



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

PAULA GARCIA MEIRELLES

FUSARIUM VERTICILLIOIDES:
CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E DETECÇÃO EM MILHO
ATRAVÉS DE ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO

Londrina
2005

PAULA GARCIA MEIRELLES

FUSARIUM VERTICILLIOIDES:
CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E DETECÇÃO EM MILHO
ATRAVÉS DE ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elisabete Yurie Sataque Ono

Co-Orientador: Prof. Dr. Mario Augusto Ono

Londrina
2005

PAULA GARCIA MEIRELLES

FUSARIUM VERTICILLIOIDES:
CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E DETECÇÃO EM MILHO
ATRAVÉS DE ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Elisabete Yurie Sataque Ono
Universidade Estadual de Londrina

Prof^ª. Dr^ª. Elisa Yoko Hirooka
Universidade Estadual de Londrina

Prof^ª. Dr^ª. Maria Helena P. Fungaro
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 29 de julho de 2005.

Aos meus amados pais William Reis Meirelles e Maria Ofélia Garcia Meirelles, pelo amor, carinho, dedicação e incentivo, sem os quais nada do que pude realizar até hoje teria sido possível.

AGRADECIMENTOS

À professora Dr^a. Elisabete Yurie Sataque Ono, pela orientação, disponibilidade, paciência, sugestões e comentários críticos, que foram imprescindíveis para que este trabalho fosse realizado.

À Universidade Estadual de Londrina, pela oportunidade de realização deste trabalho e aos professores do programa de Mestrado em Biotecnologia, pela dedicação e pelos valiosos ensinamentos.

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

Ao professor Dr. Mario Augusto Ono, pela orientação nas técnicas imunológicas e pelas valiosas sugestões.

Ao professor Dr. José Eduardo Garcia, pela colaboração nas técnicas moleculares, pela paciência e sugestões.

À professora Dr^a. Elisa Yoko Hirooka, pelo fornecimento de fungos do gênero *Fusarium*, pela prestatividade e valiosas sugestões.

À professora Dr^a. Maria Helena Pelegrinelli Fungaro, pelas sugestões e comentários críticos.

Ao Dr. Yoshio Ueno, pelo fornecimento de fungos do gênero *Fusarium*.

Aos colegas de laboratório Adriana Pereira da Silva, Marcelo da Silva, Maria Clara T. Ohe, Daniel Marchetti Maroneze e Elaine Cunha Moreno, pela amizade, enorme colaboração e auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia (CCE/UEL): Nelson Janeiro, Elda Jonas Aguiar, Sílvia B. da Costa Avelino, Sérgio Nascimento Evangelista, Sandra Aparecida Defende, Neusa Zamuner de Souza, e funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos (CCA/UEL): Patrícia Sambatti e Berenice Figueredo, pela colaboração.

Aos colegas de curso: Carolina Tamanini, Doumit Camilios Neto, Eliana Tiemi Ito, Ellen Cristina Giese, Luís Rodrigo Ito Morioka e Marcos Roberto de Oliveira pelo companheirismo e amizade durante as disciplinas e ao longo do curso.

Ao meu namorado Leandro Pires Silva, pelo amor, incentivo, paciência, companheirismo e pela compreensão nos momentos de ausência.

Aos meus irmãos Gabriela Garcia Meirelles e Vinícius Carvalho Meirelles, pelo carinho e motivação.

Aos meus amigos Érica Guilhen Mario, Melissa Pereira Machado e Patrick Vianna Garcia, pela amizade e carinho.

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

"Há homens que lutam um dia e são bons. Há outros que lutam um ano e são melhores. Há os que lutam muitos anos e são muito bons. Porém, há os que lutam toda a vida. Esses são os imprescindíveis."

Bertolt Brecht

MEIRELLES, Paula Garcia. *Fusarium verticillioides*: caracterização molecular e detecção em milho através de ensaio imunoenzimático. 2005. 132f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2005.

RESUMO

Fusarium verticillioides é um patógeno primário de milho e principal produtor de fumonisinas. Este fungo pode causar perdas econômicas significativas para produtores e processadores de grãos, criadores de animais, além de representar sérios riscos à saúde humana e animal. Este trabalho teve como objetivo desenvolver um ensaio imunoenzimático (ELISA) para a detecção de *F. verticillioides* em amostras de milho, avaliar a correlação entre esta metodologia e técnicas tradicionais de detecção de fungos e fumonisinas, assim como avaliar polimorfismos no gene FUM6 associado à biossíntese de fumonisinas, através de polimorfismo conformacional de fita simples. Os polimorfismos encontrados foram associados à produção de fumonisina B₁ (FB₁). Para o desenvolvimento do ELISA competitivo indireto, foram obtidos exoantígenos de 8 isolados de *F. verticillioides*, sendo que os antígenos de 3 isolados (97K, 113F e 162A), devido a maior concentração de proteínas e maior número de bandas protéicas visíveis em eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), foram selecionados para a produção de anticorpos policlonais. O soro imune anti-97K, com maior título no ELISA indireto (1:12.800) foi escolhido para os ensaios posteriores. Quarenta amostras de milho recém-colhido foram analisadas quanto à concentração de exoantígenos de *F. verticillioides*, contagem de bolores e leveduras, e determinação de ergosterol e fumonisinas dos grãos, visando avaliar a correlação entre estes parâmetros. *F. verticillioides* foi também cultivado em meio líquido para a avaliação da correlação entre biomassa e exoantígenos. O perfil eletroforético dos exoantígenos produzidos para o desenvolvimento do ELISA apresentou bandas com massas moleculares aparentes variando entre 17 e 170 kDa. Não foi observada correlação significativa entre exoantígenos determinados por ELISA competitivo indireto e contagem total de bolores e leveduras, contagem de *Fusarium* spp. e níveis de fumonisinas. Por outro lado, o coeficiente de correlação entre exoantígenos e ergosterol foi 0.52, enquanto que entre biomassa e exoantígenos de *F. verticillioides* em cultivo em meio líquido foi 0.84. Três isolados de *F. verticillioides* apresentaram perfil eletroforético diferente dos demais, demonstrando que existe polimorfismo para o loco *fum6*. O isolado 97J apresentou polimorfismo na região correspondente ao sítio P450 da enzima, enquanto que os isolados 97L e 119Fa apresentaram polimorfismos na região do sítio “FAD-binding 1”. A mutação no domínio P450 não parece estar associada ao aumento ou diminuição da produção de fumonisinas, uma vez que o isolado 97K produziu níveis intermediários de FB₁ (1050 µg/g), porém os isolados com polimorfismo no domínio “FAD-binding” apresentaram elevada produção de FB₁ (2643 e 2814 µg/g respectivamente, para 97L e 119Fa). Os resultados obtidos sugerem que o ELISA com exoantígenos apresenta potencial para detecção de *Fusarium* spp. em amostras de milho e que o gene FUM6 pode ser um marcador molecular para linhagens altamente toxigênicas de *F. verticillioides*.

Palavras-chave: *F. verticillioides*. Fumonisinas. Exoantígenos. Ensaio imunoenzimático. Marcadores moleculares.

MEIRELLES, Paula Garcia. *Fusarium verticillioides*: molecular characterization and detection in corn by enzyme-linked immunosorbent assay. 2005. 132f. Dissertation (Master's Degree in Biotechnology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2005.

ABSTRACT

Fusarium verticillioides is a primary corn pathogen and the main fumonisin producer. This fungus can cause significant economical losses for the farmers, grain processors, animal producers and risk for human and animal health. The aims of this study were to develop an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to detect *F. verticillioides* in corn samples and evaluate the correlation between this methodology and traditional methods of fungal and fumonisin detection, as well as analyse polymorphism in FUM6 gene, involved in fumonisins biosynthesis. The polymorphisms observed were then correlated to fumonisin B₁ (FB₁) production. Exoantigens from 8 *F. verticillioides* strains were obtained for the development of an indirect competitive ELISA. The exoantigens from 3 strains (97K, 113F and 162A) were selected for polyclonal antibody production, due to the highest protein concentration and high number of visible protein bands by denaturing polyacrilamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Antiserum against *F. verticillioides* 97K exoantigens, which showed the highest titre in indirect ELISA (1:12.800), was chosen for further analyses. Forty freshly harvested corn samples were analysed for *F. verticillioides* exoantigens, as well as for total mould count, ergosterol and fumonisin levels in order to evaluate the relationship between these parameters. In addition, *F. verticillioides* was grown in brain heart infusion (BHI) broth, in order to evaluate the correlation between biomass and exoantigens. The electrophoretic profile of the exoantigens produced for ELISA development showed protein bands with molecular mass ranging from 17 to 170 kDa. There was no significant correlation between exoantigens and total mould count, *Fusarium* sp. count and fumonisina levels. Otherwise, the correlation coefficient between exoantigens and ergosterol content was 0.52 and between biomass and *F. verticillioides* exoantigens in BHI broth was 0.84. Three strains of *F. verticillioides* showed different electrophoretic profile from the others, demonstrating that there is polymorphism for *fum6* locus. Strain 97L showed polymorphism at the region corresponding to P450 conserved domain while strains 97L and 119Fa showed polymorphism at FAD_binding 1 domain. The polymorphism at P450 domain is not apparently associated with high or low levels of FB₁ synthesis, as it produced intermediate levels of FB₁ (1050 µg/g), however the strains which showed polymorphism at FAD_binding 1 domain presented high levels of FB₁ (2643 and 2814 µg/g respectively, for strains 97L and 119Fa). The results suggest that the ELISA with exoantigens has potential for *Fusarium* sp. detection in corn samples and that FUM6 gene can be a molecular marker for high fumonisin producer strains of *F. verticillioides*.

Keywords: *F. verticillioides*. Fumonisins. Exoantigens. Enzyme-linked immunosorbent assay. Molecular markers.

LISTA TABELAS

Tabela 1 – Espécies de <i>Fusarium</i> produtoras de fumonisinas e análogos produzidos.....	20
Tabela 2 – Reatividade cruzada do soro imune produzido contra exoantígenos de <i>F. verticillioides</i> 97K com exoantígenos de diferentes espécies e gêneros fúngicos	42
Tabela 3 – Produção de FB ₁ por isolados de <i>F. verticillioides</i> em material de cultura,utilizados para extração de DNA total	47
Tabela 4 - Seqüência dos pares de primers utilizados na amplificação do gene FUM6 de isolados de <i>F. verticillioides</i>	49
Tabela 5 - Concentração de proteínas e carboidratos totais de exoantígenos de <i>Fusarium</i>	55
Tabela 6 – Redução da reatividade cruzada do anticorpo policlonal anti-97K aos exoantígenos de <i>F. verticillioides</i> 97K tratados com diferentes concentrações de periodato de sódio	56
Tabela 7 – Reatividade cruzada de exoantígenos de diferentes espécies de <i>Fusarium</i> com anticorpos policlonais anti- <i>F. verticillioides</i> antes e após o tratamento com periodato de sódio 10mM	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esqueleto carbônico das fumonisinas da série B e variações encontradas nos análogos FB ₁ , FB ₂ , FB ₃ e FB ₄	19
Figura 2 – Esquema da via biossintética proposta por PROCTOR et al. (1999) para fumonisinas da série B.....	23
Figura 3 – Esquema do cluster FUM de <i>F. verticillioides</i>	24
Figura 4 - Localização dos domínios conservados dentro da provável seqüência de aminoácidos codificada pelo gene FUM6 de <i>F. verticillioides</i>	25
Figura 5 - ELISA competitivo direto	30
Figura 6 - ELISA competitivo indireto	31
Figura 7 - ELISA sanduíche.....	32
Figura 8 – Posicionamento das regiões do gene FUM6 de <i>F. verticillioides</i> amplificadas por cada par de primers desenhado	48
Figura 9 – Perfis eletroforéticos do gene FUM6 de isolados de <i>F. verticillioides</i>	53

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	15
2.1 OBJETIVOS GERAIS	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1 <i>FUSARIUM VERTICILLIOIDES</i>	16
3.2 FUMONISINAS	17
3.2.1 Biossíntese de fumonisinas	22
3.2.2 Genética da produção de fumonisinas	23
3.3 EXOANTÍGENOS E ELISA NA DETECÇÃO DE FUNGOS	27
4 MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1 MATERIAL	37
4.1.1 Reagentes e Materiais	37
4.1.2 Culturas fúngicas	37
4.1.3 Amostras	38
4.2 METODOLOGIA EXPERIMENTAL	38
4.2.1 Obtenção de exoantígenos	38
4.2.2 Determinação da concentração de proteínas	39
4.2.3 Determinação da concentração de carboidratos totais	39
4.2.4 Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	39
4.2.5 Imunização dos coelhos e obtenção dos anticorpos	40
4.2.6 Imunodifusão radial dupla	40
4.2.7 ELISA indireto	41
4.2.8 ELISA competitivo indireto	41
4.2.9 Avaliação do efeito do periodato de sódio sobre os exoantígenos	43
4.2.10 Contagem de bolores e leveduras e extração de exoantígenos de milho	43
4.2.11 Determinação de exoantígenos em milho	44
4.2.12 Cultivo de <i>F. verticillioides</i> para determinação de biomassa e exoantígenos	44

4.2.13 Determinação de ergosterol em milho.....	45
4.2.14 Determinação de fumonisinas em milho	45
4.2.15 Extração de DNA	46
4.2.16 Primers.....	47
4.2.17 Amplificação do DNA (PCR).....	50
4.2.18 Análise de polimorfismo conformacional de fita simples (Single Strand Conformational Polymorphism – SSCP).....	50
4.2.19 Análise estatística	50
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
5.1 ANÁLISE DE SSCP	52
5.2 AVALIAÇÃO DA AÇÃO DO PERIODATO DE SÓDIO SOBRE OS EXOANTÍGENOS	54
ARTIGO 1.....	57
“Produção e caracterização de exoantígenos de <i>Fusarium verticillioides</i> ”	58
ARTIGO 2.....	79
“Direct of detection of <i>Fusarium</i> sp. contamination in corn using enzyme-linked immunosorbent assay”	80
6 CONCLUSÕES	106
REFERÊNCIAS.....	107
ANEXOS.....	122
ANEXO A - Normas para publicação no periódico SEMINA Ciências Agrárias	123
ANEXO B - Normas para publicação no periódico Food and Agricultural Immunology	126

1 INTRODUÇÃO

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

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

Embora existam muitas espécies de *Fusarium*, somente um pequeno número contamina cereais no campo e produz micotoxinas. *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg (= *Fusarium moniliforme* Sheldon) é um ascomiceto cosmopolita associado principalmente ao milho e principal produtor de fumonisinas (BULLERMAN, 1996).

