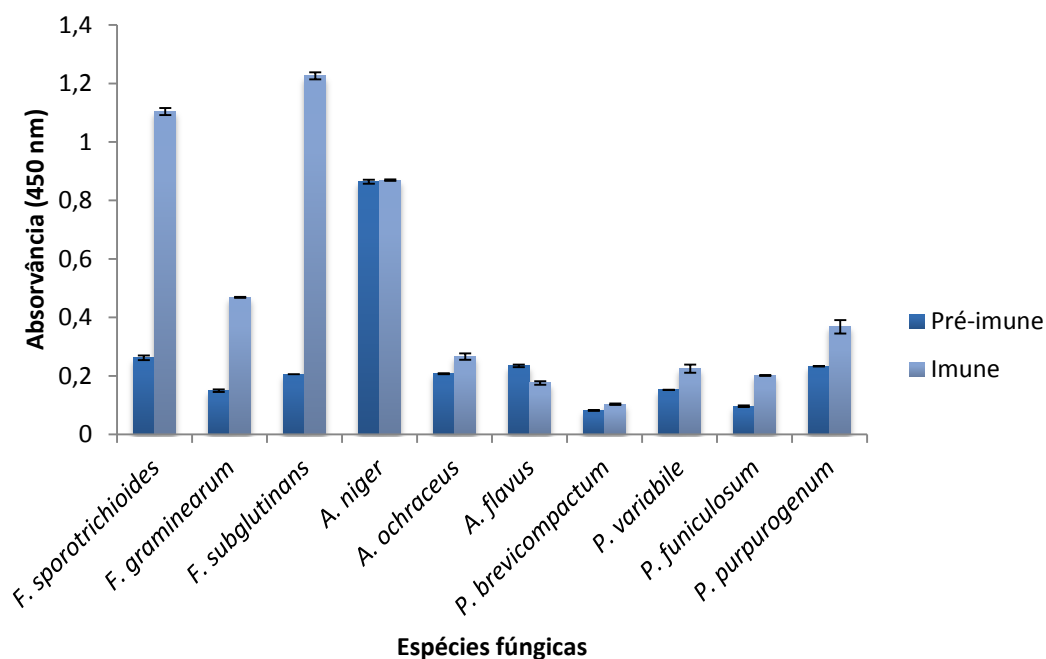
Esta reatividade cruzada (Tabela 2) pode ocorrer pelo fato do anticorpo utilizado no trabalho ser policlonal e pela presença de epítomos semelhantes aos do exoantígeno de *F. verticillioides* 97K nos exoantígenos dos outros fungos testados.

Estes dados são semelhantes aos relatados por Gan et al. (1997) e por Biazon et al. (2006) que observaram que anticorpos produzidos contra exoantígeno de fungos do gênero *Fusarium* apresentam reatividade cruzada com exoantígeno de outras espécies de fungo, principalmente com espécies do mesmo gênero.

Tabela 2 – Reatividade cruzada da IgY de galinha anti-exoantígeno de *F. verticillioides* 97K com exoantígenos de outras espécies fúngicas avaliada por ELISA indireto.

Exoantígenos	Reatividade cruzada (%)
<i>F. subglutinans</i>	103
<i>F. sporrichioides</i>	93
<i>F. graminearum</i>	39
<i>A. niger</i>	73
<i>A. ochraceus</i>	22
<i>A. flavus</i>	14
<i>P. purpurogenum</i>	31
<i>P. variabile</i>	19
<i>P. funiculosum</i>	17
<i>P. brevicompactum</i>	8

Figura 10 – Reatividade dos anticorpos policlonais IgY pré-imune e imune contra exoantígenos de outras espécies fúngicas avaliada por ELISA indireto.



A reatividade da IgY anti-97K contra outras espécies de fungos (*F. sporotrichioides*, *F. graminearum*, *F. subglutinans*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *P. brevicompactum* e *P. purpurogenum*) também foi avaliada por “Western blot” (Figura 11). Diversas proteínas dos exoantígenos dos fungos avaliados, principalmente os do gênero *Fusarium*, foram reconhecidas pelo anticorpo anti-97K (Tabela 3 e Figura 11), sendo essa reatividade mais evidente contra os componentes de massa molecular elevada, possivelmente por apresentarem maior imunogenicidade em decorrência da sua massa molecular e complexidade.

Figura 11 – Reatividade da IgY anti-97K contra exoantígenos de diferentes espécies fúngicas analisada por “Western blot”: (1) Padrão de massa molecular; (2) *F. verticillioides* 97K; (3) *F. subglutinans*; (4) *F. sporotrichioides*; (5) *F. graminearum*; (6) *A. flavus*; (7) *A. niger*; (8) *A. ochraceus*; (9) *P. brevicompactum*; (10) *P. purpurogenum*.

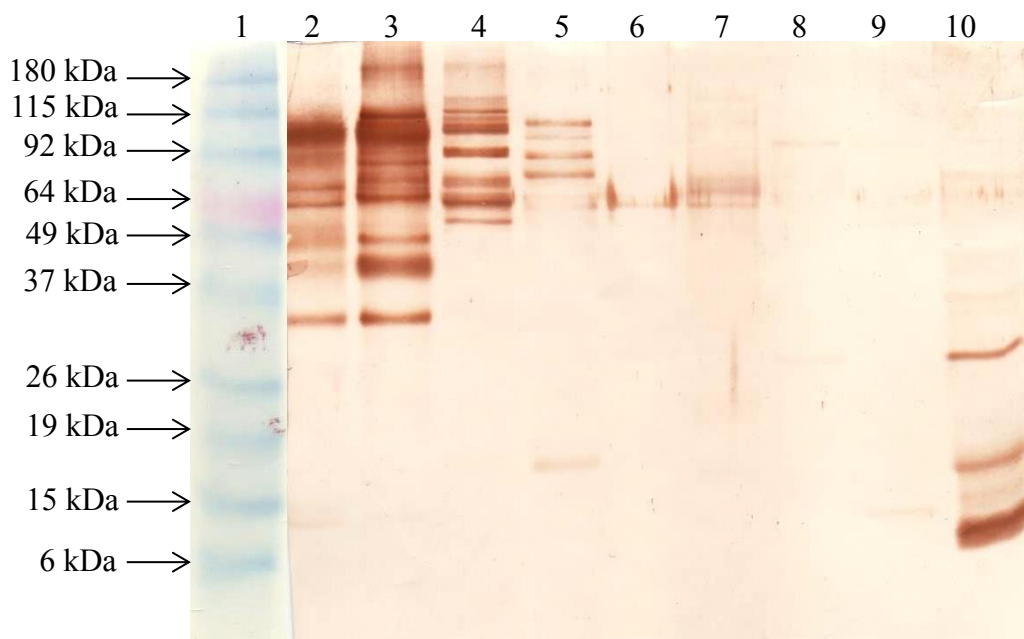


Tabela 3 – Massa molecular aparente das proteínas reconhecidas pela IgY anti-exoantígeno de *F. verticillioides* 97K nos exoantígenos de diferentes fungos analisados.

Fungos	Banda	Massa Molecular (kDa)
<i>F. subglutinans</i>	1	168
	2	128
	3	119
	4	110
	5	102
	6	94
	7	84
	8	79
	9	76
	10	60
	11	51
	12	36
<i>F. sporotrichoides</i>	1	168
	2	138
	3	128
	4	123
	5	116
	6	112
	7	102
	8	84
	9	79
	10	75
	11	67
<i>F. graminearum</i>	1	119
	2	110
	3	98
	4	87
	5	79
	6	72
	7	15
<i>A. flavus</i>	1	72
<i>A. niger</i>	1	133
	2	119
	3	114
	4	98
	5	81
	6	79
	7	72
<i>A. ochraceus</i>	1	106
	2	28
<i>P. brevicompactum</i>	1	11
<i>P. purpurogenum</i>	1	81
	2	49
	3	38
	4	27
	5	13
	6	9

Diversos pesquisadores buscaram desenvolver técnicas imunológicas para detectar fungos em alimentos e tiveram problemas com a reatividade cruzada apresentada pelos anticorpos produzidos. Alguns ensaios imunoenzimáticos desenvolvidos apresentaram potencial para a detecção de gêneros fúngicos.

Notermans e Heuvelman (1985) desenvolveram um ELISA para detectar fungos em alimentos processados e não processados, utilizando antígenos de *Penicillium verrucosum* var. *cyclopium*, *Mucor racemosus* e *Fusarium oxysporum*. As frações antigênicas de *F. oxysporum* apresentaram reação cruzada evidente com outras espécies do mesmo gênero e pouca reação com outros gêneros. Concluiu-se neste trabalho que os antígenos eram termoestáveis, gênero-específicos e detectáveis apenas em alimentos contaminados.

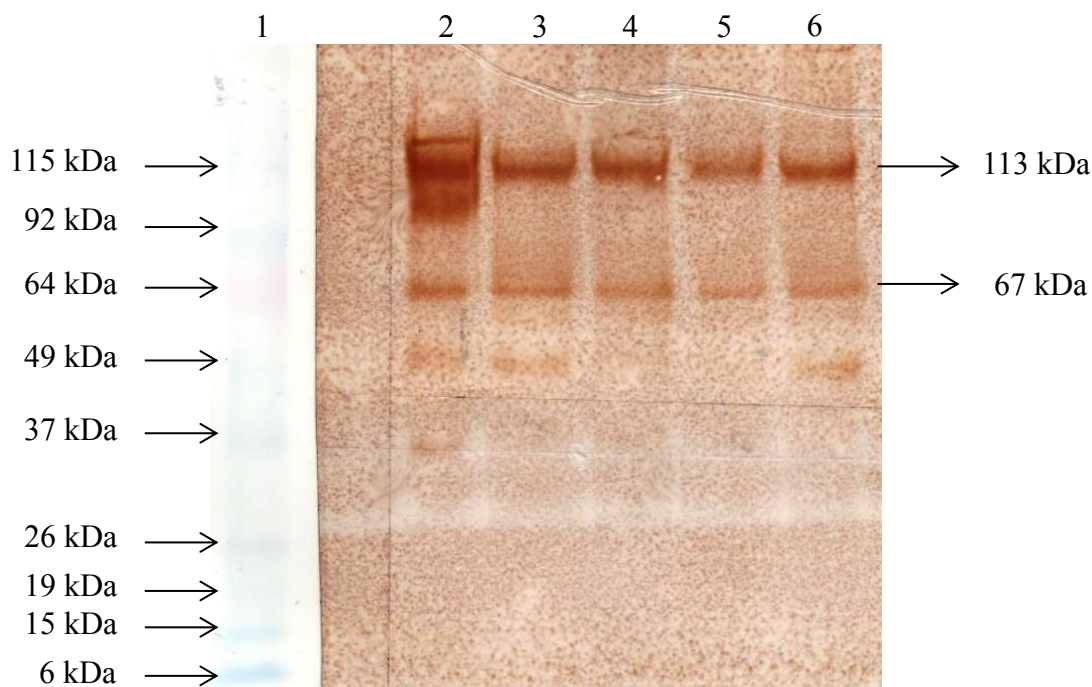
Gan et al. (1997) desenvolveram um ensaio imunoenzimático capaz de identificar espécies toxigênicas de *Fusarium*. Galinhas foram imunizadas com antígenos micelianos solúveis e exoantígenos de *F. sporotrichioides*, *F. poae* e *F. graminearum*, seguida de caracterização dos anticorpos por ELISA. Os anticorpos produzidos contra os antígenos micelianos solúveis apresentaram reatividade cruzada com os antígenos de outros gêneros, inviabilizando a sua utilização na imunodeteção. Por outro lado, os anticorpos contra o exoantígeno de *F. poae* eram espécie-específicos. Os resultados mostraram que os exoantígenos eram mais adequados para a produção de anticorpos específicos do que os antígenos micelianos solúveis e que ensaios imunoenzimáticos com exoantígenos podem ser empregados para imunodeteção de *Fusarium* spp.