A ingestão de milho e derivados contaminados com fumonisinas é preocupante, devido à sua associação com doenças no homem e em animais. As fumonisinas causam leucoencefalomalácia em eqüinos (ELEM), edema pulmonar em suínos e redução no desenvolvimento e imunossupressão em aves. Em ratos, foi comprovada a ação hepatotóxica e hepatocarcinogênica (GELDERBLOM et al., 1991; NAGARAJ et al., 1994; MALLMANN et al., 1999). Em seres humanos, estudos epidemiológicos indicam a provável associação com câncer esofágico e câncer hepático primário (GELDERBLOM et al., 1992a; UENO et al., 1997).

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 e a estabilidade das fumonisinas ao processamento industrial, medidas efetivas de controle da contaminação pelo fungo e por suas toxinas são essenciais.

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. Portanto, é imprescindível o desenvolvimento de ensaios adequados para a detecção do fungo, visando o controle de qualidade dos produtos destinados ao consumo humano e animal.

Os métodos tradicionais de identificação e detecção de fungos incluem o cultivo em diversos meios, exame microscópico e análises bioquímicas (quitina, ergosterol e

metabólitos secundários) (JARVIS et al., 1983). A maioria destes métodos apresenta baixa especificidade e reprodutibilidade, além de consumirem tempo e exigirem pessoal técnico qualificado para a execução (LI et al., 2000). Recentemente, estudos de identificação molecular têm sido realizados na tentativa de facilitar a identificação das diferentes espécies de *Fusarium*, mas, embora apresentem boa especificidade, essas metodologias apresentam custo elevado e exigem pessoal técnico qualificado (KERÉNYI et al., 1999; STEENKAMP et al., 2000).

Por outro lado, os métodos imunológicos apresentam inúmeras vantagens, como rapidez na obtenção de resultados, alta sensibilidade e facilidade na execução. Dentre os ensaios imunoenzimáticos, os que utilizam exoantígenos são os mais empregados na detecção e identificação de fungos toxigênicos, além de serem empregados também na resolução de problemas taxonômicos (LU et al., 1994; ABRAMSON et al., 1998; THORNTON et al., 2002).

O desenvolvimento de um ensaio imunoenzimático para detecção de *F. verticillioides* e identificação de marcadores moleculares para a caracterização de isolados altamente produtores de fumonisinas auxiliariam no monitoramento tanto do fungo como de suas micotoxinas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um ensaio imunoenzimático para a detecção de *Fusarium verticillioides* em milho e identificar polimorfismo no loco *fum6* e correlacionar com a produção de fumonisinas, visando um melhor controle de qualidade dos alimentos destinados ao consumo humano e animal.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar um ensaio imunoenzimático para a detecção de *F. verticillioides* em milho.
- Quantificar os exoantígenos de *F. verticillioides* presentes em amostras de milho por ELISA competitivo indireto e correlacionar com métodos tradicionais de detecção de fungos (ergosterol e contagem em placas) e determinação de fumonisinas.
- Determinar a concentração de proteínas e carboidratos dos exoantígenos.
- Avaliar a ação do periodato de sódio sobre os exoantígenos de diferentes espécies de *Fusarium*.
- Identificar a presença de polimorfismo no gene FUM6 (gene da citocromo P450 monooxigenase) em cepas de *F. verticillioides* e correlacionar com a produção de FB₁.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 *FUSARIUM VERTICILLIOIDES*

O gênero *Fusarium* Link ex Fr. ocorre praticamente em todas as regiões geográficas do mundo (VENTURA, 2000). *Fusarium verticillioides* Sacc. Nirenberg (= *Fusarium moniliforme* Sheldon) apresenta uma distribuição ampla, ocorrendo tanto nas zonas temperadas úmidas e sub-úmidas como nas tropicais e subtropicais, citando-se a América Central, Japão, Peru, sul da China, Alemanha, Nova Zelândia, Austrália, Estados Unidos, Filipinas, Indonésia e Canadá (NELSON et al., 1991; BURGESS & SUMMERELL, 1992; MILLER et al., 1993). Pertence à seção Liseola do complexo *Gibberella fujikuroi* (Sawada) Wollenw., que é subdivida em pelo menos oito espécies biológicas (“mating populations”) geneticamente distintas, denominadas por letras A a H (KERÉNYI et al., 1999). A classificação do gênero *Fusarium* é complexa, devido à dificuldade de identificação baseada apenas em caracteres morfológicos, não sendo estes suficientes para distinguir duas espécies semelhantes. Este problema é comum em *F. verticillioides*, encontrado nas espécies biológicas A e F, onde apesar de morfológicamente pertencerem à mesma espécie, são geneticamente distintas. Estudos genéticos recentes permitiram a discriminação de diferentes grupos dentro da população (LESLIE, 1996; O’DONNELL et al., 1998; BRITZ et al., 1999; KERÉNYI et al., 1999; EDEL et al., 2000; STEENKAMP et al., 2000; JURGENSON et al., 2002).

As espécies da seção Liseola predominam entre contaminantes de milho, porém *F. verticillioides* é encontrado também em trigo, arroz, aveia, sorgo, cana, banana, figo, manga, abacaxi e aspargo (BACON & NELSON, 1994; JACKSON et al., 1996; MARÍN et al., 1999b). O gênero é classificado como fungo de campo, devido à capacidade de crescimento em estágio de pré-colheita, e por ser capaz de interagir com diferentes espécies de plantas, especula-se que grãos e fragmentos em decomposição sirvam como substrato para a sua sobrevivência e, desta forma, possam infectar culturas subseqüentes e produzir toxinas (BULLERMAN & TSAI, 1994).

Fusarium verticillioides causa doenças em todos os estágios de desenvolvimento do milho, infectando raízes, caule e grãos, e em muitos casos a sua presença é ignorada por não causar danos visíveis. A infecção assintomática existe na planta e cepas do

fungo transmitidas pela semente são capazes de se desenvolver sistemicamente afetando os grãos. Segundo a maioria das definições, esta relação é denominada endofítica (KUCHAREK & KOMMEDAHL, 1966; THOMAS & BUDDENHAGEN, 1980; KEDERA et al., 1992; BACON et al., 1992 e 1994). A infecção ocorre também através de lesões na semente, provocadas por pássaros ou insetos (WICKLOW et al., 1988). Embora a planta produza substâncias de defesa contra patógenos, como a 2,4-diidroxi-6-metoxi-benzoxazinona (DIMBOA) e 2,4-diidroxi-benzoxazinona (DIBOA), *F. verticillioides* se mostrou capaz de catabolizar e inativar estes compostos, anulando a ação tóxica (RICHARDSON & BACON, 1995).

F. verticillioides cresce em ampla faixa de temperatura, mas somente em atividades de água relativamente altas e teores de umidade acima de 18%. Estudos demonstraram que em milho, as condições ótimas para o desenvolvimento de *F. verticillioides* são 25°C e atividade de água (a_w) de 0,98 (MARÍN et al., 1998; TORRES et al., 2003).

Após a colheita do milho, o fungo sobrevive seguramente no período de entre-safras, colonizando as sementes armazenadas (CASA, 1998). Sendo este cereal de grande importância econômica no Brasil, a armazenagem dos grãos deve ser uma preocupação primária, na tentativa de controlar a proliferação da microbiota fúngica, reduzindo perdas econômicas e minimizando riscos à saúde humana e animal (UENO, 2000).

A estocagem inadequada sob altas temperaturas, umidade relativa do ar e teor de umidade dos grãos, podem permitir a proliferação de fungos. Desta forma, um manejo adequado após a colheita garante a qualidade dos grãos armazenados (CHRISTENSEN & KAUFMANN, 1974; MUNKVOLD & DESJARDINS, 1997; ONO et al., 2002).

3.2 FUMONISINAS

As fumonisinas, descobertas em 1988, constituem um grupo de micotoxinas produzidas principalmente por *F. verticillioides* e *F. proliferatum*. Desde a sua descoberta já foram descritos 28 análogos, divididos em quatro grupos principais (A, B, C e P), no entanto, apenas as FB₁, FB₂ e FB₃ ocorrem em concentrações significativas como contaminantes naturais de milho e derivados, sendo a FB₁ a mais tóxica e abundante, compreendendo de 60 a

90% das fumonisinas. (GELDERBLOM et al., 1988 e 1992b; BEZUIDENHOUT et al., 1988; MUSSER & PLATTNER, 1997; SEO & LEE, 1999; RHEEDER et al., 2002).

A elevada frequência destas micotoxinas no milho brasileiro é preocupante, uma vez que foram detectadas em 97,4% e 94,8%, para FB₁ e FB₂ respectivamente, de 48 amostras de milho analisadas, sendo 39 do Estado do Paraná e 9 do Mato Grosso do Sul e Goiás (HIROOKA et al., 1996). SILVA et al. (2004) avaliaram o potencial toxigênico de 35 isolados de *F. verticillioides*, obtidos de amostras de sorgo do Estado de São Paulo, e observaram que 91,5% dos isolados eram produtores de FB₁.

As fumonisinas da série B (Figura 1) consistem de um esqueleto de 20 carbonos com um grupo amino no C-2, ésteres tricarbálicos no C-14 e C-15, e um grupo metil no C-12 e C-16. Diferem entre si apenas pela extensão da hidroxilação na posição dos C-5 e C-10, sendo que a FB₂ não possui a hidroxila no C-10, a FB₃ no C-5 e a FB₄ em ambos (BLACKWELL et al., 1996; PROCTOR et al., 1999a).

A produção de fumonisinas foi relatada em quinze espécies de *Fusarium* (Tabela 1), mas outras espécies vêm sendo estudadas em relação a estas toxinas (RHEEDER et al., 2002).

Dentro da seção Liseola, as espécies biológicas A e D produzem elevado nível de fumonisinas, enquanto que as outras produzem pouco ou não são produtoras (LESLIE et al., 1992).

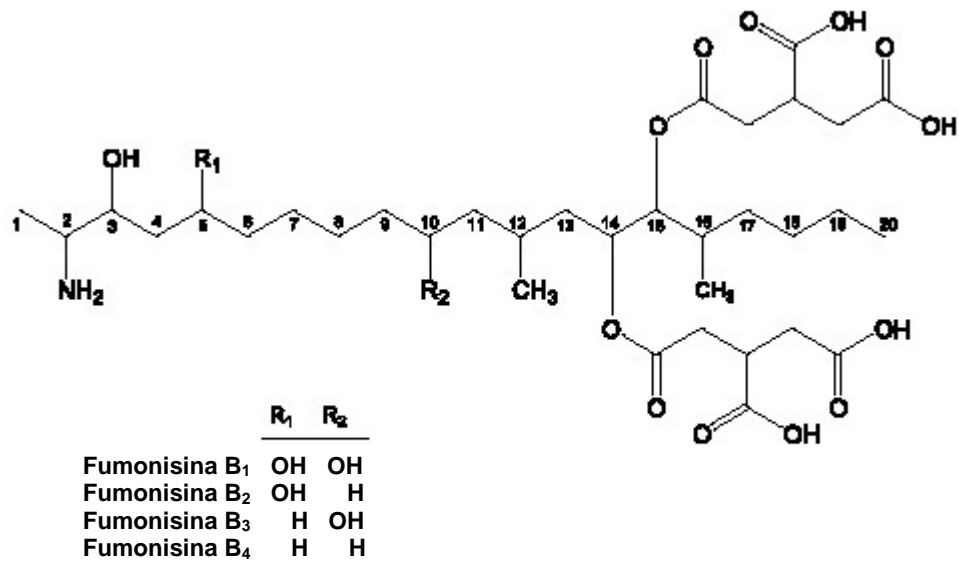


Figura 1 – Esqueleto carbônico das fumonisinas da série B e variações encontradas nos análogos FB₁, FB₂, FB₃ e FB₄. Fonte: PROCTOR et al. (2003).

Tabela 1 – Espécies de *Fusarium* produtoras de fumonisinas e análogos produzidos.

<i>Fusarium</i> spp.	Análogos de fumonisinas
Seção Liseola	
<i>F. verticillioides</i> MP*-A	FA ₁₋₃ , FB ₁₋₅ , iso-FB ₁ , FAK ₁ , FBK ₁ , FC _{1,4} , FP ₁₋₃ , PH _{1a-b}
<i>F. sacchari</i> MP-B	FB ₁
<i>F. fujikuroi</i> MP-C	FB ₁
<i>F. proliferatum</i> MP-D	FA ₁₋₃ , FB ₁₋₅ , FAK ₁ , FBK ₁ , FC ₁ , FP ₁₋₃ , PH _{1a-b}
<i>F. subglutinans</i> MP-E	FB ₁
<i>F. subglutinans</i> MP-?***	FB ₁
<i>F. thapsinum</i> MP-F	FB ₁₋₃
<i>F. anthophilum</i>	FB ₁₋₂
<i>F. globosum</i>	FB ₁₋₃
Seção Dlaminia	
<i>F. nygamai</i> MP-G	FA ₁₋₃ , FB ₁₋₅ , FAK ₁ , FBK ₁ , FC ₁ , FP ₁ , PH _{1a-b}
<i>F. dlamini</i>	FB ₁
<i>F. napiforme</i>	FB ₁
<i>F. pseudonygamai</i>	FB ₁₋₂
<i>F. andiyazi</i>	FB ₁
Seção Elegans	
<i>F. oxysporum</i>	FC _{1,3-4} , N-acetyl-FC ₁ , iso-FC ₁ , N-acetyl-iso-FC ₁ , OH-FC ₁ , N-acetyl-OH-FC ₁
<i>F. oxysporum</i> var. <i>redolens</i>	FB ₁₋₃
Seção Arthrosporiela	
<i>F. polyphialidicum</i>	FB ₁

*MP = “mating population”

**MP não identificada

Fonte: RHEEDER et al., 2002.

A produção de fumonisinas depende de fatores biológicos, como susceptibilidade do vegetal à infecção fúngica e capacidade genética do fungo em produzir micotoxinas, e ambientais, como as condições de desenvolvimento da planta, colheita e estocagem de grãos. O teor de umidade do grão e a temperatura de armazenagem são fatores críticos na regulação do crescimento de *F. verticillioides* e produção de micotoxinas. Além disso, o grau de maturação do grão influencia a sua produção, sendo maior em grãos mais maduros. (THIEL et al., 1991; CAHAGNIER et al., 1995; WARFIELD et al., 1999; DILKIN et al., 2002; ONO et al., 2002). A biossíntese de fumonisinas ocorre entre 20 e 30°C em substratos com a_w de 0,85 a 1,0 sendo que as condições ótimas são 25°C e a_w de 0,97 (CAHAGNIER et al., 1995; MARÍN et al., 1995 e 1999a).

As metodologias usualmente utilizadas na detecção e quantificação de fumonisinas incluem cromatografia em camada delgada (GELDERBLOM et al., 1988; ROSS et al., 1991; PLATTNER et al., 1990), cromatografia gasosa-espectroscopia de massa (JACKSON & BENNET, 1990; SYDENHAM et al., 1990) e cromatografia líquida de alta eficiência (GELDERBLOM et al., 1988; ALBERTS et al., 1990; SHEPHARD et al., 1990; WILSON et al., 1990; ROSS et al., 1991). Além destas, os ensaios imunoenzimáticos constituem uma alternativa muito útil apresentando vantagens como alta sensibilidade, reprodutibilidade e facilidade de execução (AZCONA-OLIVEIRA et al., 1992a e b; PESTKA et al., 1995).

A semelhança estrutural das fumonisinas aos esqueletos carbônicos de esfingolípídeos indica que estas toxinas afetam o seu metabolismo. As fumonisinas inibem a esfingosina *N*-acetil transferase (ceramida sintase), uma enzima da síntese de esfingolípídeos, levando ao acúmulo de bases esfingóides (esfinganina e esfingosina) e uma depleção de esfingolípídeos, o que altera a proliferação e diferenciação celular e a regulação da apoptose (WANG et al., 1991). Este desequilíbrio no metabolismo de esfingolípídeos poderia estar relacionado à ação tóxica e carcinogênica em animais, uma vez que o acúmulo de esfinganina inibe o crescimento celular e é citotóxico, e a falta de esfingolípídeos altera o comportamento celular (SWEeley apud WANG et al., 1991; DILKIN et al., 2003; MINERVINI et al., 2004).

Embora os limites legais para fumonisinas ainda não tenham sido estabelecidos, o “Mycotoxin Committee of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians” recomenda os níveis máximos de 5, 10, 50 e 50 µg/g para rações de eqüinos, suínos, bovinos e aves, respectivamente (MUNKVOLD & DESJARDINS, 1997). A Suíça recomenda o limite de 1 µg/g para os derivados de milho destinados ao consumo

humano (VISCONTI & BOENKE, 1995). A “Food and Drug Administration” (FDA) recomenda para o consumo humano, o nível máximo de 2,0 µg/g de fumonisinas (FB₁ + FB₂ + FB₃) para farelos de milho, 3,0 µg/g para milho pipoca e 4,0 µg/g para milho destinado à produção de massas (AVANTAGGIATO et al., 2002).

3.2.1 Biossíntese de fumonisinas

A via biossintética das fumonisinas ainda não foi completamente elucidada, porém acredita-se que sejam sintetizadas através da via de policetidas, pela condensação da alanina a um precursor derivado do acetato. Estudos indicaram que os C-1 e C-2 da FB₁ são provenientes da alanina, enquanto que os C-3 a C-20 são derivados do acetato. Os grupos metil nos C-12 e C-16 são derivados da metionina e os átomos de oxigênio ligados diretamente ao esqueleto da molécula são derivados do oxigênio molecular (DESJARDINS et al., 1996a; SWEENEY & DOBSON, 1999; SEO et al., 2001).

A biossíntese de micotoxinas ocorre a partir de moléculas simples, com aumento de complexidade geralmente incluindo condensações, hidroxilações e oxigenações. Baseados neste princípio, DESJARDINS et al. (1996a) propuseram uma via para as etapas finais da síntese de fumonisinas. Nesta via, a FB₄ seria precursora tanto de FB₂ quanto de FB₃, que seriam formadas pela hidroxilação do esqueleto carbônico da FB₄ nas posições C-5 e C-10, respectivamente. FB₂ e FB₃ seriam então precursores diretos da FB₁, que seria formada via hidroxilação da FB₂ no C-10 e da FB₃ no C-5. Desta forma, a biossíntese de fumonisinas ocorreria do homólogo menos oxigenado (FB₄) para o mais oxigenado (FB₁). Porém, PROCTOR et al. (1999a) observaram, através de uma série de experimentos, que na realidade, a FB₄ é um precursor primário de FB₂ e que a FB₃ é precursora primária da FB₁, não havendo conversão de FB₂ em FB₁ (Figura 2). Sendo assim, em algum ponto da biossíntese de fumonisinas, anterior à formação de FB₄, a via poderia seguir dois caminhos distintos, levando à formação de FB₁ ou FB₂. A conversão de FB₄ em FB₃ foi observada em uma proporção muito baixa (5%).

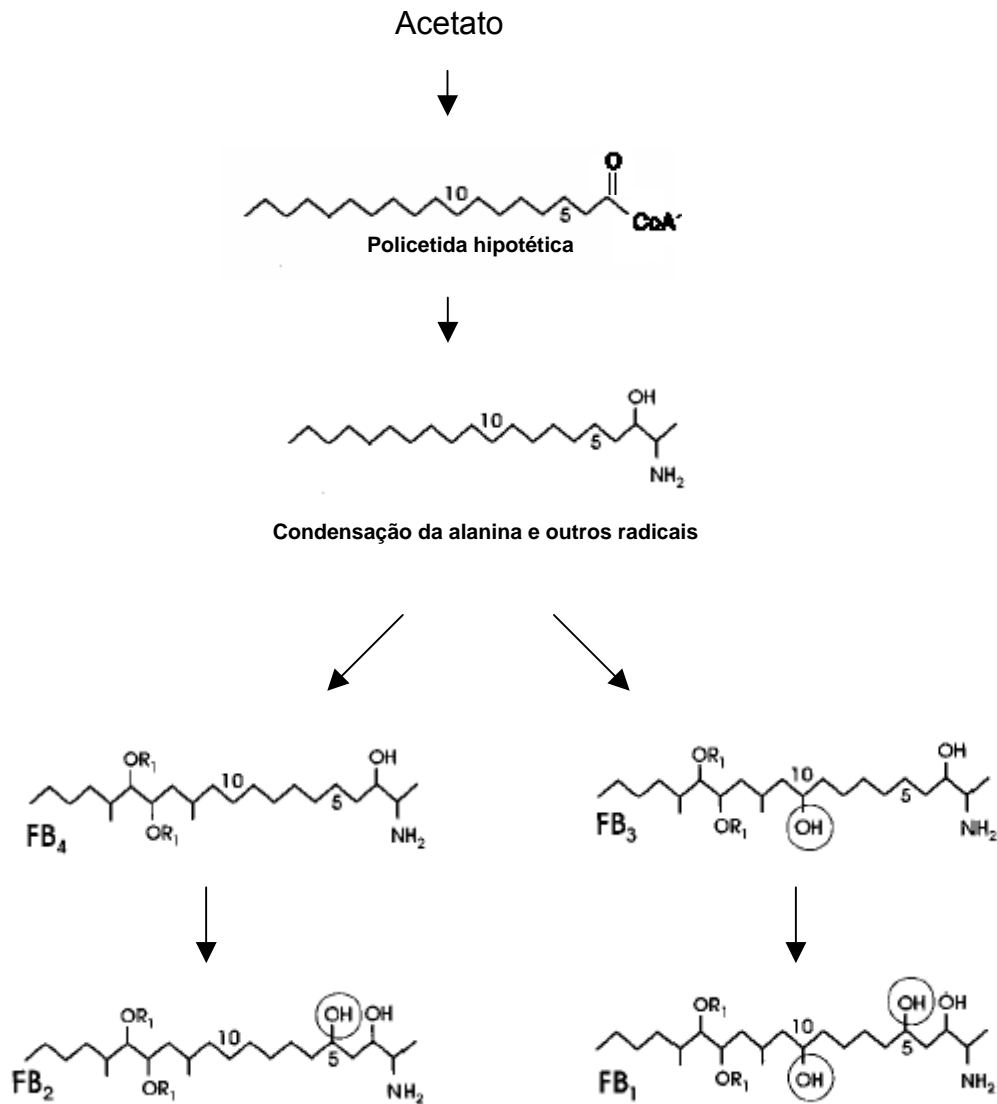


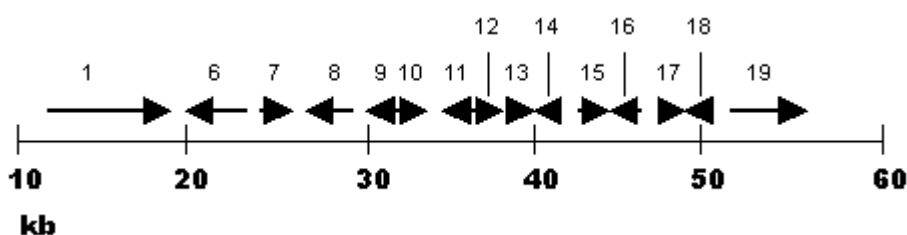
Figura 2 – Esquema da via biossintética proposta por PROCTOS et al (1999a) para afumonisinas da série B. R₁ indica ésteres tricarbálicos (TCA). Os radicais CH₃ dos C-10 e C-14 não estão representados. A ordem das condensações da alanina, grupamentos e TCA ainda não é conhecida.

3.2.2 Genética da produção de fumonisinas

Em fungos filamentosos, genes envolvidos na biossíntese de metabólitos secundários encontram-se geralmente agrupados em conjuntos denominados “clusters”, que

incluem genes codificadores de enzimas, fatores de transcrição e transportadores (KELLER & HOHN, 1997).

A síntese de fumonisinas é coordenada por um cluster composto por 15 genes (Figura 3), localizado no cromossomo 1 (PROCTOR et al., 2003). O agrupamento destes genes foi evidenciado pela primeira vez através da descoberta da ligação entre 3 loci de *Gibberella moniliformis*, definidos como *fum1*, *fum2* e *fum3*. Para estes 3 loci foram encontrados alelos variantes que conferiam fenótipos de produção de fumonisinas alterados. Linhagens possuindo o alelo *fum1* mutante não produziam níveis detectáveis de nenhum tipo de fumonisina. Linhagens mutantes que possuíam o alelo *fum2* defeituoso eram incapazes de hidroxilar a posição C-10, e como resultado produziam apenas FB₂ e FB₄, enquanto que linhagens com o alelo *fum3* defeituoso não hidroxilavam a posição C-5, produzindo apenas FB₃ e FB₄ (DESJARDINS et al., 1996b; PROCTOR et al., 1999a). Subseqüentemente, 5 genes agrupados (FUM5, FUM6, FUM7, FUM8 e FUM9) foram identificados e caracterizados, observando-se através de interrupção e análise de expressão, que estes estavam envolvidos na biossíntese de fumonisinas (PROCTOR et al., 1999b; SEO et al., 2001). PROCTOR et al. (2003) identificaram mais 10 genes relacionados à produção destas toxinas. Uma análise complementar mostrou que o locus *fum1* e *fum5* eram o mesmo gene, agora denominado FUM1.



Fonte: PROCTOR et al. (2003).

Figura 3 – Esquema do cluster FUM de *F. verticillioides*. As setas indicam a localização e a orientação dos genes. Os números 1 e 6-19 indicam os genes FUM1 e FUM6-19.

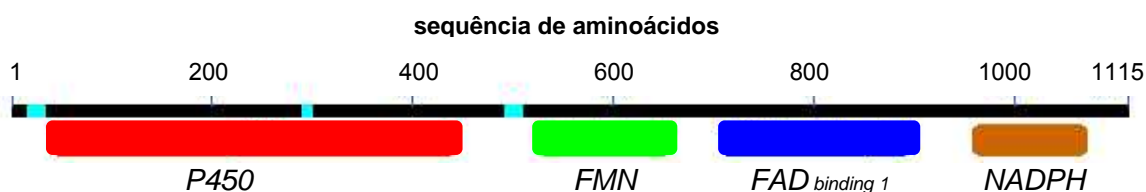
O cluster FUM inclui genes que codificam enzimas e proteínas similares a policetida sintases (FUM1), citocromo P450 monooxigenases (FUM6, FUM12 e FUM15), desidrogenases (FUM7 e FUM13), amino transferases (FUM8), dioxigenases (FUM3), acil-CoA graxo sintetases (FUM10 e FUM16), transportadores de tricarboxilato (FUM11), peptídeo sintetases (FUM14), fatores de longevidade (FUM17 e FUM18) e transportadores

ABC (FUM19) (SEO et al., 2001; PROCTOR et al., 1999b e 2003; BUTCHKO et al., 2003; DING et al., 2004).

Diversos estudos de interrupção gênica vêm sendo realizados visando uma melhor compreensão do papel de cada gene na via biossintética de fumonisinas.

SEO et al. (2001) realizaram um estudo onde os genes FUM6 e FUM8 foram interrompidos e observaram que os mutantes obtidos não produziam níveis detectáveis de fumonisinas.

O gene FUM6 possui uma região codificante de 3593 pares de base (pb) contendo 3 íntrons (61, 130 e 54 nucleotídeos de comprimento), sendo que o produto final de transcrição possui 3292-3295 nucleotídeos. Aparentemente este gene codifica um produto pertencente a uma pequena família de enzimas, consistindo de uma fusão entre uma citocromo P450 monooxigenase e uma citocromo P450 redutase NADPH-dependente. Estas enzimas são hidroxilases que utilizam o O₂ como fonte de oxigênio na formação de hidroxilas. Uma análise mais profunda mostrou que seqüências de aminoácidos do produto Fum6p eram similares ao domínio de ligação heme da citocromo P450 monooxigenase e aos domínios de ligação às coenzimas FMN, FAD e NADPH, típicos de citocromo P450 redutases NADPH-dependentes. Estes domínios se apresentaram na mesma ordem daqueles de outras enzimas da mesma família (Figura 4). Uma vez que há evidência de que os grupos hidroxila nos C3, C5 e C10 e os oxigênios nos C14 e C15 são derivados de oxigênio molecular, FUM6 poderia ser responsável pela hidroxilação de uma dessas posições (SEO et al., 2001).



Fonte: NCBI (2005).

Figura 4 – Localização dos domínios conservados dentro da provável seqüência de aminoácidos codificada pelo gene FUM6 de *F. verticillioides*.

A interrupção do gene FUM6 foi realizada através de um vetor carregando a região codificante do FUM6 com as seguintes alterações: os primeiros 142 e os últimos 638 nucleotídeos foram deletados, e 214 nucleotídeos (de 1343 a 1557) no meio da região

codificante foram substituídos pelo gene *HygB* (que confere resistência à higromicina B). Análises por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) mostraram que os transformantes obtidos produziam níveis inferiores a 25 µg de FB₁/g de milho e FB₂ e FB₃ não foram detectadas, enquanto que as linhagens selvagens produziam as três toxinas (139-6735 µg/g para FB₁, 17-1774 µg/g para FB₂ e 18-834 µg/g para FB₃). Uma análise mais sensível, através de cromatografia líquida-espectroscopia de massa (LC-MS), mostrou que os mutantes não produziam níveis detectáveis de nenhum tipo de fumonsina avaliado, e que os baixos níveis de FB₁ encontrados por CLAE eram mais provavelmente um artefato (SEO et al., 2001)

O gene FUM8 possui 2532 pb, apresentando 4 íntrons (80, 127, 86 e 122 nucleotídeos de comprimento). Este gene codifica uma α -aminotransferase classe II, um grupo de enzimas que catalisa a condensação de aminoácidos e acil-CoAs. Sendo assim, o produto do gene FUM8 deve catalisar a condensação da alanina ao acetato. A interrupção deste gene também levou a um bloqueio da síntese de fumonisinas (SEO et al., 2001).