Iyer e Cousin (2003) desenvolveram um ELISA indireto para detectar espécies de *Fusarium* em fubá, utilizando antígenos miceliais de *F. verticillioides* e *F. graminearum*. A especificidade dos anticorpos policlonais foi avaliada contra 70 espécies de fungos e leveduras pertencentes a 23 gêneros. Os resultados mostraram que não houve reatividade cruzada para a maioria dos fungos e para nenhuma das leveduras analisadas. Entre os fungos avaliados, *Eurotium repens*, espécies de *Monascus*, *Phoma exigua*, *Verticillium albo-altrum* e a maioria das espécies de *Fusarium* apresentaram reatividade superior a 30%. Esta reatividade cruzada com as quatro espécies não pertencentes ao gênero *Fusarium* pode ser devido à presença de epítomos em comum com as espécies utilizadas para a produção de anticorpos. Os fungos puderam ser detectados por ELISA num período de 24 a 36 horas após a inoculação no fubá embora ainda não pudessem ser visualizados pelo método de contagem em placa, indicando que o ELISA indireto desenvolvido no estudo pode detectar espécies de *Fusarium* mais rapidamente que o método tradicional de contagem em placa.

No presente estudo, a análise da reatividade da IgY anti-97K ao exoantígeno de diferentes isolados de *F. verticillioides* (97K, 119Br, 104Ga, 164G e 103Br) por meio de “Western blot” (Figura 12) mostrou que o anticorpo reage com algumas proteínas desses exoantígenos e que existem duas proteínas com massas moleculares de aproximadamente 67 kDa e 113 kDa reconhecidas em todos os isolados de *F. verticillioides*. Estas duas proteínas apresentam portanto potencial para serem antígenos espécie-específicos.

Biazon et al. (2006) obtiveram resultado semelhante com anticorpos policlonais de coelho contra exoantígeno de diferentes isolados de *F. verticillioides*. Como os anticorpos contra o exoantígeno do isolado 97K apresentaram maior título (1:12800) no ELISA indireto, este foi utilizado para outros testes. No teste de “Western blot” realizado para avaliar a reatividade do anticorpo anti-97K contra exoantígeno de outros isolados de *F. verticillioides*, duas proteínas de massas moleculares de aproximadamente 67 kDa e 113 kDa também foram observadas em todos os isolados analisados.

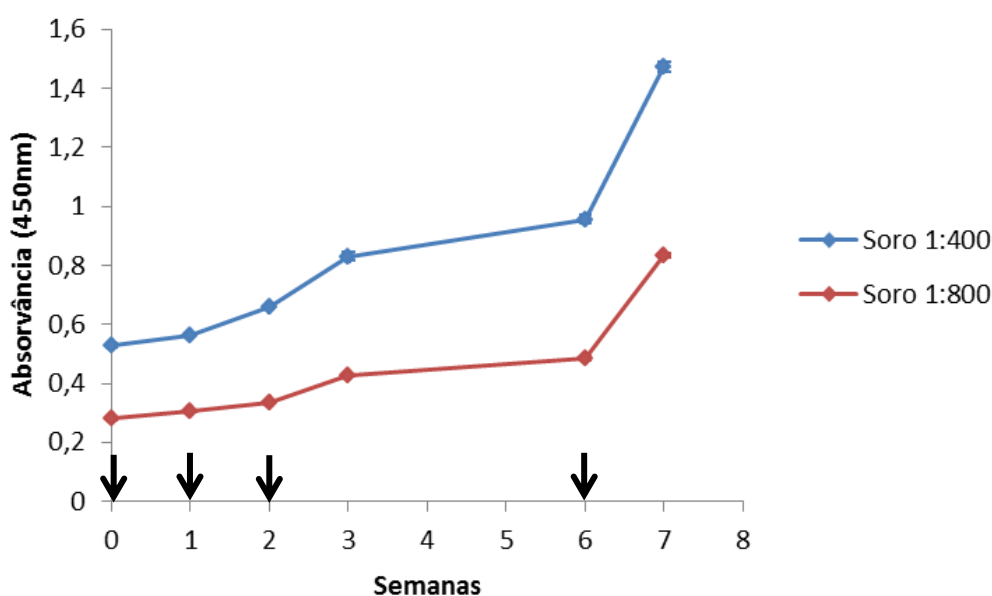
Figura 12 – Reatividade da IgY anti-97K contra exoantígenos de diferentes isolados de *F. verticillioides* avaliada por “Western blot”: (1) Padrão de massa molecular; (2) 97K; (3) 119Br; (4) 104Ga; (5) 164G ; (6) 103Br.



Assim, a purificação destas proteínas detectadas em todos os isolados de *F. verticillioides* analisados seria interessante para avaliar a sua utilização no desenvolvimento de um método de imunodeteção específica para *F. verticillioides*, uma vez que podem ser antígenos espécie-específicos.

Para aumentar a especificidade do teste de ELISA desenvolvido neste estudo, um coelho foi imunizado com a proteína de 67 kDa e a sua resposta à imunização foi avaliada por ELISA indireto (Figura 13).

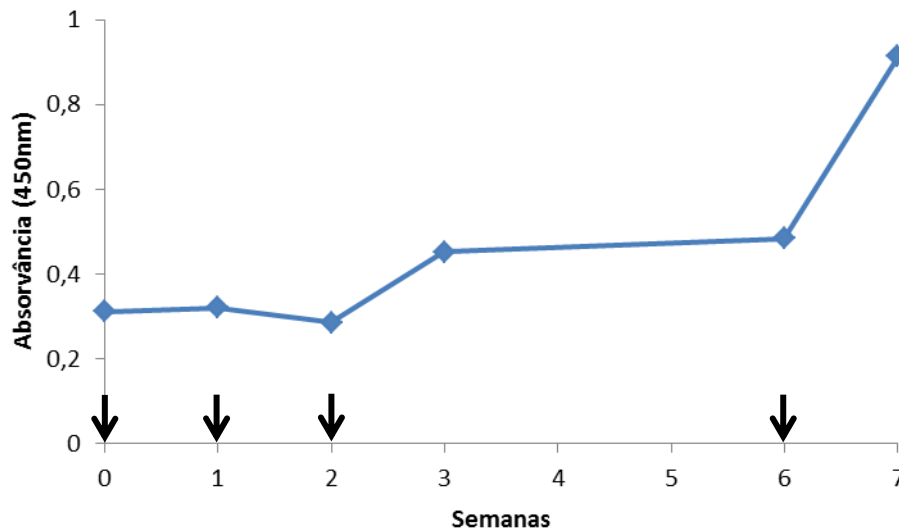
Figura 13 – Resposta do coelho às imunizações com a proteína de 67 kDa avaliada por ELISA indireto utilizando soros nas diluições 1:400 e 1:800 e exoantígeno de *F. verticillioides* 97K bruto. As setas indicam as semanas em que foram aplicadas as doses da proteína no coelho.



O resultado do ELISA indireto mostrou que o coelho respondeu às imunizações e que os anticorpos produzidos reconhecem o exoantígeno de *F. verticillioides* 97K bruto.

Os soros do coelho também foram avaliados quanto à sua reatividade com a proteína de 67 kDa purificada do exoantígeno de *F. verticillioides* 97K por ELISA indireto (Figura 14).

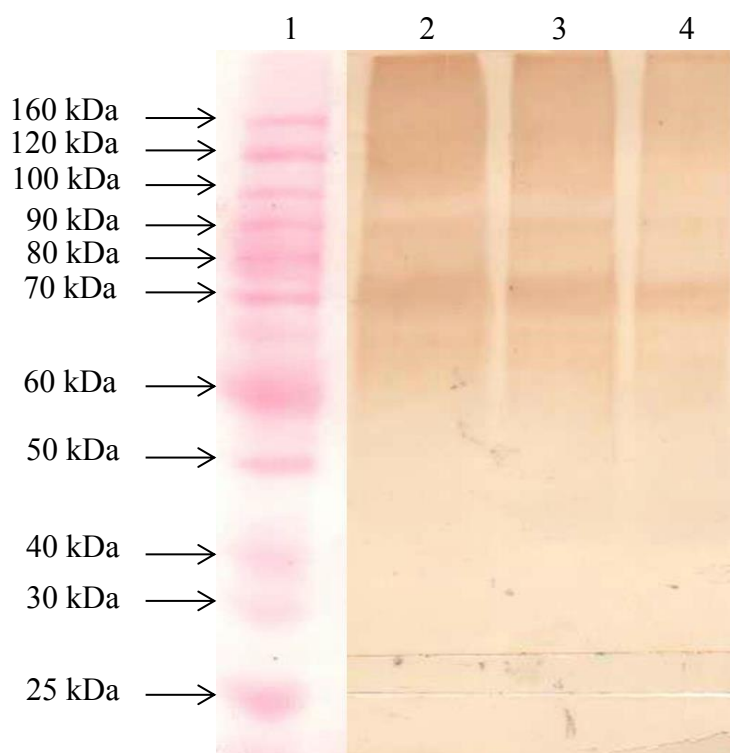
Figura 14 – Resposta imune humoral do coelho à imunização com a proteína de 67 kDa avaliada por ELISA indireto utilizando soro na diluição 1:400 e proteína de 67 kDa purificada. As setas indicam as semanas em que foram aplicadas as doses da proteína no coelho.



A figura 14 mostra que a reatividade dos soros do coelho contra a proteína de 67 kDa aumenta após as imunizações, indicando que o coelho respondeu às imunizações e produziu anticorpos que reconhecem a proteína de 67 kDa.

O resultado do “Western blot” para avaliar a reatividade do soro do coelho às diferentes proteínas do exoantígeno de *F. verticillioides* 97K bruto mostrou que o anticorpo de coelho reconhece a proteína de 67 kDa (Figura 15).

Figura 15 – Reatividade da IgG de coelho anti-proteína de 67 kDa às proteínas do exoantígeno de *F. verticillioides* 97K bruto em diferentes concentrações avaliada por “Western blot”: Concentração do exoantígeno – (1) Padrão de massa molecular; (2) 50 µg/mL; (3) 35 µg/mL; (4) 17 µg/mL.



Os anticorpos produzidos pelo coelho foram então avaliados quanto à sua especificidade através de ELISA indireto com exoantígeno de outras espécies fúngicas (*F. sporotrichioides*, *F. graminearum*, *F. subglutinans*, *A. flavus*, *A.niger*, *A. ochraceus*, *P. brevicompactum*, *P. variabile*, *P. funiculosum* e *P. purpurogenum*). A reatividade apresentada pelo anticorpo anti-proteína de 67 kDa contra o exoantígeno de outras espécies fúngicas variou de 12 (*P. variabile* e *P. funiculosum*) a 130% (*F. subglutinans*) (Tabela 4). A alta reatividade observada contra o exoantígeno de *F. subglutinans* pode ter ocorrido devido à infecção prévia do coelho por este fungo, uma vez que o soro pré-imune também apresentou alta reatividade contra esse exoantígeno, e à potencialização dessa reatividade após as imunizações do coelho, uma vez que se observa um aumento na reatividade após as imunizações (Figura 16).

A reatividade do soro do coelho foi mais elevada contra o exoantígeno de *F. sporotrichoides* e *F. graminearum* em comparação com a reatividade contra o exoantígeno das outras espécies (Tabela 4). A comparação da reatividade dos soros pré-imune e imune

contra os diferentes exoantígenos mostrou que a imunização do coelho com a proteína de 67 kDa levou a um pequeno aumento da reatividade dos anticorpos contra o exoantígeno de *F. sporotrichioides*, *F. graminearum*, *F. subglutinans* e *A. flavus*, indicando uma possível reatividade cruzada dos anticorpos contra os exoantígenos dessas espécies fúngicas (Figura 16).

O aumento na reatividade dos anticorpos contra os exoantígenos das outras espécies de *Fusarium* após as imunizações (Figura 17) foi muito mais evidente com o anticorpo IgY anti-97K. Houve um aumento de 4,2 vezes na reatividade contra o exoantígeno de *F. sporotrichioides*, de 3,1 vezes contra o exoantígeno de *F. graminearum* e de 5,9 vezes contra o exoantígeno de *F. subglutinans* após as imunizações. Por outro lado, a reatividade do anticorpo anti-proteína de 67 kDa aumentou 1,2 vezes contra o exoantígeno de *F. sporotrichioides*, 1,4 vezes contra o exoantígeno de *F. graminearum* e 1,5 vezes contra o exoantígeno de *F. subglutinans* após as imunizações, indicando que a reatividade cruzada dos anticorpos produzidos contra exoantígeno bruto de *F. verticillioides* 97K é maior que a dos anticorpos produzidos contra a proteína de 67 kDa do exoantígeno.

Os anticorpos policlonais produzidos em coelhos contra exoantígeno de *F. verticillioides* 97K por Biazon et al. (2006) também apresentaram reatividade cruzada baixa com outros gêneros fúngicos (4,5% - 14,7%) e alta com fungos do gênero *Fusarium*, variando entre 51,2% e 76,6%.

A reatividade cruzada com exoantígeno de *F. sporotrichioides* que era de 65,77% com anticorpo produzido por Biazon et al. (2006) e de 93% com o anticorpo IgY anti-97K produzido no presente trabalho, passou para 37% com o anticorpo de coelho anti-proteína de 67 kDa. A reatividade cruzada do anticorpo anti-proteína de 67 kDa contra exoantígeno de *F. graminearum* também foi menor (32%) quando comparada com o anticorpo produzidos por Biazon et al. (2006) (51,16%) e com o anticorpo IgY produzido no presente trabalho (39%), sugerindo que o anticorpo policlonal contra a proteína de 67 kDa apresenta maior especificidade com o exoantígeno de *F. verticillioides*.

Tabela 4 – Reatividade cruzada da IgG de coelho anti-proteína de 67 kDa do exoantígeno de *F. verticillioides* 97K com os exoantígenos de outras espécies fúngicas avaliada por ELISA indireto.

Exoantígenos	Reatividade Cruzada (%)
<i>F. subglutinans</i>	130
<i>F. sporotrichioides</i>	37
<i>F. graminearum</i>	32
<i>A. niger</i>	23
<i>A. flavus</i>	19
<i>A. ochraceus</i>	18
<i>P. purpurogenum</i>	19
<i>P. brevicompactum</i>	18
<i>P. variabile</i>	12
<i>P. funiculosum</i>	12

Figura 16 – Reatividade da IgG de coelho pré-imune e imune contra exoantígenos de outras espécies fúngicas avaliada por ELISA indireto.

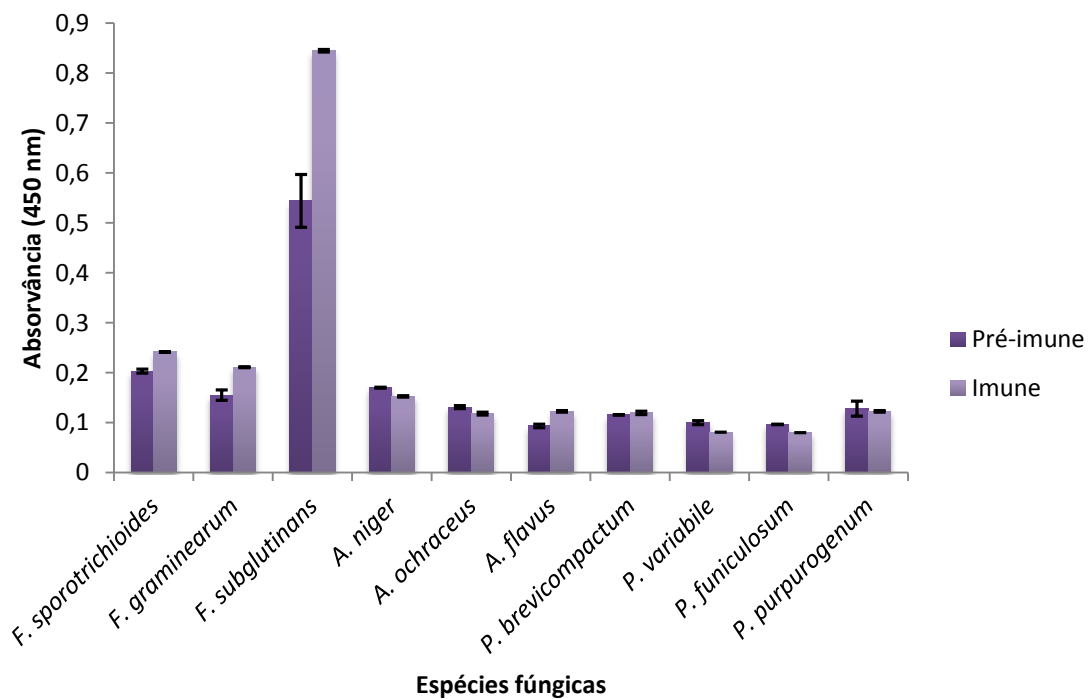
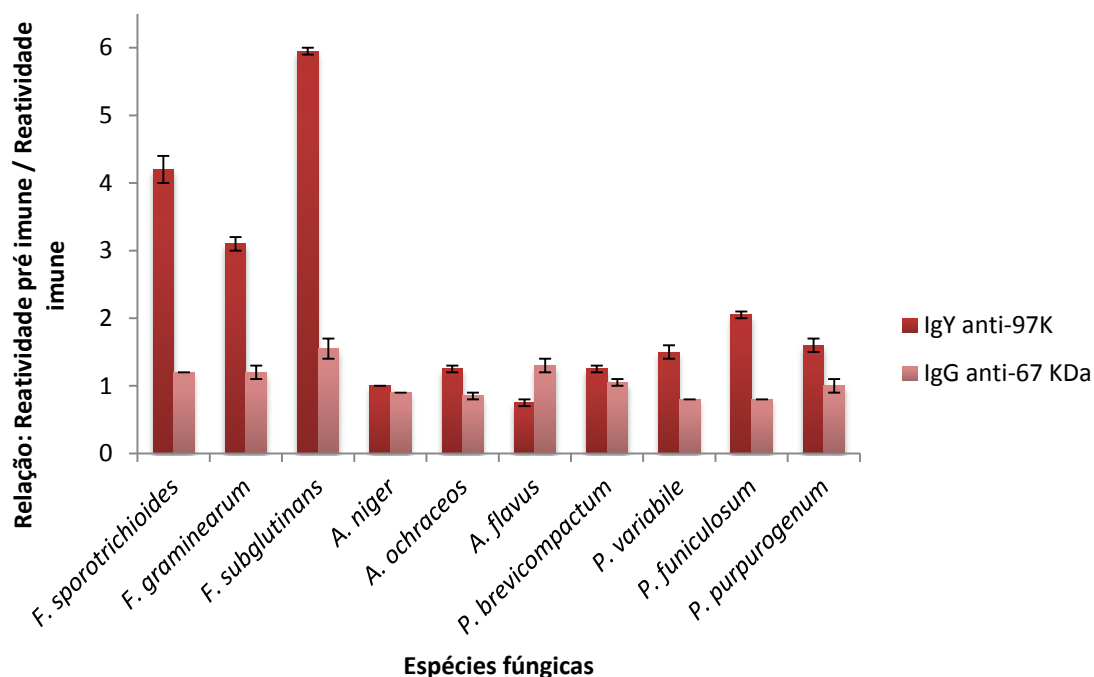


Figura 17 – Relação entre a reatividade dos anticorpos imune e pré imune contra o exoantígenos de diferentes espécies fúngicas.



Com o intuito de avaliar quais proteínas dos exoantígenos de outras espécies fúngicas o anticorpo anti-proteína de 67 kDa estava reconhecendo, um “Western blot” com os exoantígenos dessas espécies fúngicas (*F. sporotrichioides*, *F. graminearum*, *F. subglutinans*, *A. flavus*, *A.niger*, *A. ochraceus*, *P. brevicompactum*, *P. purpurogenum*) foi realizado (Figura 18). O número de proteínas reconhecidas pelo anticorpo anti-proteína de 67 kDa em exoantígenos de outras espécies fúngicas foi muito menor que o número de proteínas reconhecidas pelo anticorpo IgY anti-97K (Figura 11 e Figura 18) . Os exoantígenos de *F. sporotrichioides*, *F. subglutinans* e *P. purpurogenum* foram os que apresentaram maior número de proteínas reconhecidas pelo anticorpo anti-proteína de 67 kDa (Figura 18 e Tabela 5).