A interrupção do gene FUM1 (=FUM5) causou uma redução da produção de fumonisinas em até 99%. O gene FUM1 apresenta uma região codificante de 8163 pb e 5 íntrons (57 a 85 nucleotídeos de comprimento). A proteína codificada por este gene apresenta alta similaridade com policetida sintases fúngicas e bacterianas. Acredita-se que esta enzima catalise a síntese do esqueleto carbônico da fumonisina do C-3 até o C-20 a partir de acetato (PROCTOR et al., 1999b e 2003).

A interrupção dos genes FUM17, FUM18 e FUM19 não causou alterações significativas na síntese de toxinas. Estes genes codificam fatores de proteção celular e transportadores, porém a ausência de seus produtos poderia ser compensada por outras proteínas, o que explicaria o fato de a ruptura desses genes não alterar a biossíntese de fumonisinas (PROCTOR et al., 2003).

BUTCHKO et al. (2003) realizaram um estudo onde o gene FUM3 (=FUM9) foi deletado e observaram que os mutantes obtidos produziam apenas FB₃ e FB₄. O gene FUM3 possui uma região codificante de 903 pb e nenhum íntron. Este gene codifica uma dioxigenase, que realiza a hidroxilação do C-5 da molécula de fumonisina. Sendo assim, na ausência desta enzima não há formação de FB₁ e FB₂ (BUTCHKO et al., 2003; DING et al., 2004).

Aparentemente, nenhum dos 15 genes pertencentes ao cluster FUM apresentam função regulatória. Porém, recentemente, alguns genes foram descritos como possíveis reguladores da biossíntese de fumonisinas.

FLAHERTY et al. (2003) isolaram o gene PAC1 e, aparentemente, seu produto inibe a produção de fumonisinas em condições alcalinas. Os autores observaram que um mutante com este gene interrompido apresentou produção de FB₁ e expressão do gene FUM1 em pH 8,4, enquanto que o isolado selvagem não produziu níveis detectáveis de FB₁ e a expressão de FUM1 foi até 45 vezes menor do que no mutante. Os resultados indicaram que o produto Pac1 atua como um repressor transcricional de genes estruturais de fumonisinas.

O gene FCC1 codifica proteínas semelhantes a ciclinas do tipo C, uma classe de proteínas envolvidas na ativação transcricional ou repressão de genes associados a respostas ao stress e desenvolvimento. Isolados de *F. verticillioides* que possuem FCC1 interrompido não são capazes de produzir FB₁ em milho. Observou-se também que o gene FUM5 não se expressava no isolado mutante. Porém, quando o mutante foi cultivado em meio sintético, em condições ácidas, a produção de FB₁ foi restabelecida. A maneira com que a condição ácida restaura a capacidade de produção de toxinas ainda não é conhecida. Estes dados sugerem que o gene FCC1 apresenta um papel muito importante na transdução de sinais na regulação da biossíntese de fumonisinas (SHIM & WOLOSHUK, 2001).

Recentemente identificou-se um terceiro gene (ZFR1), que aparentemente atua na regulação da síntese de fumonisinas. Este gene codifica uma proteína semelhante às da família do cluster binuclear Zn(II)₂Cys₆, que são reguladoras tanto do metabolismo primário quanto do secundário, em fungos filamentosos. Mutantes com ZFR1 interrompidos não foram capazes de produzir FB₁ em meio sintético e a produção em milho foi menor do que 10%, quando comparada à do isolado selvagem, em grãos de milho. Transcritos dos genes FUM1 e FUM8 não foram detectados por análise de Northern blot. Com base nessas evidências, acredita-se que o produto do gene ZFR1 seja um regulador positivo na biossíntese de fumonisinas (FLAHERTY & WOLOSHUK, 2004).

O resultados relatados até o momento indicam que mutações em genes do cluster FUM ou em genes reguladores da biossíntese de fumonisinas podem levar a fenótipos de produção da toxina diferenciados.

3.3 EXOANTÍGENOS E ELISA NA DETECÇÃO DE FUNGOS

Os exoantígenos são macromoléculas imunogênicas produzidas por fungos durante o crescimento (LI et al., 2000). Estes apresentam grande valor, tanto na

imunoidentificação de fungos patogênicos como na resolução de problemas taxonômicos, uma vez que a maioria dos fungos produz exoantígenos espécie-específicos (KAUFFMAN & STANDARD, 1987). Uma outra vantagem da utilização de exoantígenos para a detecção de fungos em alimentos está na sua termoestabilidade, solubilidade em água e presença apenas em alimentos contaminados (NOTERMANS & HEUVELMAN, 1985). Conseqüentemente, os exoantígenos são detectados por ELISA mesmo após o processamento térmico, fornecendo inclusive informações sobre possíveis contaminações fúngicas de alimentos processados (NOTERMANS et al., 1986). Outros estudos relatam uma maior especificidade dos exoantígenos quando comparados a antígenos micelianos (GAN et al., 1997; SHAPIRA et al., 1997).

Os ensaios imunoenzimáticos mais utilizados para a detecção de fungos toxigênicos são o ELISA competitivo direto, ELISA competitivo indireto e ELISA sanduíche (HEFLE, 1995).

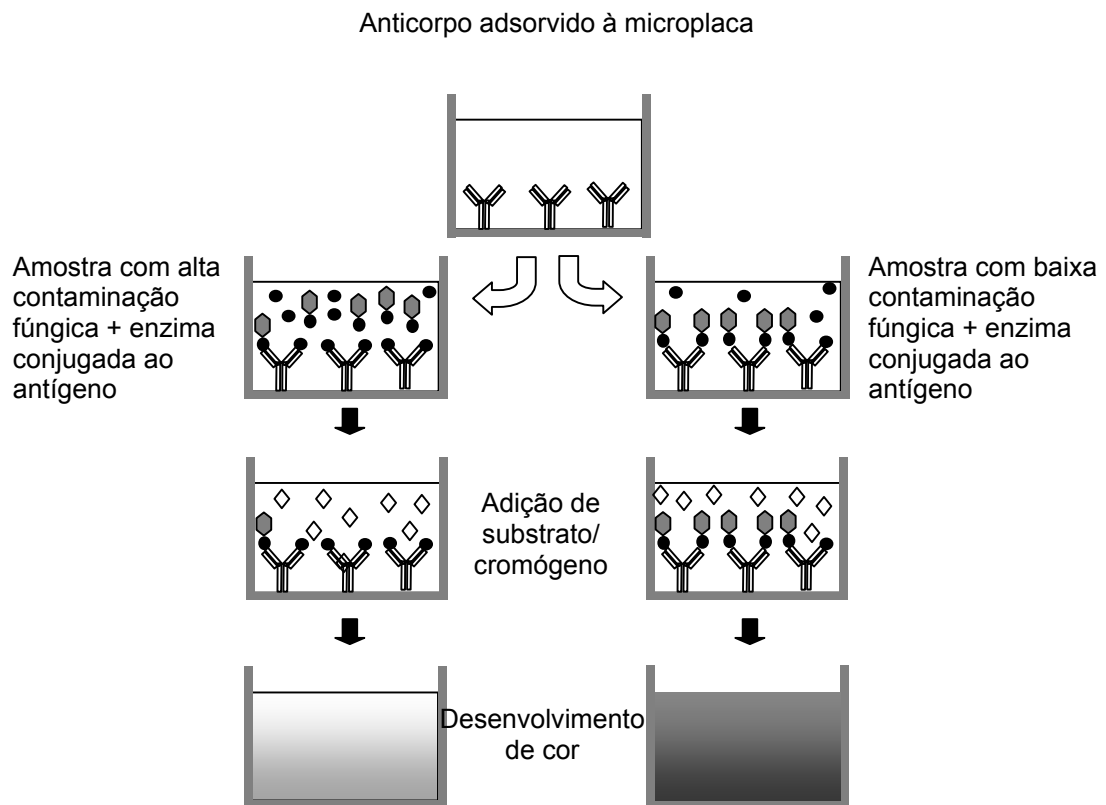
No ELISA competitivo direto, a microplaca é sensibilizada com anticorpo (Figura 5). O antígeno marcado com a enzima é misturado com a amostra contendo o antígeno, que compete pelo anticorpo de quantidade limitada, portanto quanto maior a quantidade de antígeno na amostra, menor quantidade de antígeno marcado vai se ligar ao anticorpo. Assim a absorvância após a adição do substrato será inversamente proporcional à concentração do antígeno presente na amostra (HEFLE, 1995).

No ELISA competitivo indireto, a microplaca é sensibilizada com o antígeno (Figura 6). Na etapa seguinte, a amostra contendo o antígeno e o anticorpo são adicionados à microplaca. Quanto mais antígeno estiver presente na amostra, menos anticorpo livre estará disponível para o antígeno fixado à placa. A adição de um anticorpo secundário marcado com enzima, específico para o anticorpo primário, pode determinar a quantidade de anticorpo primário ligado à placa. Assim, quanto maior a concentração de antígeno na amostra, menor a absorvância (HEFLE, 1995).

O ELISA sanduíche apresenta duas etapas de complexação (Figura 7). Na primeira etapa os anticorpos não marcados são fixados na fase sólida e reagem com o antígeno presente na amostra, promovendo sua captura e imobilização. Na segunda etapa, um segundo anticorpo marcado com a enzima e específico para um epítopo diferente no antígeno é adicionado para reagir com o antígeno ligado. Após a remoção de qualquer anticorpo secundário livre, o substrato é adicionado e com a ação da enzima ocorrerá uma mudança na cor. A intensidade da cor é uma medida direta do anticorpo marcado que foi ligado e, conseqüentemente da quantidade de antígeno presente na amostra (HEFLE, 1995).

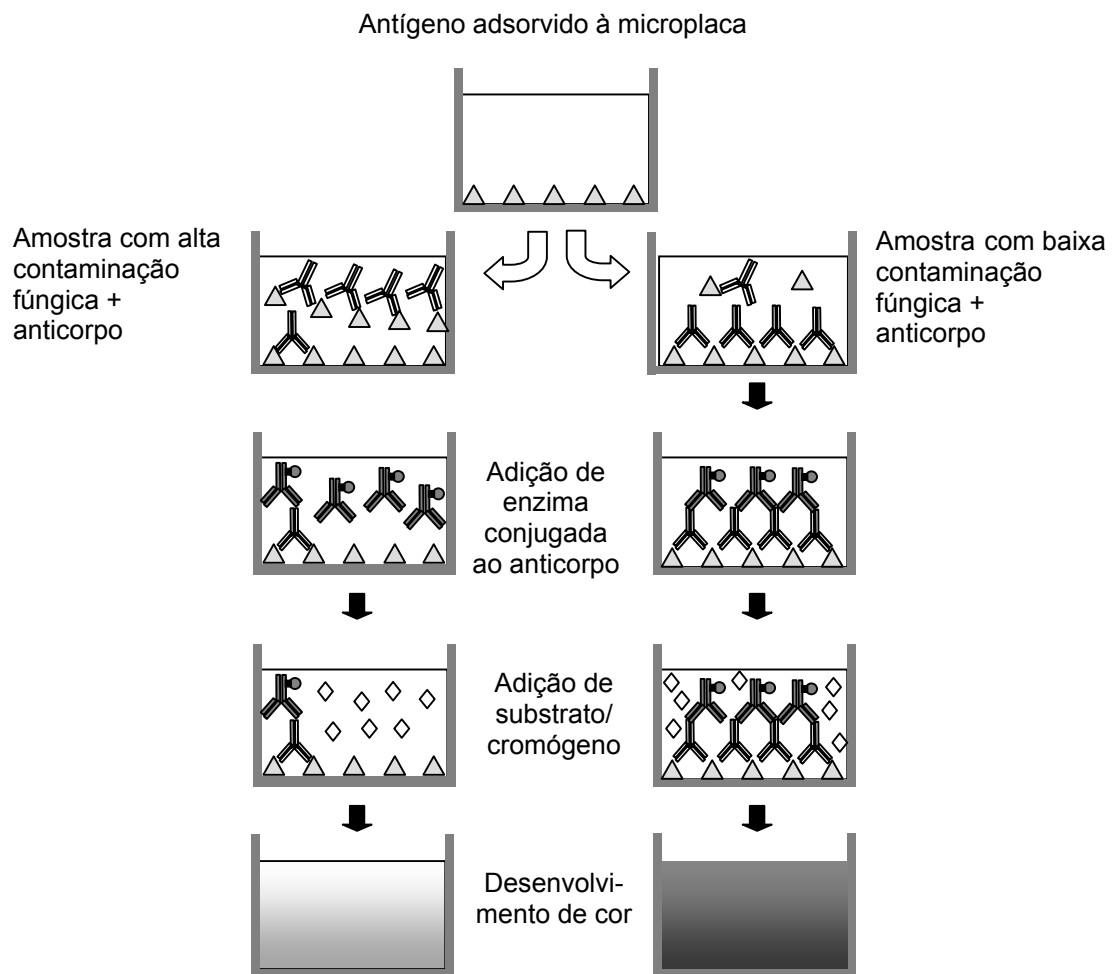
Em um dos primeiros estudos utilizando os ensaios imunoenzimáticos para a identificação de fungos, SEKHON et al. (1982) observaram que o soro imune para *Penicillium marneffei* reagia apenas com cepas desta espécie e com uma espécie de *Penicillium* não identificada, não havendo reação cruzada com outras espécies deste gênero ou com *Aspergillus*.

NOTERMANS & HEUVELMAN (1985), utilizando antígenos de *Mucor racemosus*, *Penicillium verucosum* var. *cyclopium* e *Fusarium oxysporum*, demonstraram que as frações antigênicas eram relativamente gênero-específicas. Os antígenos isolados de *M. racemosus* H473 estavam presentes em todas as espécies de *Mucor* testadas, os de *F. oxysporum* foram encontrados em todas as espécies de *Fusarium* testadas e os de *P. verucosum* var. *cyclopium* estavam presentes em todas as espécies de *Penicillium* e *Aspergillus* testadas.



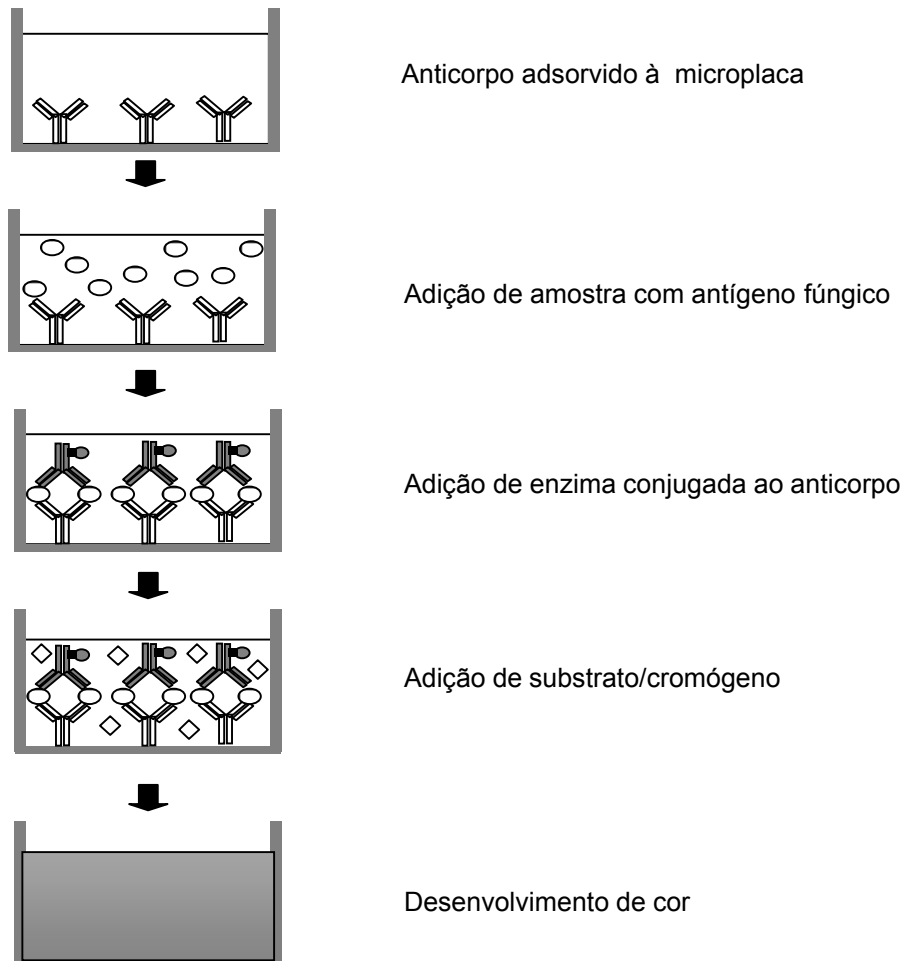
Fonte: ONO et al. (2004)

Figura 5 - ELISA competitivo direto



Fonte: ONO et al. (2004)

Figura 6 - ELISA competitivo indireto



Fonte: ONO et al., in press

Figura 7 - ELISA sanduíche

NOTERMANS et al. (1986), testando 188 amostras de diferentes produtos alimentícios, concluíram que o ELISA para detecção de fungos em alimentos é um método sensível e confiável. A especificidade de gênero também foi demonstrada para espécies de *Botrytis*, *Monascus*, *Cladosporium*, *Geotrichum* e para a ordem Mucorales (LIN & COUSIN, 1987; TSAI & COUSIN, 1990; COUSIN et al., 1990; DE RUITER et al., 1991).

LIN et al. (1986) desenvolveram um ELISA para a detecção de fungos em purê de tomate e compararam a eficiência deste método na detecção de fungos crescidos em meio de cultivo artificial, tomate fresco e processado. Não houve alteração da eficiência do método em cada situação, ressaltando a viabilidade da utilização do ensaio imunoenzimático em alimentos processados.

A detecção de fungos em alimentos através de ELISA também foi realizada em queijo e iogurte (TSAI & COUSIN, 1990). Foram testados soros imunes produzidos contra exoantígenos de *Aspergillus versicolor*, *Cladosporium herbarum*, *Geotrichum candidum*, *Mucor circinelloides* e *Penicillium chrysogenum*. A sensibilidade dos anticorpos variou entre 1ng a 1µg/mL dependendo do fungo testado. Anticorpos contra *Cladosporium*, *Geotrichum* e *Mucor* apresentaram reatividade cruzada apenas com espécies do mesmo gênero, enquanto que os anticorpos contra *Aspergillus* e *Penicillium* apresentaram reatividade cruzada entre si. Os fungos foram detectados nos alimentos no 2º dia de contaminação, antes que esta se tornasse visível.

Um ensaio imunoenzimático desenvolvido para identificação de *Penicillium aurantiogriseum* demonstrou que o anticorpo produzido contra este fungo era específico para esta espécie, e apresentou mínima reação cruzada com exoantígenos de outras cinco espécies de *Penicillium* (*P. chrysogenum*, *P. citrinum*, *P. commune*, *P. roqueforti* e *P. verrucosum*), quatro espécies de *Aspergillus* (*A. candidus*, *A. flavus*, *A. ochraceus* e *A. versicolor*), três espécies de *Fusarium* (*F. avenaceum*, *F. equiseti* e *F. poae*), duas de *Mucor* (*Mucor* sp. 1 e *Mucor* sp. 2) e *Alternaria alternata* (LU et al., 1994).

LU et al. (1995) desenvolveram um ELISA competitivo direto baseado em anticorpos policlonais produzidos contra exoantígenos de *Aspergillus ochraceus*. De 16 espécies fúngicas pertencentes a 5 gêneros, os anticorpos reconheceram apenas os exoantígenos de *A. ochraceus* e, em menor grau ($\leq 2,5\%$), outras três espécies de *Aspergillus* (*A. candidus*, *A. flavus* e *A. versicolor*). A sensibilidade apresentada pelos anticorpos foi de 190 ng.mL⁻¹. Os dados demonstraram que o ELISA competitivo desenvolvido utilizando anticorpos policlonais contra os exoantígenos de *A. ochraceus* foi quantitativo e espécie-

específico, sugerindo que estes anticorpos são aplicáveis na detecção deste fungo em grãos que também estejam contaminados com outras espécies fúngicas.

GAN et al. (1997) desenvolveram um ensaio imunoenzimático capaz de identificar espécies toxigênicas de *Fusarium*, além de determinar a concentração de exoantígenos em grãos. Galinhas foram imunizadas com antígenos micelianos solúveis e exoantígenos de *F. sporotrichioides*, *F. poae* e *F. graminearum*, seguida de caracterização dos antígenos por ELISA. O anticorpo produzido contra os antígenos micelianos solúveis apresentou reatividade cruzada com os antígenos de outros gêneros, inviabilizando a sua utilização no imunodiagnóstico. Por outro lado, o anticorpo contra os exoantígenos de *F. poae* era espécie-específico. Os estudos indicaram que os exoantígenos podem ser utilizados em imunoenaios para detectar *Fusarium* em nível de espécie. A eletroforese dos exoantígenos das três espécies de *Fusarium* em gel de poliacrilamida indicou que cada exoantígeno apresentava bandas que eram diferentes das outras duas espécies.

O imunoenensaio desenvolvido por GAN et al. (1997) também foi empregado para estimar as concentrações de exoantígenos de *Fusarium* em amostras de trigo macio e duro (ABRAMSON et al., 1998). Os autores procederam a análise de deoxinivalenol e ergosterol, um metabólito que reflete a biomassa fúngica, em trigo contaminado. Empregando o anticorpo produzido contra *F. sporotrichioides*, a correlação entre os níveis de exoantígenos e as concentrações de deoxinivalenol apresentou coeficientes de 0,80 e 0,76 para as amostras de trigo duro e macio, respectivamente. Com o mesmo antissoro, as correlações lineares entre os níveis de exoantígenos e a concentração de ergosterol total para as amostras de trigo duro e macio apresentaram coeficientes de 0,66 e 0,81 respectivamente, indicando que a quantidade de exoantígenos produzida por *F. graminearum* está diretamente relacionada à biomassa. Este estudo demonstrou que os imunoenaios que empregam exoantígenos podem ser úteis para a detecção e quantificação da contaminação de *Fusarium* em amostras de trigo duro e macio. O anticorpo gênero-específico permite a estimativa de *Fusarium* na presença de outros fungos de maneira rápida e simples (GAN et al., 1997). Este teste também pode servir como uma avaliação pré-colheita de espécies de *Fusarium* em amostras de trigo, podendo ser um sinal de advertência quanto à possível produção de deoxinivalenol em cereais e seus derivados (ABRAMSON et al., 1998).

Um outro estudo da produção de anticorpos contra exoantígenos de *A. ochraceus*, *A. flavus* e *A. versicolor* demonstrou que os anticorpos para *A. ochraceus* eram espécie-específicos (0% de reatividade cruzada), e que para *A. flavus* e *A. versicolor* eram gênero específicos, apresentando reatividade cruzada em diferentes níveis para outras espécies

de *Aspergillus*. O soro imune produzido contra exoantígenos de *A. ochraceus* apresentou uma sensibilidade de $0,61 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (CHEN et al., 2000). Estes resultados reforçam aqueles obtidos por Lu et al. (1995), mostrando que os anticorpos contra exoantígenos de *Aspergillus* podem ser utilizados na sua identificação.

YOUNG & COUSIN (2001) realizaram a detecção de *Aspergillus parasiticus* em milho e amendoim utilizando anticorpos contra seus exoantígenos. Foi realizada uma comparação entre a detecção do fungo por ELISA e a de aflatoxinas nos grãos em duas temperaturas diferentes de cultivo (15°C e 21°C). Os resultados indicaram que em milho, no cultivo a 15°C os antígenos puderam ser detectados no 4º dia, quando a concentração de aflatoxinas era de $0,16 \text{ ng/g}$; enquanto que a 21°C , os exoantígenos foram detectados também no 4º dia, porém neste período aflatoxinas não foram detectadas. Por outro lado, em amendoim, a 15°C os exoantígenos foram detectados no 4º dia e a 21°C , no 2º dia. Em ambas as condições não foram detectadas aflatoxinas no período. Estes resultados demonstram que os exoantígenos podem ser detectados antes mesmo da produção de toxinas pelo fungo, permitindo melhor controle da qualidade dos alimentos.

IYER & COUSIN (2003) desenvolveram um ELISA indireto para detectar espécies de *Fusarium* em fubá, utilizando antígenos micelianos de *F. verticillioides* e *F. graminearum*. A especificidade dos soros imunes foi testada 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 testadas. Entre os fungos testados, apenas *Eurotium repens*, espécies de *Monascus*, *Phoma exigua*, *Verticillium albo-atrum* e a maioria das espécies de *Fusarium* apresentaram reatividade superior a 30%. As quatro espécies não pertencentes a *Fusarium* podem apresentar epítomos (porção do antígeno reconhecida pelo anticorpo) em comum com as espécies utilizadas para a produção de anticorpos. Os fungos puderam ser detectados por ELISA num período de 24-36h de inóculo no fubá (10^2 a 10^3 CFU/mL) embora ainda não pudessem ser visualizados pelo método de contagem em placa. Os dados obtidos sugeriram que o ELISA indireto desenvolvido neste estudo pode detectar espécies de *Fusarium* mais rapidamente do que o método tradicional de contagem em placa.

Estes ensaios mostraram-se muito úteis não só na detecção de fungos, mas também na quantificação dos mesmos em alimentos, pelo fato de a produção de exoantígenos estar relacionada à biomassa fúngica (NOTERMANS & HEUVELMAN, 1985; NOTERMANS & SOENTORO, 1986; BANKS et al., 1993; DEWEY et al., 1993).

Além de serem utilizados na identificação de fungos, os exoantígenos têm

sido empregados para diferenciar vários fungos morfológicamente similares. NOTERMANS & SOENTORO (1986) demonstraram que anticorpos produzidos contra polissacarídeos extracelulares de *Penicillium digitatum* eram reativos com sobrenadantes de cultivo do gênero *Aspergillus* e de outras espécies do gênero *Penicillium*, exceto com espécies do subgênero *Biverticillium*.

KAUFMANN & STANDARD (1987) sugeriram que as características antigênicas dos fungos poderiam ser utilizadas como ferramentas taxonômicas, uma vez que são produzidas durante todo o crescimento do fungo e geralmente são independentes do meio de cultura, temperatura ou idade do cultivo.

FUHRMANN et al. (1989) demonstraram que anticorpos produzidos contra antígenos de *Penicillium verrucosum* var. *verrucosum* reconheciam apenas antígenos de espécies de *Penicillium*, exceto aquelas pertencentes ao subgênero *Aspergilloides*.

Anticorpos produzidos contra exoantígenos de *Cladosporium cladosporioides* e *C. herbarum* mostraram-se específicos para o gênero *Cladosporium*, enquanto que anticorpos contra *Mucor racemosus* e *M. circinelloides* eram reativos com antígenos dos gêneros *Mucor*, *Rhizomucor*, *Rhizopus*, *Thamnidium*, *Absidia* e *Syncephalastrum*, todos pertencentes à ordem Mucorales (NOTERMANS & SOENTORO, 1986; TSAI & COUSIN, 1990; DE RUITER et al., 1991).

Estes resultados mostram que as características antigênicas podem ser utilizadas como ferramenta na taxonomia até o nível de gênero, porém, com o aprimoramento da técnica pode ser possível atingir o nível de espécie.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Reagentes e materiais

As microplacas, de 96 poços com fundo chato, foram adquiridas da Corning Costar Corporation (USA); o conjugado anti-IgG de coelho-peroxidase, peróxido de hidrogênio, 3,3',5,5' tetrametilbenzidina, acrilamida, bis-acrilamida, soroalbumina bovina e padrão de fumonisinas (FB₁ e FB₂) foram adquiridos da Sigma Co. (USA). O ágar batata dextrose (BDA) e infusão de cérebro e coração bovino (BHI) foram adquiridos da Biobrás (Brasil). Os padrões de massa molecular de proteínas foram adquiridos da Bio-Rad (USA) (20,4 a 208 kDa) e Invitrogen (USA) (8,4 a 176,5 kDa). O marcador de massa molecular (50 pares de base), os primers utilizados e os reagentes para PCR também foram adquiridos da Invitrogen. O padrão de ergosterol foi adquirido da Fluka (Sigma-Aldrich Co., Alemanha). Os corantes Coomassie Brilliant Blue R-250 e G-250 foram adquiridos da Nuclear (Brasil) e Sigma Co. (USA), respectivamente. O metanol, isopropanol e acetonitrila (grau HPLC) foram adquiridos da J. T. Baker (USA). As colunas para pré-limpeza na extração de ergosterol (tC₁₈ Sep Pak Vac) e fumonisinas (Sep Pak accell plus QMA) foram adquiridas da Millipore-Waters (Alemanha). As colunas para análise por CLAE foram adquiridas da Macherey-Nagel (Alemanha), para ergosterol, e da Shimadzu (Japão), para fumonisinas. Os demais reagentes utilizados possuíam grau analítico.