Figura 18 – Reatividade da IgG de coelho aos exoantígenos de *F. verticillioides* 97K e de outras espécies fúngicas avaliada por “Western blot”: (1) Padrão de massa molecular; (2) *F. verticillioides* 97K; (3) *F. subglutinans*; (4) *F. sporotrichioides*; (5) *F. graminearum*; (6) *A. flavus*; (7) *A. niger*; (8) *A. ochraceus*; (9) *P. brevicompactum*; (10) *P. purpurogenum*.

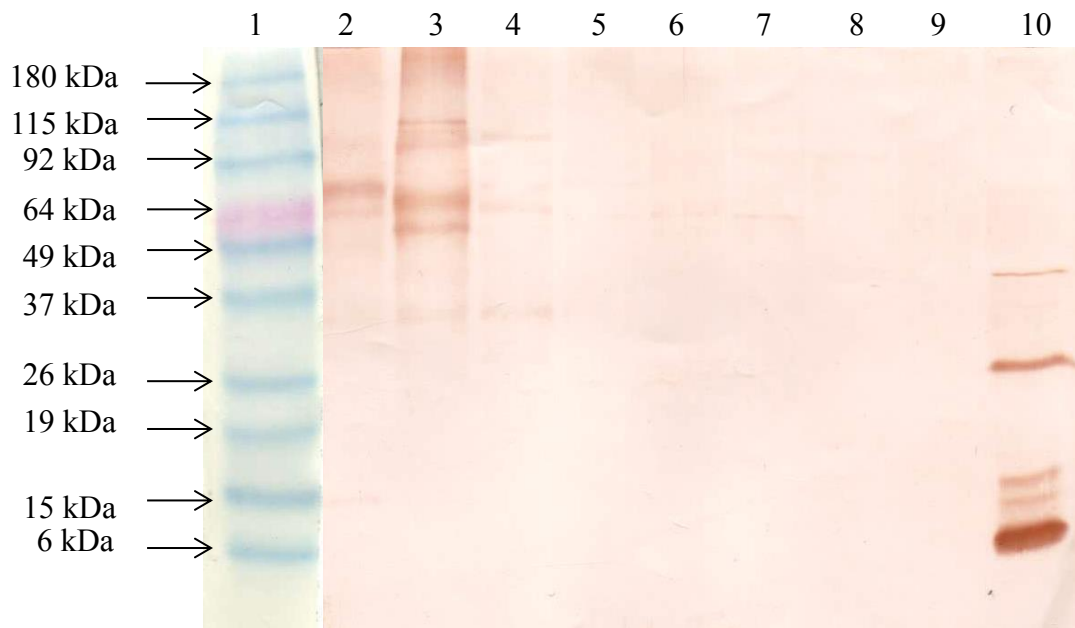
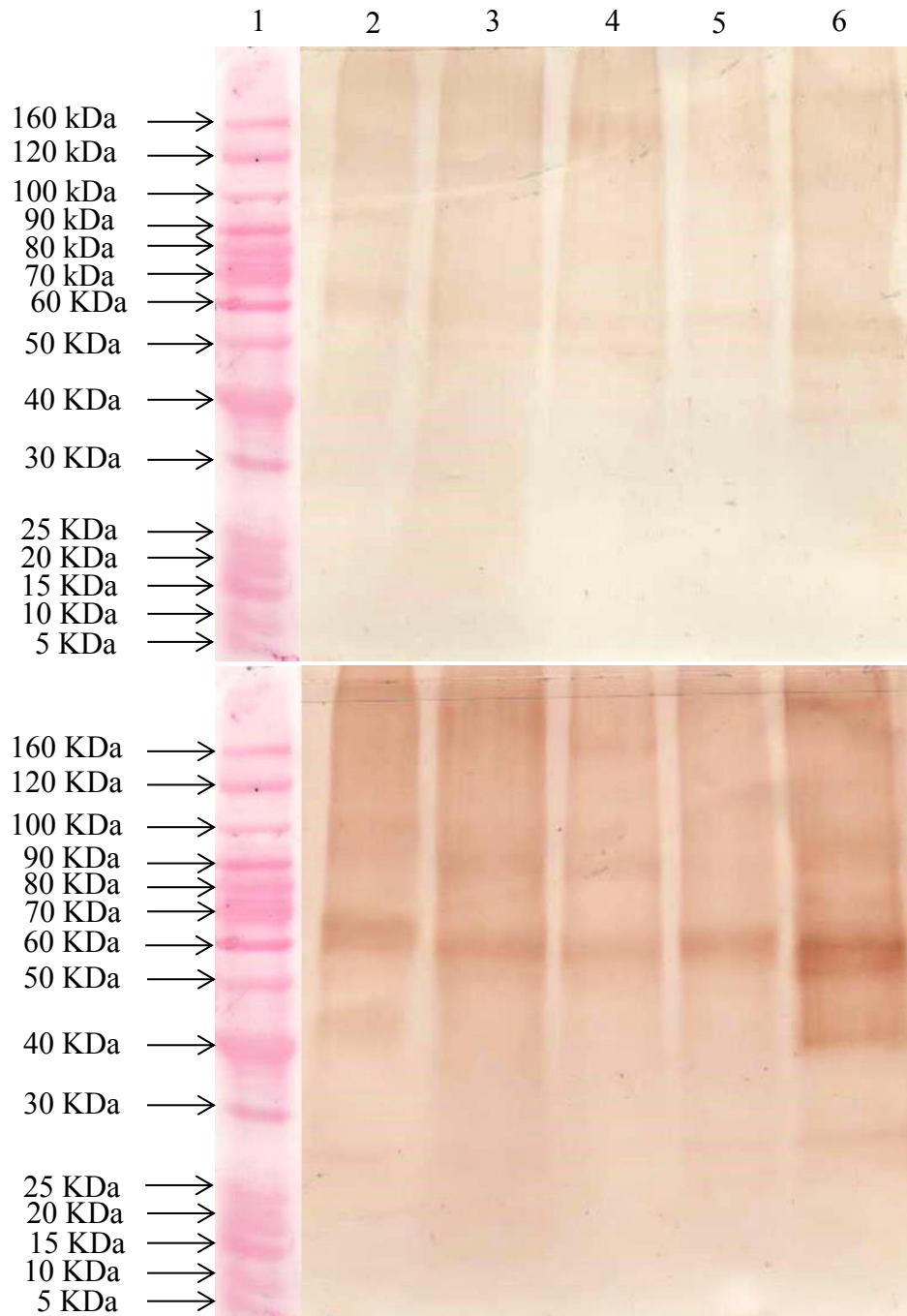


Tabela 5 – Massa molecular aparente das proteínas reconhecidas pelo anticorpo de coelho anti-proteína de 67 kDa do exoantígeno de *F. verticillioides* 97K nos exoantígenos de diferentes fungos analisados.

Fungos	Banda	Massa Molecular (kDa)
<i>F. subglutinans</i>	1	193
	2	127
	3	119
	4	111
	5	98
	6	75
	7	64
	8	35
<i>F. sporotrichioides</i>	1	115
	2	98
	3	81
	4	75
	5	37
<i>F. graminearum</i>	1	81
	2	64
<i>A. flavus</i>	1	64
<i>A. niger</i>	1	64
<i>P. purpurogenum</i>	1	50
	2	27
	3	13
	4	11
	5	8

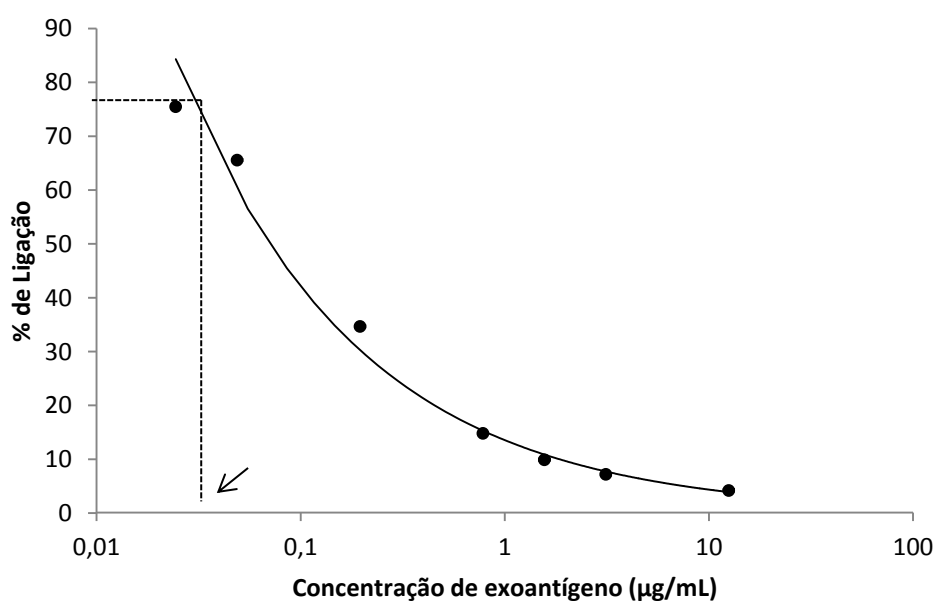
Para se avaliar o potencial do soro de coelho imunizado no reconhecimento de outros isolados de *F. verticillioides*, foi feito um “Western blot” com o exoantígeno dos isolados 119Br, 103Br, 164G, 104Ga de *F. verticillioides* e soros pré-imune e imune do coelho. O anticorpo de coelho após a imunização foi capaz de reconhecer a proteína de 67 kDa nos exoantígenos de outros isolados, sustentando a ideia de que esse antígeno é realmente espécie-específica (Figura 19)

Figura 19 – Reatividade do soro de coelho pré-imune (acima) e imune (abaixo) contra exoantígenos de diferentes isolados de *F. verticillioides* avaliada por “Western blot”: (1) Padrão de massa molecular; (2) 97K; (3) 119Br; (4) 103Br; (5) 164G; (6) 104Ga.



O ELISA competitivo indireto utilizando anticorpo de coelho anti-proteína de 67 kDa apresentou potencial para ser utilizado na detecção de exoantígeno em ração à base de milho destinada a alimentação de galinhas poedeiras. O limite de detecção foi de 0,029 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 20) e a concentração de exoantígeno de *F. verticillioides* nas amostras determinada por este ELISA variou de 2 $\mu\text{g/g}$ a 59,8 $\mu\text{g/g}$, com valor médio de 21,0 $\mu\text{g/g}$ (Tabela 6). Esta concentração de exoantígeno detectada em ração à base de milho foi menor que a relatada por Meirelles et al. (2006b), que analisaram 40 amostras de milho recém-colhidas da região Norte do Estado do Paraná quanto à concentração de exoantígeno de espécies de *Fusarium* seguindo o mesmo protocolo de ELISA competitivo indireto utilizado no presente trabalho e a concentração encontrada variou de 8,9 a 956,0 $\mu\text{g/g}$, com valor médio de 217,3 $\mu\text{g/g}$. Esta diferença na concentração de exoantígeno determinada nos dois trabalhos pode estar relacionada aos tipos de amostras analisadas (ração à base de milho e milho recém-colhido), uma vez que foram submetidas a diferentes formas de armazenamento e processamento, ou pode estar relacionada aos anticorpos utilizados, uma vez que o anticorpo utilizado no presente trabalho é mais específico para a espécie *Fusarium verticillioides* enquanto que o anticorpo utilizado por Meirelles et al. (2006b) detecta espécies de *Fusarium* em geral.

Figura 20 – Curva de calibração do exoantígeno no ELISA competitivo indireto. A seta indica o limite de detecção do ELISA competitivo indireto (0,029 $\mu\text{g/mL}$) para o exoantígeno de *F. verticillioides*.



As fumonisinas foram detectadas em 89% (FB₁) e 81,5% (FB₂) das amostras de ração, e os níveis variaram de 0,03 – 3,03 µg/g para FB₁, com média de 0,69 µg/g, e de 0,03 – 1,27 µg/g para FB₂, com média de 0,33 µg/g (Tabela 6). Concentrações semelhantes de fumonisina foram encontradas por Meirelles et al. (2006b). A fumonisina B₁ foi detectada em 100% das amostras e FB₂ em 52,5% das amostras de milho, com nível de contaminação variando de 0,03 – 2,4 µg/g para FB₁, com média de 0,64 µg/g, e 0,02 – 0,71 µg/g para FB₂, com média de 0,28 µg/g. Por outro lado, Ono et al. (1999) e Camargos et al. (2000) detectaram níveis mais elevados de fumonisinas em amostras de milho. Ono et al. (1999) analisaram 150 amostras de milho recém-colhidas de três regiões do Estado do Paraná (Norte, Centro Oeste e Centro Sul) e detectaram FB₁ em 96,3 – 100% e FB₂ em 63 – 100% das amostras, com variação de 0,07 – 13,46 µg/g para FB₁ e 0,08 – 6,92 µg/g para FB₂. Camargos et al. (2000) avaliaram 23 amostras de milho cultivadas em estações experimentais em diferentes regiões do Estado de São Paulo quanto à ocorrência de fumonisinas B₁ e B₂ e detectaram estas micotoxinas em todas as amostras em níveis que variaram de 1,63 – 25,79 µg/g para FB₁, com média de 5,61 µg/g, e de 0,38 – 8,60 µg/g para FB₂, com média de 1,86 µg/g. Segundo a “Food and Drug Administration” (FDA) (2001), a quantidade máxima de fumonisina total (somatório de FB₁, FB₂ e FB₃) permitida para rações destinadas à alimentação de galinhas poedeiras e frangos de corte é de 30 µg/g e de 100 µg/g, respectivamente, enquanto que na União Européia o nível máximo recomendado para aves em geral é de 20 µg/g (FB₁ + FB₂) (JORNAL OFICIAL DA UNIÃO EUROPÉIA, 2006). Portanto, apesar da alta frequência de fumonisinas na ração, os níveis encontrados no presente trabalho estão abaixo dos limites máximos permitidos pela FDA para aves. Em aves, a ingestão de alimentos contaminados com fumonisina está associada à diminuição do peso corporal, aumento no peso de alguns órgãos, como moela, baço e fígado, aumento nos níveis de cálcio, colesterol e enzimas aspartato-amino-transferase, diarreia, atrofia cortical do timo, necrose hepática multifocal, hiperplasia biliar e diminuição da produção média e do peso dos ovos (BUTKERAITIS et al., 2004; LEDOUX et al., 1992; TRAN et al., 2005).

Apenas uma das 81 amostras de ração analisadas não apresentou contaminação por *Fusarium* spp. O nível de contaminação por *Fusarium* spp. variou de 50 a 7,5 x 10⁵ CFU/g, com contaminação média de 6,2 x 10⁴ CFU/g, sendo que 14% das amostras apresentaram alta contaminação (nível de contaminação variando entre 10⁵ e 10⁶ CFU/g) (Tabela 7). Ono et al. (1999) e Meirelles et al. (2006b) obtiveram resultados semelhantes quanto ao número de

amostras contaminadas por *Fusarium* spp., porém apresentaram maior número de amostras com alta contaminação por este fungo. Ono et al. (1999) detectaram *Fusarium* spp. em 98,7 – 100% das amostras da região Centro-Oeste e Norte do Paraná, sendo que na região Norte 43,3% das amostras de milho apresentaram contagem de *Fusarium* spp. variando de 10^5 a 10^6 CFU/g (alta contaminação). Meirelles et al. (2006b) detectaram *Fusarium* spp. em todas as amostras analisadas (40 amostras), com contaminação média de $2,1 \times 10^5$ CFU/g e a contagem de fungo acima de 10^5 CFU/g sendo verificada em 58% das amostras. Almeida et al. (2000) analisaram a contaminação natural em 66 amostras de milho de diferentes regiões do Estado de São Paulo e detectaram uma contaminação menor por *Fusarium* spp. (55,5 – 80% de amostras contaminadas).

Tabela 6 – Contagem de *Fusarium* spp., nível de fumonisinas e exoantígeno em 81 amostras de ração à base de milho.

<i>Parâmetros</i>	<i>Variação</i>	<i>Média</i>
Contagem de <i>Fusarium</i> spp. (CFU/g)	50 – $7,5 \times 10^5$	$6,2 \times 10^4$
Exoantígeno ($\mu\text{g/g}$)	2,0 – 59,8	21,0
Fumonisinas ($\mu\text{g/g}$):		
FB ₁	0,03 – 3,03	0,69
FB ₂	0,03 – 1,27	0,33
Total	0,03 – 4,07	1,02

Limite de detecção: FB₁ = 30 ng/g; FB₂ = 30 ng/g

Tabela 7 – Nível de contaminação por *Fusarium* spp. em 81 amostras de ração à base de milho.

<i>Nível de contaminação</i>	<i>Número de amostras</i>	<i>Porcentagem de amostras</i>
Baixa ($0 - 10^2$) (CFU/g)	14	17%
Média ($10^3 - 10^4$) (CFU/g)	56	69%
Alta ($10^5 - 10^6$) (CFU/g)	11	14%

Analisando a possível correlação entre a contagem de *Fusarium* spp. e a concentração de exoantígeno foi possível observar que houve uma fraca correlação positiva entre a concentração de exoantígeno e a contagem de *Fusarium* spp. (Coeficiente de correlação de Pearson = 0,24) ($p < 0,05$) (Figura 21). Esse resultado foi semelhante ao obtido por Yong e Cousin (2001) que desenvolveram um ELISA sanduíche para a detecção de espécies de *Aspergillus* produtores de aflatoxina em milho e amendoim por meio de anticorpo produzido para antígeno extracelular de *A. parasiticus* e observaram uma fraca correlação entre a concentração de exoantígeno e a contagem total de fungos em amostras de milho. Isso pode ocorrer devido ao fato da contagem de fungos não ser um método preciso para a estimativa da biomassa total, uma vez que somente propágulos viáveis são detectados e a diminuição na produção de esporos afeta os resultados da contagem em placa (NOTERMANS; HEUVELMAN, 1985).

Por outro lado, houve forte correlação positiva entre a concentração de exoantígeno e a concentração de fumonisina nas amostras de ração de aves analisadas, obtendo-se um coeficiente de correlação de Pearson de 0,76 ($p < 0,05$) (Figura 22). Assim, existe a possibilidade de utilizar a dosagem de exoantígeno por ELISA competitivo indireto como forma de estimar o nível de contaminação por fumonisinas em amostras de ração. Este resultado é interessante, pois o ELISA é um método que permite a análise de várias amostras em um único teste e não necessita de reagentes tóxicos como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

Meirelles et al. (2006b) também avaliaram a correlação entre a concentração de exoantígeno e de fumonisinas em 40 amostras de milho recém-colhidas e observaram uma correlação fraca, provavelmente, devido a utilização de anticorpos policlonais contra exoantígeno bruto de *F. verticillioides* 97K que apresentavam alta reatividade cruzada com exoantígeno de outras espécies do gênero *Fusarium*, podendo reconhecer tanto exoantígeno de espécies de *Fusarium* produtoras de fumonisinas quanto não produtoras, reduzindo a correlação. Assim, a utilização de anticorpo mais específico para a espécie *F. verticillioides*, produtora de fumonisinas, pode ter contribuído para a correlação positiva encontrada neste estudo.

Figura 21 – Correlação entre a contagem de *Fusarium* spp. e a concentração de exoantígeno de *F. verticillioides* em amostras de ração à base de milho (n=81 e coeficiente de correlação de Pearson = 0,29). (Programa: Statistica 7.0)