4.1.2 Culturas fúngicas

Foram utilizados 16 isolados de *F. verticillioides* (97K, 97L, 97J, 164G, 113F, 113B, 103Br, 103F, 103G, 103H, 119Br, 119Fa, 119B, 162A, 104Ga e 118F) e *F. subglutinans*, gentilmente cedidos pela Dra. Elisa Yoko Hirooka (Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos, Centro de Ciências Agrárias da Universidade

Estadual de Londrina), *F. graminearum* e *F. sporotrichioides*, gentilmente fornecidos pelo Dr. Yoshio Ueno (Science University of Tokyo, Japão)

4.1.3 Amostras de milho

Quarenta amostras de milho (*Zea mays* L.) recém colhido foram coletadas diretamente de caminhões na recepção da Cooperativa Integrada (Andirá Paraná), durante as safras de fevereiro e março de 2004. Cada amostragem foi realizada através da coleta de 400 a 500 g de milho de 9 a 12 pontos da carroceria do caminhão, obtendo-se um total de 4 a 5 kg. As amostras foram classificadas segundo protocolo brasileiro (Brasil, 1976). Porções de 1 kg das amostras homogeneizadas, com umidade inicial entre 14.3 a 19.0% foram enviadas para o laboratório e mantidas a 4°C por um período inferior a 7 dias para análise microbiológica. Para a determinação de exoantígenos, ergosterol e fumonisinas, 200 g de cada amostra foram triturados, até atingirem granulometria de 50 “mesh”, e armazenados a -20°C até o momento do uso.

4.2 METODOLOGIA EXPERIMENTAL

4.2.1 Obtenção de exoantígenos

A melhor condição para produção de exoantígenos foi determinada a partir do cultivo de *F. verticillioides* 162A em 6 diferentes condições.

Após o cultivo de *F. verticillioides* 162A em BDA a 28° C por 7 dias, uma suspensão de esporos (10^7 esporos/mL) foi preparada em solução de Tween 80 0,1% em água destilada estéril (v/v). Alíquotas de 1 mL da suspensão de esporos foram transferidas para erlenmeyers de 1 L contendo 250 mL de caldo BHI. O experimento foi realizado em duplicata. Os cultivos foram incubados a 28° C em condição agitada (180 rpm) ou estacionária por 7, 14 e 21 dias e inativados com timerosal 0,02% por 24 horas a 4° C.

Após a inativação, os cultivos foram filtrados a vácuo em papel de filtro Whatman n.º 1 e centrifugados a 4500 x g a 4° C por 20 minutos. O sobrenadante contendo os exoantígenos foi liofilizado e ressuscitado em 2 mL de tampão fosfato salina 0,15M (PBS). O material foi dialisado por 24 horas a 4° C contra água deionizada e PBS (2 últimas trocas) em tubos de diálise com limite de exclusão de 12 - 16 kDa e armazenado a -20° C até o momento do uso.

A condição que apresentou maior concentração de proteínas foi selecionada para a obtenção de exoantígenos dos demais isolados de *F. verticillioides* (97K, 113F, 103Br, 164G, 103F, 119Br e 104Ga) e demais espécies de *Fusarium* (*F. sporotrichioides*, *F. subglutinans* e *F. graminearum*).

4.2.2 Determinação da concentração de proteínas

A concentração de proteínas dos exoantígenos foi determinada segundo a metodologia de BRADFORD (1976), utilizando soroalbumina bovina como padrão. As leituras foram realizadas a 595nm em espectrofotômetro (FEMTO 600 plus).

4.2.3 Determinação da concentração de carboidratos totais

A concentração de carboidratos totais dos exoantígenos foi determinada segundo DUBOIS et al. (1956), utilizando glicose como padrão. As leituras foram realizadas a 490nm em espectrofotômetro (FEMTO 600 plus).

4.2.4 Eletroforese Desnaturante em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

Os exoantígenos foram submetidos a SDS-PAGE, segundo LAEMMLI (1970), utilizando gel de empilhamento (5%) e gel de separação (10%), juntamente com padrões de massa molecular de 20,4 a 208 kDa e de 8,4 a 176,5 kDa. A corrida eletroforética

foi realizada em tampão Tris-glicina pH 8,3 a 60V por 4 horas.

As bandas de proteínas foram reveladas pelo método da prata (NIELSEN & BROWN, 1984).

4.2.5 Imunização dos coelhos e obtenção de anticorpos

Os exoantígenos dos 3 isolados de *F. verticillioides* (97K, 113F e 162A) que apresentaram concentrações de proteínas mais elevadas e maior número de bandas foram selecionados para a imunização dos coelhos.

Os anticorpos para os exoantígenos dos 3 isolados foram produzidos a partir de imunizações de 3 coelhos machos, adultos jovens, da raça Nova Zelândia. A concentração dos exoantígenos foi ajustada para 320 µg/mL e então homogeneizados (v/v) com adjuvante incompleto de Freund. Os coelhos foram imunizados com 3 doses de exoantígeno (0,5 mL contendo 80 µg de exoantígenos) por via subcutânea com intervalos de uma semana entre as doses. Uma semana após a 3ª dose o sangue de cada animal foi coletado e os soros foram titulados por imunodifusão radial dupla e ELISA indireto.

4.2.6 Imunodifusão radial dupla

A imunodifusão radial dupla foi realizada em gel de ágar segundo CAMARGO et al. (1988). Os exoantígenos (300 µg/mL) foram adicionados ao orifício central e 30 µL de cada diluição do soro imune (1:2 a 1:32) foram adicionados aos orifícios laterais. Após 24 horas, as lâminas foram lavadas com salina por 2 dias. Em seguida as lâminas foram desidratadas e coradas com Comassie Brilliant Blue R-250.

4.2.7 ELISA indireto

A titulação dos anticorpos policlonais foi realizada por ELISA indireto de acordo com o método de ENGVALL & PEARLMANN (1971) com algumas modificações. Os anticorpos policlonais foram testados nas diluições de 1:100 a 1:12.800 e os exoantígenos nas concentrações de 2 a 16 µg/mL.

A microplaca foi sensibilizada com 100 µL/poço de exoantígenos de *F. verticillioides* em tampão carbonato/bicarbonato 0,2 M pH 9,6 seguido de incubação a 4° C por 16 horas. Após 3 lavagens com PBS-Tween 20 0,05% (PBS-T), a microplaca foi bloqueada com 150 µL de PBS-leite desnatado 1% a 25° C por 30 minutos. A placa foi novamente lavada 3 vezes com PBS-T e 100 µL de diluições dos soros imunes e pré-imune (1:100) em PBS-leite desnatado 1% foram adicionados e incubados a 25° C por uma hora. Após lavagens da microplaca conforme previamente descrito foram adicionados 100 µL do conjugado anti-IgG de coelho-peroxidase (1:1.000) seguido de incubação a 25° C por uma hora. A microplaca foi novamente lavada 3 vezes com PBS-T e uma vez com PBS, seguido da adição de 100 µL da solução de substrato/cromógeno (H₂O₂/tetrametilbenzidina) e incubação a 25°C por 15 minutos. A reação foi bloqueada com 50 µL de H₂SO₄ 1M e as absorvâncias foram determinadas a 450 nm em leitora de ELISA (ELX 800 Reader - Bio Tek Instruments, Inc). Como controle negativo foram utilizados os soros pré-imunes (1:100), sendo as amostras consideradas positivas quando apresentaram leitura de absorvância 2 vezes maior que a do controle negativo.

4.2.8 ELISA competitivo indireto

Um ELISA competitivo indireto (ic-ELISA) foi desenvolvido empregando anticorpos policlonais produzidos em coelhos imunizados com exoantígenos de *F. verticillioides*.

A microplaca foi sensibilizada com 100 µL de exoantígenos (0,4 µg/poço) em tampão carbonato/bicarbonato 0,2M pH 9,6 seguido de incubação a 4°C por 16 horas. Após lavagem com PBS-Tween 20 0,05%, a placa foi bloqueada com 150 µL de PBS-leite

desnatado 1% por 3 horas a 25°C. Após nova lavagem com PBS-Tween, a placa foi adicionada de 50 µL de soro imune (1:200) e 50 µL de diluições seriadas de exoantígenos em PBS-leite e incubada a 4°C por 16 horas. Após a lavagem foram adicionados 100 µL de conjugado anti-IgG de coelho-peroxidase seguido de incubação a 25°C por 1,5 hora. A microplaca foi novamente lavada e a reação foi revelada pela adição de 100 µL de substrato/cromógeno (H₂O₂/3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) e incubação por 15 minutos a 25°C. O bloqueio da reação foi realizado com 50 µL de H₂SO₄ 1M. As absorvâncias foram determinadas a 450 nm em leitora de ELISA.

Os resultados foram expressos como percentagem de ligação:

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

O limite de detecção foi estimado através da concentração mínima acima de 22% de inibição (3-SD de 0ng exoantígeno.g⁻¹) (IIJIMA et al., 1996).

A reatividade cruzada dos anticorpos policlonais (Tabela 2), com 14 espécies de fungos pertencentes a outros gêneros foi baixa (4,5 a 14,7%), sendo a maior reatividade observada para os exoantígenos do gênero *Fusarium* (51% a 76%) (BIAZON, 2004).

Tabela 2 – Reatividade cruzada do soro imune produzido contra exoantígenos de *F. verticillioides* 97K com exoantígenos de diferentes espécies e gêneros fúngicos

Exoantígenos	Reatividade Cruzada (%)
<i>Fusarium graminearum</i>	51,16 ± 0,74
<i>F. subglutinans</i>	76,00 ± 2,31
<i>F. sporotrichioides</i>	65,77 ± 5,65
<i>Aspergillus niger</i>	5,31 ± 1,05
<i>A. ochraceus</i>	5,62 ± 1,21
<i>A. flavus</i>	5,57 ± 1,40
<i>A. carbonarius</i>	5,05 ± 0,30
<i>Penicillium citrinum</i>	14,67 ± 0,78
<i>P. funiculosum</i>	7,12 ± 0,02
<i>P. variable</i>	6,97 ± 0,29
<i>P. purpurogenum</i>	8,33 ± 0,13
<i>P. brevicompactum</i>	7,03 ± 0,25
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	9,75 ± 0,06
<i>Mucor racemosus</i>	10,05 ± 0,37
<i>Alternaria alternata</i>	9,14 ± 0,77
<i>Cercospora zea-maiz</i>	6,61 ± 0,27
<i>Colletotrichum graminicola</i>	4,54 ± 0,37

Fonte: BIAZON, 2004.

4.2.9 Avaliação do efeito de periodato de sódio sobre os exoantígenos

A avaliação do efeito de periodato de sódio sobre os exoantígenos de *F. verticillioides* e outras espécies de *Fusarium* foi realizada por ELISA indireto segundo WOODWARD et al. (1985).

Para a padronização da concentração de periodato de sódio a ser utilizada, as microplacas foram sensibilizadas com 100 µL de exoantígenos de *F. verticillioides* ou outras espécies fúngicas com concentração de 8 µg/mL, diluídos em tampão carbonato/bicarbonato pH 9,0 a 4 °C por 16 horas. Após lavagem com PBS-Tween (PBS-T), os sítios onde os exoantígenos não se ligaram foram bloqueados com 150 µL de PBS-leite desnatado a 1%, por 30 minutos, a 25°C. Após lavagens com PBS-T, a placa foi incubada com 100 µL de solução de periodato de sódio em diferentes concentrações (0,1 a 20mM) por 1 hora a 25°C e no escuro. Após este período a placa foi bloqueada com glicina 1% por 30 minutos, para reduzir os grupos aldeídos formados pela oxidação com periodato, evitando ligações não-específicas do antígeno ao anticorpo. A seguir, 100 µL do soro imune anti-*F. verticillioides* 97K foram adicionados e a placa foi incubada por 1 hora a 25°C. Após lavagens com PBS-T, foram adicionados 100 µL do conjugado anti-IgG de coelho-peroxidase incubando-se por 1 hora a 25°C. A revelação da reação foi realizada, após lavagens com PBS-T, pela adição de 100 µL de solução de H₂O₂/3,3',5,5'-tetrametilbenzidina. Após 15 minutos de incubação a 25°C, a reação foi bloqueada com 50 µL de H₂SO₄ 1M. As absorvâncias foram determinadas a 450 nm em leitora de ELISA.

Após a padronização da concentração de periodato de sódio, o mesmo procedimento foi repetido utilizando-se exoantígenos das outras espécies (*Fusarium graminearum*, *F. subglutinans*, *F. sporotrichioides*).

4.2.10 Contagem de bolores e leveduras e extração de exoantígenos de milho

Alíquotas de 10 g das amostras de milho trituradas foram diluídas em 90 mL de PBS, homogeneizadas e diluídas em série até 10⁻⁴. Alíquotas de 1 mL de cada diluição foram semeadas em placas de Petri contendo BDA pH 4,0, contendo cloranfenicol (50 µg/mL), através da técnica de semeadura em profundidade e incubadas a 28°C por 7 dias.

Após a contagem de bolores e leveduras, a identificação dos gêneros fúngicos foi realizada de acordo com os métodos preconizados por NELSON et al. (1983), SINGH et al. (1991) e SAMSON et al. (1995). A suspensão de milho foi filtrada em papel de filtro Whatman nº 1 e o filtrado foi armazenado a -20°C para posterior quantificação de exoantígenos de *F. verticillioides*.

4.2.11 Determinação de exoantígenos em milho

A determinação de exoantígenos extraídos de grãos de milho foi realizada através de ELISA competitivo indireto (ic-ELISA).

A microplaca foi sensibilizada com 100 µL de exoantígenos de *F. verticillioides* 97K (0,4 µg/poço), diluídos em tampão carbonato/bicarbonato 0,2M pH 9,0 a 4 °C por 16 horas. Após lavagem com PBS-Tween (PBS-T), a placa foi bloqueada com 150 µL de PBS-leite desnatado a 1%, por 3 horas, a 25°C. Após lavagens com PBS-T, 50 µL de soro imune anti-*F. verticillioides* 97K e 50 µL de exoantígenos extraídos das amostras de milho foram incubados por 16 horas a 4°C. Após lavagens com PBS-T, foram adicionados 100 µL do conjugado anti-IgG de coelho-peroxidase, incubando-se por 1,5 hora a 25°C. A revelação da reação foi realizada após lavagens com PBS-T, pela adição de 100 µL de solução de H₂O₂/3,3',5,5'-tetrametilbenzidina. Após 30 minutos de incubação a 25°C, a reação foi bloqueada com 50 µL de H₂SO₄ 1M. A leitura da absorvância foi realizada a 450 nm em leitora de ELISA.

4.2.12 Cultivo de *F. verticillioides* para determinação de biomassa e exoantígenos

Para a avaliação da correlação entre biomassa e exoantígenos, alíquotas de 1 mL de suspensão de esporos de *F. verticillioides* 97K (10⁷ esporos/mL) foram inoculadas em caldo BHI (50 mL), a 28°C, sob agitação (180 rpm), por diferentes períodos (1 a 7 dias). Frascos não inoculados foram utilizados como controle. Frascos de meio inoculado foram analisados a cada 24 horas para exoantígenos (ic-ELISA) e biomassa (gravimetria).

4.2.13 Determinação de ergosterol em milho

A quantificação de ergosterol das amostras de milho foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), segundo a metodologia de GESSNER & SCHMITT (1996), com modificações.