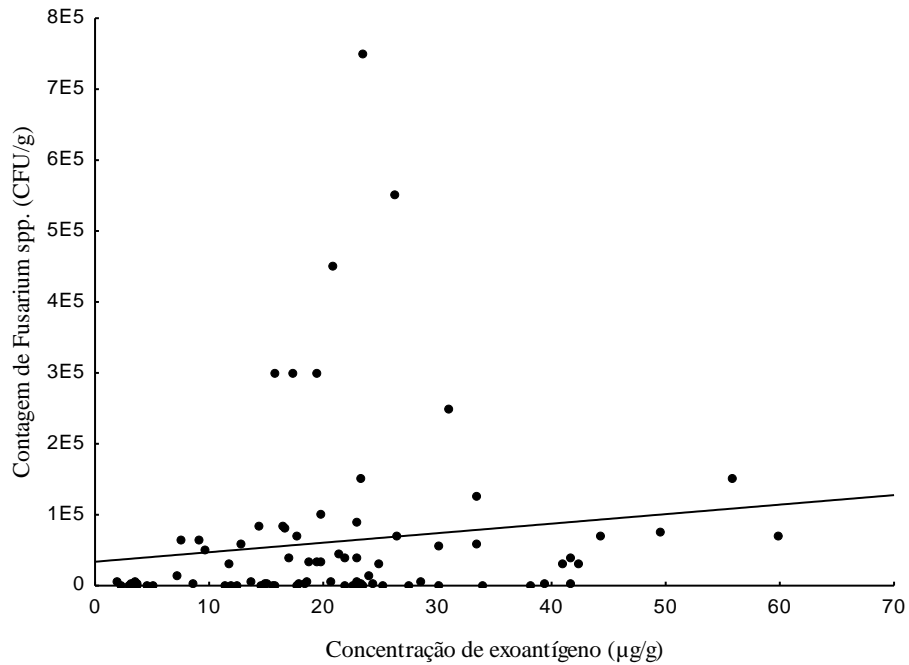
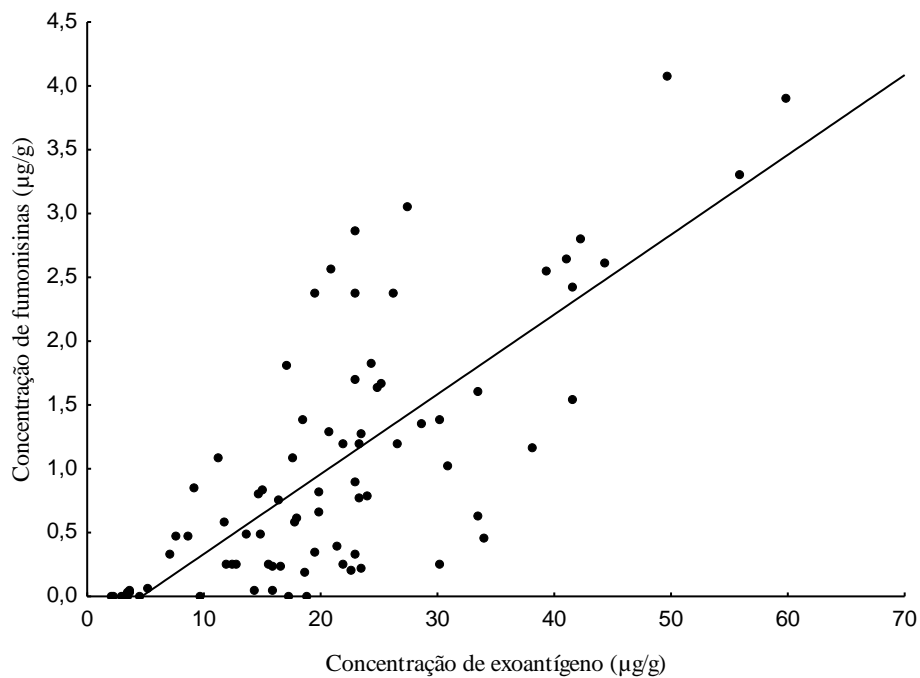


Figura 22 – Correlação entre a concentração de exoantígeno e de fumonisinas em amostras de ração à base de milho (n=81), sendo o coeficiente de correlação de Pearson igual a 0,76. (Programa: Statistica 7.0)



5. CONCLUSÃO

O anticorpo policlonal de coelho contra a proteína de 67 kDa do exoantígeno de *F. verticillioides* 97K apresenta potencial para ser utilizado no desenvolvimento de técnicas imunológicas de detecção de diferentes isolados de *F. verticillioides*, apresentando menor reatividade cruzada com exoantígeno de outras espécies fúngicas quando comparado com anticorpo policlonal de galinhas contra exoantígeno de *F. verticillioides* 97K bruto.

O ELISA competitivo indireto utilizando o anticorpo específico para a proteína de 67 kDa foi capaz de determinar a concentração de exoantígeno de *F. verticillioides* em amostras de ração, e esta concentração se correlacionou fortemente e de forma positiva com a concentração de fumonisinas detectadas nas mesmas. Portanto, o ELISA competitivo indireto é um método promissor para quantificação de exoantígeno de *F. verticillioides* em amostras de ração de aves.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABADO-BECOGNEE, K.; MOBIO, T. A.; ENNAMANY, R.; FLEURAT-LESSARD, F.; SHIER, W. T.; BADRIA, F.; CREPPY, E. E. Cytotoxicity of fumonisin B₁: implication of lipid peroxidation and inhibition of protein and DNA syntheses. **Archives of Toxicology**, v.72, n.4, p.233-236, 1998

ABRAMSON, D.; GAN, Z.; CLEAR, R. M.; GILBERT, J.; MARQUARDT, R. R. Relationships among deoxynivalenol, ergosterol and *Fusarium* exoantigens in Canadian hard and soft wheat. **International Journal of Food Microbiology**, v.45, n.3, p.217-224, 1998.

ALMEIDA, A. P.; CORRÊA, B.; MALLOZZI, M. A. B.; SAWAZAKI, E.; SOARES, L. M. V. Mycoflora and aflatoxin/fumonisin production by fungal isolates from freshly harvested corn hybrids. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, n.4, p. 321-326, 2000.

AVANTAGGIATO, G.; HAVENAAR, R.; VISCONTI, A. Assessment of the multi-mycotoxin-binding efficacy of a carbon/aluminosilicate-based product in na in vitro gastrointestinal model. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, n.12, p.4810-4819, 2007.

AVANTAGGIATO, G.; SOLFRIZZO, M.; VISCONTI, A. Recent advances on the use of adsorbent materials for detoxification of *Fusarium* mycotoxins. **Food Additives and Contaminants**, v.22, n.4, p.379-388, 2005.

BACON, C. W.; BENNETT, R. M.; HINTON, D. M.; VOSS, K. A. Scanning electron microscopy of *Fusarium moniliforme* within asymptomatic corn kernels and kernels associated with equine leukoencephalomalacia. **Plant Disease**, v.76, n.2, p.144-148, 1992.

BACON, C. W.; PORTER, J. K.; NORRED, W. P.; LESLIE, J. F. Production of fusaric acid by *Fusarium* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, n.11, p.4039- 4043, 1996

BETINA, V. Structure-activity relationships among mycotoxins. **Chemico-Biological Interactions**, v.71, n.2-3, p.105-146, 1989.

BENNETT, J. W. Mycotoxins, mycotoxicoses, mycotoxicology and *Mycopathologia*. **Mycopathologia**, v. 100, n.1, p. 3-5, 1987.

BENNETT, J.; SCOTT, K. J. Quantitative staining of fraction I protein in polyacrylamide gels using coomassie brilliant blue. **Analytical Biochemistry**, v. 43, n.1, p.173-182, 1971.

BERMINGHAM, S.; LORRAINE, M.; COOKE, R. C. A critical assessment of the validity of ergosterol as an indicator of fungal biomass. **Mycological Research**, v.99, n.4, p.479-484, 1995.

BIAZON, L.; MEIRELLES, P. G.; ONO, M. A.; ITANO, E. N.; TANIWAKI, M. H.; SUGIURA, Y.; UENO, Y.; HIROOKA, E. Y.; ONO, E. Y. S. Development of polyclonal antibodies against *Fusarium verticillioides* exoantigens. **Food and Agricultural Immunology**, v.17, n.1, p.69-77, 2006.

BLANDINO, M.; REYNERI, A.; COLOMBARI, G.; PIETRI, A. Comparison of integrated field programmes for the reduction of fumonisin contamination in maize kernels. **Field Crops Research**, v.111, n.3, p.284-289, 2009.

BLANDINO, M.; REYNERI, A.; VANARA, F. Influence of nitrogen fertilization on mycotoxin contamination of maize kernels. **Crop Protection**, v.27, n.2, p.222-230, 2008.

BOONEN, J.; MALYSHEVA, S. V.; TAEVERNIER, L.; DI MAVUNGU, J. D.; DE SAEGER, S.; DE SPIEGELEER, B. Human skin penetration of selected model mycotoxins. **Toxicology**, v. 301, n.1-3, p.21-32, 2012.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, n.1-2, p.248-254, 1976.

BULLERMAN, L. B.; BIANCHINI, A. Stability of mycotoxins during food processing. **International Journal of Food Microbiology**, v.119, n.1-2, p.140-146, 2007.

BUSH, B. J.; CARSON, M. L.; CUBETA, M. A.; HAGLER, W. M.; PAYNE, G. A. Infection and fumonisin production by *Fusarium verticillioides* in developing maize kernels. **Phytopathology**, v.94, n.1, p.88-93, 2004.

BUTKERAITIS, P.; OLIVEIRA, C. A. F.; LEDOUX, D. R.; OGIDO, R.; ALBUQUERQUE, R.; ROSMANINHO, J. F.; ROTTINGHAUS, G. E. Effect of dietary fumonisin B₁ on laying Japanese quail. **British Poultry Science**, v.45, n.6, p.798-801, 2004.

CAI, Q.; TANG, L.; WANG, J.-S. Validation of fumonisin biomarkers in F344 rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.225, n.1, p.28-39, 2007.

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, n.3, p. 226-229, 2000.

COLE, R. J.; KIRKSEY, J. W.; CUTLER, H. G.; DOUPNIK, B. L.; PECKHAM, J. C. Toxin from *Fusarium moniliforme*: effects on plants and animals. **Science**, v. 179, n.4080, p.1324-1326, 1973.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos 2011/2012 – Nono Levantamento – Jun/2012**. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_06_12_16_15_32_boletim_portugues_junho_2012.pdf Acesso em: 29 jun. 2012.

CROFT, W. A.; JARVIS, B. B.; YATAWARA, C. S. Airborne outbreak of trichothecene toxicosis. **Atmospheric Environmental**, v.20, n.3, p.549-552, 1986.

CVETNIĆ, Z.; PEPELJNJAK, S.; SEGVIC, M. Toxigenic potential of *Fusarium* species isolated from non-harvested maize. **Arhiv za Higijenu Rada I Toksikologiju: Archives of Industrial Hygiene and Toxicology**, v.56, n.3, p.275-280, 2005.

DAVIS, R. M.; KEGEL, F. R.; SILLS, W. M.; FARRAR, J. J. *Fusarium* ear rot of corn. **California Agriculture**, v.43, n.6, p.4-5, 1989.

DUARTE, J. O. **Embrapa Milho e Sorgo – Sistema de Produção 1 – Cultivo do Milho – Importância Econômica**, 2000. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Milho/CultivodoMilho/importancia.htm>. Acesso em: 12 jan. 2013.

DUPUY, J.; LE BARS, P.; BOUDRA, H.; LE BARS, J. Thermostability of fumonisin B₁, a mycotoxin from *Fusarium moniliforme*, in corn. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, n.9, p.2864-2867, 1993.

ENGVALL, E.; PEARLMANN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA. III. Quantification of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen coated tubes. **Journal of Immunology**, v.109, p.129, 1972.

EDSALL, L. C.; PIRIANOV, G. G.; SPIEGEL, S. Involvement of sphingosine 1-phosphate in nerve growth factor-mediated neuronal survival and differentiation. **The Journal of Neuroscience**, v.17, n.18, p.6952-6960, 1997.

EMANUEL, D. A.; WENZEL, F. J.; LAWTON, B. R. Pulmonary mycotoxicosis. **Chest**, v.67, n.3, p.293-297, 1975.