Os extratos lipídicos foram obtidos a partir de 2 g de amostras de milho triturado em 60 mL de KOH 0,14M em metanol puro. Este material foi submetido a refluxo por 3 h. Após o resfriamento, o extrato foi transferido para um outro recipiente e o balão foi lavado 3 vezes com KOH 0,14M em metanol puro. O volume final do extrato foi ajustado, com KOH 0,14M em metanol puro, para 30 mL e 5 mL de HCl 0,75M foram adicionados. O extrato foi então submetido à pré-limpeza em coluna de extração em fase sólida (tC₁₈ Sep-Pak Vac, volume de 3mL, 500mg de adsorvente – WAT036815). Primeiramente, a coluna foi submetida a um condicionamento através da passagem de 2,5 mL de metanol grau HPLC puro, por 3 vezes, seguido de 2,5 mL de KOH 0,12M: HCL 0,75M, 6:1 (v/v), por 3 vezes. Após o acondicionamento a amostra foi adicionada à coluna em um fluxo de 1 mL/min. Em seguida, a coluna foi lavada com 2,5 mL de KOH 0,4M em metanol 60% e seca a vácuo por 50 min. O ergosterol foi eluído com 1,4 mL de KOH 0,1M em isopropanol e então foi adicionado imediatamente 0,3 mL de KOH 1M em metanol puro. A quantificação do ergosterol foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando sistema isocrático de fase reversa constituído de bomba (LC-10AD), forno (CTO-10A), detector UV/VIS (SPD-10A), coluna Nucleosil 100-5 C₁₈ (250mm x 4,6mm). O comprimento de onda foi ajustado a 282 nm. A fase móvel consistiu de metanol puro, com um fluxo de 1,5 mL por minuto, a 38°C. Sob estas condições, o tempo de retenção do ergosterol foi de 6,5 a 7,2 minutos.

Para a avaliação da recuperação, amostras foram contaminadas em duplicata com concentrações diferentes de ergosterol (10 e 50µg/g de milho) e analisadas em triplicata.

4.2.14 Determinação de fumonisinas

A determinação de fumonisinas foi realizada por CLAE de acordo com SHEPHARD et al. (1990) com modificações (UENO et al., 1993).

Dez gramas de milho triturado foram homogeneizados com 30 mL de metanol:água (3:1, v/v) e mantidos em repouso por 10 min à temperatura ambiente. A suspensão foi agitada a 150 rpm por 30 min e centrifugada a 4500 x g por 10 min. O extrato bruto (1,0 mL) foi aplicado em uma coluna de troca aniônica Sep Pak accell plus QMA previamente acondicionada com metanol:água (3:1, 6 mL), seguido de metanol (3 mL), sendo as fumonisinas eluídas com 10 mL de ácido acético 0,5% em metanol. O eluato foi seco sob um fluxo de gás nitrogênio a 45°C, o resíduo foi dissolvido em metanol:água (3:1, 800 µL) e uma alíquota de 200 µl foi seca em nitrogênio. Depois da derivação com 200 µL de reagente O-ftaldialdeído (40 mg de OPA, 1 mL de metanol, 5 mL de borato de sódio 0,1M e 50 µL de 2-mercaptoetanol), as injeções foram realizadas dentro de 1 min. As fumonisinas foram analisadas por sistema isocrático de fase reversa Shimadzu consistindo de bomba 10AT e detector de fluorescência RF 10A, utilizando uma coluna Shim-pack CLC-ODS (M) (4,6 x 250 mm). Os comprimentos de onda de excitação e emissão foram 335 nm e 450 nm, respectivamente. A fase móvel consistiu de CH₃OH:NaH₂PO₄ 0.1M (80:20, v/v) pH 3,3 ajustada para o fluxo de 1 mL/min. Os limites de detecção para FB₁ e FB₂ foram 50 ng/g e 80 ng/g, respectivamente.

4.2.15 Extração de DNA

A extração de DNA genômico total foi realizada segundo a metodologia descrita por RAEDER & BRODA (1985) com modificações, utilizando 8 isolados de *F. verticillioides* produtores de diferentes níveis de fumonisinas (Tabela 3). Esses isolados foram divididos em 3 grupos de acordo com os níveis de produção de fumonisinas baseados na distribuição em quartis. Foram considerados baixo produtores aqueles que apresentaram níveis de FB₁ de 109,8 a 810 µg/g, produtores intermediários > 810 a 2686 µg/g e alto produtores acima de 2686 µg/g de FB₁, correspondendo a valores 25% inferiores, 50% intermediários e 25% superiores, respectivamente.

Suspensões de esporos (10⁷ esporos/mL) dos isolados de *F. verticillioides* foram preparadas em 10 mL de solução de Tween 80 0,1% em água destilada estéril. Alíquotas de 800µL destas suspensões, foram transferidas para erlenmeyers de 500 mL contendo 200 mL de caldo batata dextrose. Os cultivos foram incubados a 25°C por 7 dias, filtrados a vácuo e o micélio foi macerado após a adição de nitrogênio líquido, utilizando-se

gral e pistilo. O macerado obtido foi acondicionado em microtubo de 2,0 mL e adicionado de 800 µL de tampão de extração (Tris-HCl 200mM; NaCl 250mM; EDTA 25mM; SDS 1%). O tubo foi então incubado em banho-maria a 65°C por 1 h. Após este período foram adicionados 800 µL de fenol e o material foi centrifugado a 12.000 x g por 10 min. A fase aquosa foi cuidadosamente retirada e transferida para outro tubo de 2,0 mL e foram adicionados 800 µL de solução de fenol:clorofórmio (1:1 v/v). A seguir foi realizada uma nova centrifugação a 12.000 x g por 10 min e a fase aquosa foi transferida para outro tubo de 2,0 mL. Foram adicionados 800 µL de clorofórmio e o material foi novamente centrifugado a 12.000 x g por 10 min. A fase aquosa foi dividida em alíquotas de aproximadamente 400µl, as quais foram transferidas para microtubos de 1,5 mL e adicionadas de 40 µL de NaCl 3M e 600 µL de etanol absoluto gelado. Os tubos foram homogeneizados levemente por inversão e armazenados a -20°C por 1h. Após este período foi realizada uma nova centrifugação a 12.000 x g por 7 min. Os sobrenadantes foram descartados e os pellets obtidos foram lavados por 3 vezes com etanol 70%. Após a secagem completa dos pellets, estes foram ressuspensos em água ultrapura estéril e armazenados a -20°C.

Tabela 3 – Produção de FB₁ por isolados de *F. verticillioides* em material de cultura, utilizados para extração de DNA total.

<i>F. verticillioides</i>	FB ₁ * (µg/g)
119B	3334,0
119Fa	2814,4
97L	2643,2
118F	1219,7
97J	1049,4
103H	1026,5
103G	158,5
113B	109,8

*Fumonisina B₁

4.2.16 Primers

A partir da seqüência completa do gene FUM6 (Nº de acesso AF155773), depositada no GenBank (NCBI), foram desenhados 14 pares de primers (Tabela 4), “forward” e “reverse”, com o auxílio do software Gene Runner 3.05 (Hastings Software, Hastings on Hudson, NY). Estes primers amplificaram fragmentos de aproximadamente 300 pb ao longo

de toda a extensão do gene (aproximadamente 3600 pb). As regiões amplificadas foram sobrepostas de forma que nenhuma região do gene deixasse de ser avaliada (Figura 8).

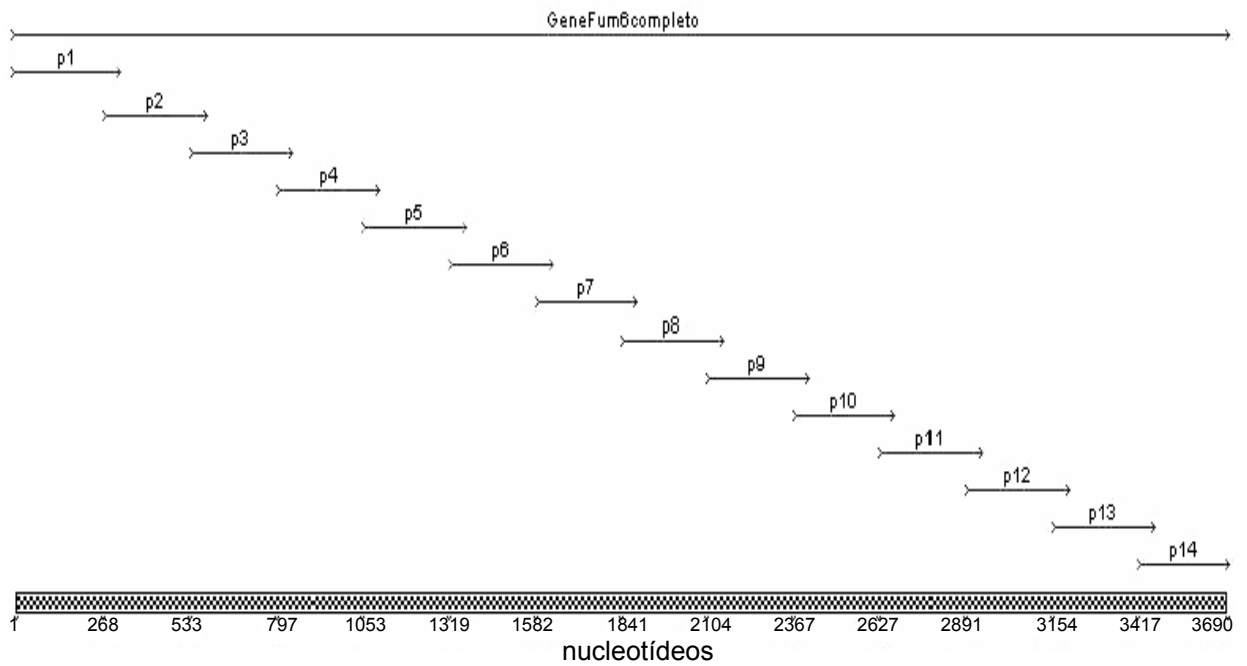


Figura 8 – Posicionamento das regiões do gene FUM6 de *F. verticillioides* amplificadas por cada par de primers desenhado.

Tabela 4 - Sequência dos pares de primers utilizados na amplificação do gene FUM6 de isolados de *F. verticillioides*.

PAR		SEQUÊNCIA
1	F*	GAACTGACTCCATCTGCC
	R**	AGCGAAGATAGATAGATAGG
2	F	TTCTGCCTATCTATCTATCTTC
	R	ATTTGACGTCTCTGCTGTG
3	F	TCACAGCAGAGACGTCAAATC
	R	TACCACGGCCTCTGCAAAC
4	F	AGAGGCCGTGGTAGATGTC
	R	CAATGAGAAAGGTGAGCAG
5	F	GCTCACCTTTCTCATTGC
	R	AATGGCTGGTCCTTGTTG
6	F	AAGGACCAGCCATTGTTC
	R	GTAACATGGTATTTGAGCG
7	F	TACGCTCAAATACCATGTTAC
	R	CTGCAGCGAGACGATAAG
8	F	CTTGGCTTATCGTCTCGC
	R	ACAGAGTATTTGCCAGTC
9	F	GACTGGGCAAATACTCTG
	R	CCTTTGCGCATTGTTATC
10	F	GCAAAGGCTATGTTTCGTG
	R	CGTGATGGGCGTATCTAAC
11	F	GTTAGATACGCCATCAC
	R	TGAGGAGAAGGAATAAGC
12	F	GCTTATTCCTTCTCCTCAG
	R	CTCCCACCATAATCACAG
13	F	CTGTGATTATGGTGGGAG
	R	CCATAACCGAGCAACTTC
14	F	AATGCCGAGATGAAGTTG
	R	TTAGGAAGAACGAACAGG

*forward

**reverse

4.2.17 Amplificação do DNA (PCR)

O volume de reação utilizado foi de 10 μ L, constituídos de 0,25 μ M de cada primer, 1 U Taq DNA polimerase nativa, 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,25 mM de cada nucleotídeo e 50 ng de DNA dos isolados de *F. verticillioides*.

A amplificação foi realizada em termociclador (T-1 Thermoblock, Biometra, Alemanha), consistindo de um ciclo inicial a 92°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de 40 segundos a 92°C, 1 minuto a 59°C e 1 minuto a 72°C, um ciclo final de 5 minutos a 72°C e uma extensão de 5 min a 4°C.

4.2.18 Análise de polimorfismo conformacional de fita simples (Single Strand Conformational Polymorphism – SSCP)

A análise de SSCP foi realizada de acordo com HAYASHI (1992). Aliquotas de 4 μ L dos produtos de PCR foram adicionadas de igual volume de tampão desnaturante (formamida 95%, EDTA 20mM e azul de bromofenol 0,05%) e aquecidas a 95°C por 5 minutos. O material foi transferido imediatamente para um recipiente com gelo e então 2-5 μ L das amostras foram aplicados em gel de poliacrilamida (6%) não desnaturante. O marcador de peso molecular utilizado foi de 50 pb. A eletroforese foi realizada a 80V a 4°C, em cuba de 12cm x 15cm, e as bandas foram reveladas pelo método da prata (SANGUINETTI et al., 1994).

4.2.19 Análise estatística

A correlação entre a concentração de exoantígenos e contagem de *Fusarium* spp., contagem total de bolores e leveduras, biomassa, concentração de fumonisinas e ergosterol foi analisada através do teste de correlação de Pearson. A análise estatística foi realizada utilizando o software STATISTICA versão 5.1 (Statsoft Inc., Tulsa, USA).

Parte dos resultados deste trabalho está apresentada na forma de artigos científicos, sob os títulos: **“Produção e caracterização de exoantígenos de *Fusarium verticillioides*”** e **“Detection of *Fusarium verticillioides* in corn by enzyme-linked immunosorbent assay”**, redigidos de acordo com as normas dos periódicos “SEMINA Ciências Agrárias” e “Food and Agricultural Immunology”, respectivamente.

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

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISE DE SSCP

A maioria dos métodos utilizados atualmente para a avaliação de polimorfismos baseia-se na reação em cadeia da polimerase (polymerase chain reaction – PCR) associada a alguma outra metodologia (GASSER, 1998). A análise de polimorfismo conformacional de fita simples (SSCP) é uma técnica simples e efetiva para a detecção de substituições de uma única base. Por sua simplicidade, o método de PCR-SSCP é um dos mais populares para a detecção de mutações, principalmente na área de genética médica, porém sua utilização foi ampliada para estudos de fitopatógenos, como vírus, nematóides e fungos (ORITA et al., 1989; KUMEDA & ASAO, 1996; HAYASHI, 1999; KONG et al., 2003 e 2004).

A técnica se baseia no princípio de que a mobilidade eletroforética de uma molécula de DNA de fita simples em um gel não desnaturante depende da sua estrutura (conformação) e massa molecular. Em solução as moléculas de fita simples assumem conformações secundárias e terciárias, como resultado de pareamento de bases entre nucleotídeos dentro de cada fita. As conformações são dependentes do comprimento da fita, da localização e número de regiões de pareamento de bases e, principalmente, na seqüência primária da molécula. Desta forma, um fragmento de DNA com uma mutação, que por definição possui uma seqüência de nucleotídeos alterada, tem uma conformação diferente do DNA selvagem. O DNA mutante é detectado como uma banda em uma posição diferente daquela do DNA selvagem no gel de eletroforese (ORITA et al., 1989; GASSER, 1998).