FDA – U. S. Food and Drug Administration. 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, 2001. Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/FoodborneIllnessContaminants/NaturalToxins/ucm212900.htm>. Acesso em: 19 out. 2012.

FLÓREZ, A. B.; ÁLVAREZ-MARTÍN, P.; LÓPEZ-DÍAZ, M.; MAYO, B. Morphotypic and molecular identification of filamentous fungi from Spanish blue-veined Cabrales cheese, and typing of *Penicillium roqueforti* and *Geotrichum candidum* isolates. **International Dairy Journal**, v. 17, n.4, p.350-357, 2007.

GAN, Z.; MARQUARDT, R. R.; ABRAMSON, D.; CLEAR, R. M. The characterization of chicken antibodies raised against *Fusarium* spp. by enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblotting. **International Journal of Food Microbiology**, v.38, n.2-3, p.191-200, 1997.

GELDERBLOM, W. C. A.; JASKIEWICZ, K.; MARASAS, W. F. O.; THIEL, P. G.; HORAK, R. M.; VLEGGAR, R.; KRIEK, N. P. J. Fumonisin – Novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, n.7, p.1806-1811, 1988.

GELDERBLOM, W. C. A.; LEBEPE-MAZUR, S.; SNIJMAN, P. W.; ABEL, S.; SWANEVELDER, S.; KRIEK, N. P. J.; MARASAS, W. F. O. Toxicological effects in rats chronically fed low dietary levels of fumonisin B₁, v.161, n.1-2, p.39-51, 2001.

GELINEAU-VAN WAES, J.; STARR, L.; MADDOX, J.; ALEMAN, F.; VOSS, K. A.; WILBERDING, J.; RILEY, R. T. Maternal fumonisin exposure and risk for neural tube defects: Mechanisms in an in vivo mouse model. **Birth Defects Research**, part A, v.73, n.7, p.487-497, 2005.

GHIASIAN, S. A.; KORD-BACHEH, P.; REZAYAT, S. M.; MAGHSOOD, A. H.; TAHERKHANI, H. Mycoflora of Iranian maize harvested in the main production areas in 2000, v.158, n.1, p.113-121, 2004.

GILBERTSON, R. L.; BROWN, W. M.; RUPPEL, E. G.; CAPINERA, J. L. Association of corn stalk rot *Fusarium* spp. and western corn rootworm beetles in Colorado. **Phytopathology**, v.76, n.12, p.1309-1314, 1986.

GLENN, A. E. Mycotoxigenic *Fusarium* species in animal feed. **Animal Feed Science and Technology**, v. 137, n.3-4, p.213-240, 2007.

HASCHEK, W. M.; MOTELIN, G.; NESS, D. K.; HARLIN, K. S.; HALL, W. F.; VESONDER, R. F.; PETERSON, R. E.; BEASLEY, V. R. Characterization of fumonisin

toxicity in orally and intravenously dosed swine. **Mycopathologia**, v.117, n.1-2, p.83-96, 1992.

HERZALLAH, S. M. Determination of aflatoxins in eggs, milk, meat and meat products using HPLC fluorescent and UV detectors. **Food Chemistry**, v.114, n.3, p.1141-1146, 2009.

HOPMANS, E. C.; MURPHY, P. A. Detection of fumonisins B₁, B₂, and B₃ and hydrolyzed fumonisin B₁ in corn-containing foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.41, n.10, p.1655-1658, 1993.

HOWARD, P. C.; COUCH, L. H.; PATTON, R. E.; EPPLEY, R. M.; DOERGE, D. R.; CHURCHWELL, M. I.; MARQUES, M. M.; OKERBERG, C. V. Comparison of the toxicity of several fumonisin derivatives in a 28-day feeding study with female B6C3F₁ mice. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.185, n.3, p.153-165, 2002.

HOWARD, P. C.; EPPLEY, R. M.; STACK, M. E.; WARBRITTON, A.; VOSS, K. A.; LORENTZEN, R. J.; KOVACH, R. M.; BUCCI, T. J. Fumonisin B₁ carcinogenicity in a two-year feeding study using F344 rats and B6C3F₁ mice. **Environmental Health Perspectives**, v.109, suppl.2, p.277-282, 2001.

HUMPF, H.-U.; VOSS, K. A. Effects of thermal food processing on the chemical structure and toxicity of fumonisin mycotoxins. **Molecular Nutrition & Food Research**, v.48, n.4, p.255-269, 2004.

IARC – INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Agents classified by the IARC Monographs**, 2012. Disponível em: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/ClassificationsAlphaOrder.pdf>. Acesso em: 22 jan. 2013.

IJIMA, K.; KAWAMURA, O.; WANG, D. S.; MANABE, M.; TANAKA, K.; CHEN, G.; YU, S. Z.; UENO, W. Development of highly sensitive immunosorbent assay for fumonisins and its application for contaminated corn. **Mycotoxins**, v.42, p.63-66, 1996.

IYER, M. S.; COUSIN, M. A. Immunological Detection of *Fusarium* Species in Cornmeal. **Journal of Food Protection**, v.66, n.3, p.451-456, 2003.

Jornal Oficial da União Européia. 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 (2006/576/CE). Disponível em: eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:229:0007:0009:PT:PDF. Acesso em 19 out. 2012.

KAUFMAN, L.; STANDARD, P. G. Specific and rapid identification of medically important fungi by exoantigen detection. **Annual Review of Microbiology**, v.41, p.209-225, 1987.

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, n.1, p.41-44, 1999.

KIM, Y.; MOSIER, N. S.; HENDRICKSON, R.; EZEJI, T.; BLASCHEK, H.; DIEN, B.; COTTA, M.; DALE, B.; LADISCH, M. R. Composition of corn dry-grind ethanol by-products: DDGS, wet cake, and thin stillage. **Bioresource Technology**, v.99, n.12, p.5165-5176, 2008.

KING, S. B.; SCOTT, G. E. Genotypic differences in maize to kernel infection by *Fusarium moniliforme*. **Phytopathology**, v.71, n.12, p.1245-1247, 1981.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.

LAWRENCE, E. B.; NELSON, P. E.; AYERS, J. E. Histopathology of sweet corn seed and plants infected with *Fusarium moniliforme* and *F. oxysporum*. **Phytopathology**, v.71, n.4, p.379-386, 1981.

LEDOUX, D. R.; BROWN, T. P.; WEIBKING, T. S.; ROTTINGHAUS, G. E. Fumonisin toxicity in broiler chicks. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.4, n.3, p.330-333, 1992.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The *Fusarium* laboratory manual**. Oxford: Blackwell Publishing, 2006.

LIDDELL, C. M.; BURGESS, L. W. Survival of *Fusarium moniliforme* at controlled temperature and relative humidity. **Transactions of the British Mycological Society**, v.84, n.1, p.121-130, 1985.

LU, P.; MARQUARDT, R. R.; FROHLICH, A. A.; MILLS, J. T. Detection of *Penicillium aurantiogriseum* by ELISA utilizing antibodies produced against its exoantigens. **Microbiology**, v.140, n.12, p.3267-3276, 1994.

MAPA - BRASIL. Ministério da Agricultura. **Milho**, 2012. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/milho>>. Acesso em: 17 jan. 2013.

MATCHAM, S. E.; JORDAN, B. R.; WOOD, D. A. Estimation of fungal biomass in a solid substrate by three independent methods. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.21, n.1-2, p.108-112, 1985

MEIRELLES, P. G.; BIAZON, L.; ONO, M. A.; SILVA, A. P.; HIROOKA, E. Y.; ONO, E. Y. S. Produção e caracterização de exoantígeno de *Fusarium verticillioides*. **Semina: Ciências Agrárias**, v.27, n.1, p.71-80, 2006a.

MEIRELLES, P. G.; ONO, M. A.; OHE, M. C. T.; MARONEZE, D. M.; ITANO, E. N.; GARCIA, G. T.; SUGIURA, Y.; UENO, Y.; HIROOKA, E. Y.; ONO, E. Y. S. Detection of *Fusarium* sp. contamination in corn by enzyme-linked immunosorbent assay. **Food and Agricultural Immunology**, v.17, n.2, p.79-89, 2006b.

MERRILL JR, A. H.; VAN ECHTEN, G.; WANG, E.; SANDHOFF, K. Fumonisin B₁ inhibits sphingosine (sphinganine) *N*-acyltransferase and *de novo* sphingolipid biosynthesis in

cultured neurons *in situ*. **The Journal of Biological Chemistry**, v.268, n.36, p.27299-27306, 1993.

MISSMER, S. A.; SUAREZ, L.; FELKNER, M.; WANG, E.; MERRILL JR., A. H.; ROTHMAN, K. J.; HENDRICKS, K. A. Exposure to Fumonisin and the Occurrence of Neural Tube Defects along the Texas-Mexico Border. **Environmental Health Perspectives**, v.114, n.2, p.237-241, 2006.

MORITA, Y.; PEREZ, G. I.; PARIS, F.; MIRANDA, S. R.; EHLEITER, D.; HAIMOVITZ-FRIEDMAN, A.; FUKS, Z.; XIE, Z.; REED, J. C.; SCHUCHMAN, E. H.; KOLESNICK, R. N.; TILLY, J. L. Oocyte apoptosis is suppressed by disruption of the *acid sphingomyelinase* gene or by sphingosine-1-phosphate therapy. **Nature Medicine**, v.6, n.10, p.1109-1114, 2000.

MUNKVOLD, G. P.; CARLTON, W. M. Influence of inoculation method on systemic *Fusarium moniliforme* infection of maize plants grown from infected seeds. **Plant Disease**, v.81, n.2, p.211-216, 1997.

MUNKVOLD, G. P.; DESJARDINS, A. E. Fumonisin in Maize Can We Reduce Their Occurrence? **Plant Disease**, v.81, n.6, p.556-565, 1997.

MUNKVOLD, G. P.; HELLMICH, R. L.; SHOWERS, W. B. Reduced *Fusarium* ear rot and symptomless infection in kernels of maize genetically engineered for European corn borer resistance. **Phytopathology**, v.87, n.10, p.1071-1077, 1997.

MUSCARELLA, M.; LO MAGRO, S.; NARDIELLO, D.; PALERMO, C.; CENTONZE, D. Development of a new analytical method for the determination of fumonisins B₁ and B₂ in food products based on high performance liquid chromatography and fluorimetric detection with post-column derivatization. **Journal of Chromatography A**, v.1203, n.1, p.88-93, 2008.

NIELSEN, B. L.; BROWN, L. R. The basis of colored silver-protein complex formation in stained polyacrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v.141, n.2, p.311-315, 1984.

NORRED, W. P.; PORTER, J. K.; DORNER, J. W.; COLE, R. J. Occurrence of the mycotoxin cyclopiazonic acid in meat after oral administration to chickens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.36, n.1, p.113-116, 1988.

NOTERMANS, S.; HEUVELMAN, C. J. Immunological detection of moulds in food by using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); preparation of antigens. **International Journal of Food Microbiology**, v.2, n.4, p.247-258, 1985.

ONO, E. Y. S.; SASAKI, E. Y.; HASHIMOTO, E. H.; HARA, L. N.; CORRÊA, B.; ITANO, E. N.; SUGIURA, T.; UENO, Y.; HIROOKA, E. Y. Post-harvest storage of corn: effect of beginning moisture content on mycoflora and fumonisin contamination. **Food Additives and Contaminants**, v.19, n.11, p.1081-1090, 2002.

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, n.3, p. 139-148, 1999.

OREN, L.; EZRATI, S.; COHEN, D.; SHARON, A. Early events in the *Fusarium verticillioides*-maize interaction characterized by using a green fluorescent protein-expressing transgenic isolate. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, n.3, p.1695-1701, 2003.

ORSI, R. B.; CORRÊA, B.; POSSI, C. R.; SCHAMMASS, E. A.; NOGUEIRA, J. R.; DIAS, S. M. C.; MALOZZI, M. A. B. Mycoflora and occurrence of fumonisins in freshly harvested and stored hybrid maize. **Journal of Stored Products Research**, v. 36, n.1, p.75-87, 2000.

RIDE, J. P.; DRYSDALE, R. B. A rapid method for the chemical estimation of filamentous fungi in plant tissue. **Physiological Plant Pathology**, v.2, n.1, p.7-15, 1972.

ROHDE, S.; RABENSTEIN, F. Standardization of an indirect PTA-ELISA for detection of *Fusarium* spp. in infected grains. **Mycotoxin Research**, v.21, n.2, p.100-104, 2005.

ROSS, P. F.; LEDET, A. E.; OWENS, D. L.; RICE, L. G.; NELSON, H. A.; OSWEILER, G. D.; WILSON, T. M. Experimental equine leukoencephalomalacia, toxic hepatitis, and encephalopathy caused by corn naturally contaminated with fumonisins. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.5, n.1, p.69-74, 1993.

ROSS, P. F.; NELSON, P. E.; RICHARD, J. L.; OSWEILER, G. D.; RICE, L. G.; PLATTNER, R. D.; WILSON, T. M. Production of fumonisins by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* isolates associated with equine leukoencephalomalacia and a pulmonary edema syndrome in swine. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, n.10, p. 3225-3226, 1990.

ROSSI, C. N. **Avaliação do risco de exposição de frangos de corte e galinhas poedeiras à contaminação natural por fumonisinas e aflatoxinas**, 2011. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

ROSTAGNO, H. S.; ALBINO, L. F. T.; DONZELE, J. P.; GOMES, P. C.; OLIVEIRA, R. F.; LOPES, D. C.; FERREIRA, A. S.; BARRETO, S. L. T.; EUCLIDES, R. F. **Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos: Composição de Alimentos e Exigências Nutricionais**. 3ª ed. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Zootecnia, 2011.

SEO, J.-A.; LEE, Y.-W. Natural occurrence of the C series of fumonisins in moldy corn. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, n.3, p.1331-1334, 1999.

SHARMA, P. D.; FISHER, P. J.; WEBSTER, J. Critique of the chitin assay technique for estimation of fungal biomass. **Transactions of the British Mycological Society**, v.69, n.3, p.479-483, 1977.

SHELBY, R. A.; ROTTINGHAUS, G. E.; MINOR, H. C. Comparison of Thin-Layer Chromatography and Competitive Immunoassay Methods for detecting fumonisin on maize. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.42, n.9, p.2064-2067, 1994.

SHEPHARD, G. S.; SYDENHAM, E. W.; THIEL, P. G.; GELDERBLUM, W. C. A. Quantitative Determination of Fumonisins B₁ and B₂ by High-Performance Liquid

Chromatography with Fluorescence Detection. **Journal of Liquid Chromatography**, v.13, n.10, p.2077-2087, 1990.

SILVA, L.; FERNÁNDEZ-FRANZÓN, M.; FONT, G.; PENA, A.; SILVEIRA, I.; LINO, C.; MAÑES, J. Analysis of fumonisins in corn-based food by liquid chromatography with fluorescence and mass spectrometry detectors. **Food Chemistry**, v.112, n.4, p.1031-1037, 2009.

SMITH, J. E.; MOSS, M. O. **Mycotoxins Formation, Analysis and Significance**. 1. ed. Great Britain: John Wiley & Sons Ltd., 1985.

SOBEK, E. A.; MUNKVOLD, G. P. European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae) larvae as vectors of *Fusarium moniliforme*, causing kernel rot and symptomless infection of maize kernels. **Journal of Economic Entomology**, v.92, n.3, p.503-509, 1999.

SOLFRIZZO, M.; VISCONTI, A.; AVANTAGGIATO, G.; TORRES, A.; CHULZE, S. *In vitro* and *in vivo* studies to assess the effectiveness of cholestyramine as a binding agent for fumonisins. **Mycopathologia**, v.151, n.3, p.147-153, 2000.

SROBAROVA, A.; MORETTI, A.; FERRACANE, R.; RITIENI, A.; LOGRIECO, A. Toxigenic *Fusarium* species of *Liseola* section in pre-harvest maize ear rot, and associated mycotoxins in Slovakia. **European Journal of Plant Pathology**, v.108, n.4, p.299-306, 2002.

STEENKAMP, E. T.; WINGFIELD, B. D.; COUTINHO, T.A.; ZELLER, K. A.; WINGFIELD, M. J.; MARASAS, W. F.O.; LESLIE, J. F. PCR-based identification of MAT-1 and MAT-2 in the *Gibberella fujikuroi* species complex. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.66, n.10, p.4378-4382, 2000.

SYDENHAM, E. W.; GELDERBLUM, W. C. A.; THIEL, P. G.; MARASAS, W. F. O. Evidence for natural occurrence of fumonisin B₁, a mycotoxin produced by *Fusarium moniliforme*, in corn. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.38, n.1, p. 285-290, 1990.

TENENHOUSE, H. S.; DEUTSCH, H. F. Some physical-chemical properties of chicken γ -globulins and their pepsin and papain digestion products. **Immunochemistry**, v.3, n.1, p.11-20, 1966.

TESSARI, E. N. C.; OLIVEIRA, C. A. F.; CARDOSO, A. L. S. P.; LEDOUX, D. R.; ROTTINGHAUS, G. E. Effects of aflatoxin B₁ and fumonisin B₁ on body weight, antibody titres and histology of broiler chicks. **British Poultry Science**, v.47, n.3, p.357-364, 2006.

THE UNIVERSITY OF GEORGIA – College of Agricultural & Environmental Sciences. **Fusarium**. Disponível em: <http://plantpath.caes.uga.edu/extension/fungi/fusarium.html>. Acesso em: 14 jan. 2013.

THIEL, P. G.; MARASAS, W. F.; SYDENHAM, E. W.; SHEPHARD, G. S.; GELDERBLOM, W. C.; NIEUWENHUIS, J. J. Survey of fumonisin production by *Fusarium* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 4, p. 1089-1093, 1991.

TRAN, S. T.; AUVERGNE, A.; BENARD, G.; BAILLY, J. D.; TARDIEU, D.; BABILÉ, R.; GUERRE, P. Chronic Effects of Fumonisin B₁ on Ducks. **Poultry Science**, v. 84, n.1, p. 22-28, 2005.

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

UENO, Y.; IJIMA, K.; WANG, S.-D.; SUGIURA, Y.; SEKIJIMA, M.; TANAKA, T.; CHEN, C.; YU, S.-Z. Fumonisin as a possible contributory risk factor for primary liver cancer: A 3-year study of corn harvested in Haimen, China, by HPLC and ELISA. **Food and Chemical Toxicology**, v.35, n.12, p.1143-1150, 1997.

VAN DER WESTHUIZEN, L.; SHEPHARD, G. S.; SCUSSEL, V. M.; COSTA, L. L. F.; VISMER, H. F.; RHEEDER, J. P.; MARASAS, W. F. O. Fumonisin contamination and *Fusarium* incidence in corn from Santa Catarina, Brazil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, n.18, p.5574-5578, 2003.

VOSS, K. A.; BACON, C. W.; MEREDITH, F. I.; NORRED, W. P. Comparative subchronic toxicity studies of nixtamalized and water-extracted *Fusarium moniliforme* culture material.

Food and Chemical Toxicology, v.34, n.7, p.623-632, 1996.

WANG, F.; NOBES, C. D.; HALL, A.; SPIEGEL, S. Sphingosine 1-phosphate stimulates rho-mediated tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase and paxillin in Swiss 3T3 fibroblasts. **Biochemical Journal**, v.324, p.481-488, 1997.

WANG, E.; NORRED, W. P.; BACON, C. W.; RILEY, R. T.; MERRILL JR, A. H. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. **The Journal of Biological Chemistry**, v.266, n.22, p.14486-14490, 1991.

WARD, T. L.; WATKINS, K. L.; SOUTHERN, L. L.; HOYT, P. G.; FRENCH, D. D. Interactive effects of sodium zeolite-A and copper in growing swine: growth, and bone and tissue mineral concentrations. **Journal of Animal Science**, v.69, n.2, p.726-733, 1991.

WIEBE, L. A.; BJELDANES, L. F. Fusarin C, a mutagen from *Fusarium moniliforme* grown on corn. **Journal of Food Science**, v.46, n.5, p.1424-1429, 1981.

YATES, I. E.; BACON, C. W.; HINTON, D. M. Effects of endophytic infection by *Fusarium moniliforme* on corn growth and cellular morphology. **Plant Disease**, v.81, n.7, p.723-728, 1997.

YONG, R. K.; COUSIN, M. A. Detection of moulds producing aflatoxins in maize and peanuts by an immunoassay. **International Journal of Food Microbiology**, v.65, n.1-2, p.27-38, 2001.

YOSHIZAWA, T.; MIROCHA, C. J.; BEHRENS, J. C.; SWANSON, S. P. Metabolic fate of T-2 toxin in a lactating cow. **Food and Cosmetics Toxicology**, v.19, n., p.31-39, 1981.

YOSHIZAWA, T.; YAMASHITA, A.; LUO, Y. Fumonisin occurrence in corn from high-and low-risk áreas for human esophageal cancer in China. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, n.5, p.1626-1629, 1994.

ZEHR, B. D.; SAVIN, T. J.; HALL, R. E. A one-step, low background coomassie staining procedure for polyacrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v.182, n.1, p.157-159, 1989.

ZHANG, Y.; CAUPERT, J. Survey of mycotoxins in U. S. distiller's dried grains with solubles from 2009 to 2011. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.60, n.2, p.539-543, 2012.