Neste trabalho, isolados de *F. verticillioides* foram submetidos à análise de SSCP visando estabelecer relações entre níveis de produção de fumonisinas e prováveis mutações em genes envolvidos na biossíntese.

Os perfis eletroforéticos apresentaram polimorfismos dentro do domínio *P450* (Figura 9A), na região compreendida entre o nucleotídeo 1007 e 1319 (par de primers 5), para o isolado 97J, e no domínio *FAD binding 1* (Figura 9B) na região compreendida entre os nucleotídeos 2058 e 2366 (par de primers 9), para os isolados 97L e 119Fa.

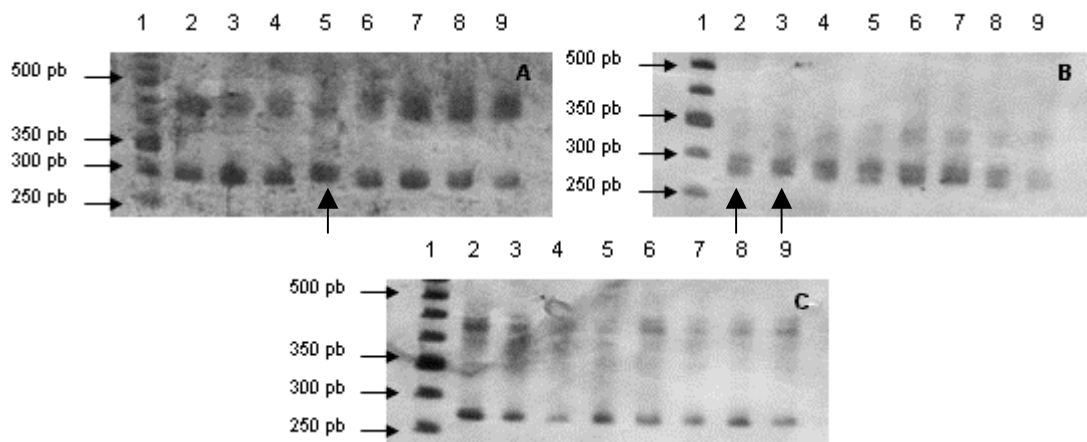


Figura 9 – Perfis eletroforéticos do gene FUM6 em diferentes isolados de *F. verticillioides*. (A) polimorfismo no domínio *P450*; (B) polimorfismo no domínio *FAD_binding* e (C) região sem polimorfismo. As setas indicam os polimorfismos observados. (1) marcador de massa molecular; (2) 97L; (3) 119Fa; (4) 119B; (5) 97J; (6) 113B; (7) 118F; (8) 103H; (9) 103G.

O polimorfismo no domínio *P450* não parece estar associado ao aumento ou diminuição da síntese de FB₁, uma vez que o isolado 97J produz níveis intermediários da toxina (1049,4 µg/g de milho). As linhagens que apresentaram polimorfismo no domínio *FAD binding1* apresentaram alta produção de FB₁ (2814,4 µg/g para o isolado 119Fa) e produção intermediária (2643,2 µg/g para o isolado 97L), porém muito próxima ao limite estabelecido para alto produtores (acima de 2686 µg/g), sugerindo que essa região do gene possa ser candidata em estudos de busca de marcadores moleculares úteis na diferenciação de linhagens altamente toxigênicas.

As citocromo P450 monooxigenases estão presentes na via biossintética de diversas micotoxinas, como tricotecenos, esterigmatocistina e aflatoxinas (KELLER & HOHN, 1997; SWEENEY & DOBSON, 1999). Estudos sobre genes que codificam essas enzimas demonstraram que a interrupção destes bloqueia a síntese das toxinas, porém nenhum estudo foi realizado, até o momento, tentando relacionar mutações nestes genes a perfis diferenciados de produção de micotoxinas (ALEXANDER et al., 1998; KELLER et al., 2000; YU et al., 2004).

Os resultados deste estudo indicam uma possível relação entre alta produção de fumonisinas e mutações no gene *FUM6*, porém, para que esta relação seja melhor avaliada, ensaios utilizando um maior número de isolados de *F. verticillioides* são necessários. As regiões que apresentarem polimorfismos serão posteriormente seqüenciadas para avaliação do tipo de mutação ocorrida e possíveis alterações na estrutura da enzima.

5.2 AVALIAÇÃO DA AÇÃO DO PERIODATO DE SÓDIO SOBRE OS EXOANTÍGENOS

A oxidação de epítopos de carboidratos com periodato de sódio em antígenos glicoprotéicos é muito útil na caracterização e seleção de anticorpos, podendo ser utilizada para avaliar a reatividade de anticorpos com estes antígenos (WOODWARD et al., 1985).

Os exoantígenos de *F. verticillioides* 97K apresentaram maior concentração de proteínas do que de carboidratos (307,8 e 252,0 µg/mL, respectivamente) (Tabela 5). Com relação às outras espécies de *Fusarium* testadas, a concentração de carboidratos foi maior que

a de proteínas para *F. subglutinans* (288,8 e 156,0 µg/mL, respectivamente) e *F. graminearum* (251,0 e 160,0 µg/mL, respectivamente). Para *F. sporotrichioides* as concentrações foram semelhantes, sendo 318,2 µg/mL de carboidratos e 310,3 µg/mL de proteínas.

Tabela 5 – Concentração de proteínas e carboidratos totais de exoantígenos de *Fusarium* spp.

Exoantígenos	Concentração (µg/mL)	
	Proteínas	Carboidratos
<i>Fusarium verticillioides</i> 97K	307,8	252,0
<i>Fusarium sporotrichioides</i>	310,3	318,2
<i>Fusarium subglutinans</i>	156,0	288,8
<i>Fusarium graminearum</i>	160,0	251,0

Os dados referentes ao tratamento de exoantígenos de *F. verticillioides* 97K com diferentes concentrações de periodato de sódio estão apresentados na Tabela 6.

Pode-se observar que houve uma redução gradativa da reatividade entre os antígenos e os anticorpos, com valores que variaram entre 41,6% para 0,1mM de periodato de sódio até 24,9% para 20mM. A concentração padronizada para os testes seguintes foi de 10mM de periodato (30,1% de reatividade).

A redução de reatividade causada pelo tratamento com periodato de sódio sugere que os anticorpos policlonais anti-*F. verticillioides* reconhecem em maior parte a porção glicídica dos exoantígenos.

Quando os exoantígenos de outras espécies de *Fusarium* foram submetidos ao mesmo processo também ocorreu uma queda na reatividade cruzada destes com os anticorpos anti-*F. verticillioides* (Tabela 7), o que reforça a possibilidade dos anticorpos reconhecerem mais a porção glicídica dos exoantígenos.

Desta forma, o tratamento de exoantígenos com periodato de sódio pode ser útil na redução da reatividade cruzada de anticorpos policlonais para uma determinada espécie.

Tabela 6 – Redução da reatividade cruzada do anticorpo policlonal anti-97K aos exoantígenos de *F. verticillioides* 97K tratados com diferentes concentrações de periodato de sódio.

Periodato (mM)	Reatividade (%)
0	100
0,1	41,6
1,0	42,2
5,0	30,4
10,0	30,1
20,0	24,9

Tabela 7 – Reatividade cruzada de exoantígenos de diferentes espécies de *Fusarium* com anticorpos policlonais anti-*F. verticillioides* antes e após o tratamento com periodato de sódio 10mM.

Exoantígenos	Reatividade Cruzada (%)	
	Sem periodato	Periodato
<i>F. sporotrichioides</i>	64,9	33,0
<i>F. subglutinans</i>	88,0	56,9
<i>F. graminearum</i>	46,4	17,3

ARTIGO 1

Título: Produção e caracterização de exoantígenos de *Fusarium verticillioides*.

Autor para correspondência: Elisabete Yurie Sataque Ono

Atuação Profissional: Prof. Associado do Depto. de Bioquímica e Biotecnologia – CCE, UEL.

Endereço: Universidade Estadual de Londrina – Centro de Ciências Exatas – Departamento de Bioquímica e Biotecnologia

Telefone: (43) 3371-4270

Categoria do trabalho: ARTIGO

Área de publicação: CIÊNCIAS AGRÁRIAS

Classificação das áreas/sub-áreas do CNPq: 5.07.01.00-2

Produção e caracterização de exoantígenos de *Fusarium verticillioides*.**Production and characterization of *Fusarium verticillioides* exoantigens.**

Paula Garcia Meirelles¹; Luciana Biazon²; Mario Augusto Ono³; Adriana Pereira da Silva⁴, Elisa Yoko Hirooka⁵; Elisabete Yurie Sataque Ono⁶.

¹ Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Londrina, Mestranda do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina.

² Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Londrina, Mestre em Biotecnologia pela Universidade Estadual de Londrina.

³ Docente do Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental – Departamento de Ciências Patológicas/CCB/UEL

⁴ Engenheiro Agrônomo pela Universidade Estadual de Londrina, Especialista em Bioquímica Aplicada pela Universidade Estadual de Londrina.

⁵ Docente do Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos – Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos/CCA/UEL

⁶ Docente do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia/CCE/ UEL (E-mail: eysono@uel.br) – Campus Universitário, Caixa Postal 6001, CEP 86051-990, Londrina - PR

RESUMO

Fusarium verticillioides Sacc. Nirenberg (= *F. moniliforme* Sheldon) é um patógeno primário de milho e principal produtor de fumonisinas. Este fungo pode causar perdas econômicas significativas para produtores e processadores de grãos, criadores de animais, além de representar sérios riscos à saúde humana e animal. Diversos métodos para a detecção de fungos têm sido utilizados, porém a maioria demanda tempo e pessoal treinado. Por outro lado, os métodos imunológicos, particularmente os ensaios imunoenzimáticos, apresentam diversas vantagens para o emprego rápido em controle de qualidade. Neste trabalho, foram obtidos exoantígenos de 8 isolados de *F. verticillioides* para a produção de anticorpos policlonais. O perfil eletroforético dos antígenos apresentou bandas com massas moleculares aparentes variando entre 17 e 170 kDa. Os antígenos de 3 isolados (97K, 113F e 162A), tendo como base a concentração de proteínas e número de bandas, foram escolhidos para a produção de anticorpos policlonais. O soro imune anti-97K, com maior título no ELISA indireto (1:12.800), apresenta potencial para a imunodeteção de *Fusarium verticillioides*.

Palavras-chave: Fungos, imunoenensaio, ELISA, imunodeteção, micotoxinas

ABSTRACT

Fusarium verticillioides Sacc. Nirenberg (= *F. moniliforme* Sheldon) is a primary corn pathogen and the main fumonisin producer. This fungus can cause significant economical losses for the farmers, grain processors, animal producers and risk for human and animal health. Several methods for mould detection have been used, however most of these are time-consuming and require trained staff. Otherwise, immunoassays (particularly enzyme-linked immunosorbent assay, or ELISA) provide several advantages and potential for use in rapid quality control. In this work exoantigens from eight *F. verticillioides* isolates were obtained for further production of polyclonal antibodies. The electrophoretic profile of these antigens showed protein bands with molecular mass ranging from 17 to 170 kDa. The antigens from 3 isolates (97K, 113F and 162A) were selected for polyclonal antibodies production, based on protein concentration and number of bands. Antiserum against *F. verticillioides* 97K exoantigens, which showed the highest titre in indirect ELISA (1:12.800), has potential for the immunodetection of *F. verticillioides*.

Key-words: Fungi, immunoassay, ELISA, immunodetection, mycotoxins

INTRODUÇÃO

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

As fumonisinas, descobertas em 1988, constituem um grupo de micotoxinas produzidas principalmente por *F. verticillioides* e *F. proliferatum*. Dentre os análogos do grupo, as FB₁, FB₂ e FB₃ são contaminantes naturais de milho e derivados, sendo a FB₁ a mais tóxica e abundante, compreendendo de 60 a 90% das fumonisinas (UENO et al., 1983; GELDERBLOM et al., 1988 e 1992b; BEZUIDENHOUT et al., 1988; VISCONTI et al., 1995; MUSSER & PLATTNER, 1997; SEO & LEE, 1999).

A ingestão de milho e derivados contaminados com fumonisinas é preocupante devido à sua associação com doenças no homem e em animais. As fumonisinas causam leucoencefalomalácia em eqüinos (ELEM), edema pulmonar em suínos e redução no desenvolvimento e imunossupressão em aves. Em ratos, foi comprovada a ação hepatotóxica e hepatocarcinogênica (MARASAS et al., 1988; GELDERBLOM et al., 1991; NORRED et al., 1993; SYDENHAM et al., 1992; WEIBKING et al., 1993; NAGARAJ et al., 1994; MALLMANN et al., 1999). Em seres humanos, estudos epidemiológicos indicam a provável associação com câncer esofágico e câncer hepático primário (WANG et al., 1995; GELDERBLOM et al., 1988 e 1992a; JACKSON et al., 1996; UENO et al., 1997).

A ocorrência de fumonisinas em milho brasileiro também é motivo de alerta, considerando a detecção de FB₁ e FB₂ em 97,4% e 94,8%, respectivamente, de 48 amostras analisadas, sendo 39 do Estado do Paraná e 9 do Mato Grosso do Sul e Goiás (HIROOKA et al., 1996). O processamento industrial do milho não elimina eficientemente a fumonisina pré-existente nos grãos, sendo a mesma detectada em seus produtos derivados (VISCONTI & DOKO, 1994; SHEPHARD et al., 1996).

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 e a estabilidade das fumonisinas ao processamento industrial, medidas efetivas de controle da contaminação pelo fungo e por suas toxinas são essenciais.

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. Portanto, é imprescindível o desenvolvimento de ensaios adequados para a detecção do fungo, visando o controle de qualidade dos produtos destinados ao consumo humano e animal.

A identificação das espécies de *Fusarium* é complexa devido à variabilidade morfológica em cultura e mutações resultantes de repiques sucessivos. 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 (JARVIS et al., 1983). Com exceção da identificação de metabólitos secundários (incluindo as micotoxinas), a maioria destes métodos apresenta baixa especificidade e reprodutibilidade, além de consumirem muito tempo (LI et al., 2000).

Por outro lado, os métodos imunológicos apresentam várias vantagens, como a rapidez na obtenção de resultados, alta sensibilidade e facilidade na execução. O desenvolvimento dos ensaios imunoenzimáticos (ELISA) (ENGVALL & PEARLMANN, 1972) forneceu uma alternativa aos métodos tradicionalmente utilizados (LIN et al., 1986).

Os ensaios imunoenzimáticos atualmente são aplicados tanto na detecção de fungos quanto de micotoxinas, podendo ser utilizados em alimentos processados e em suas matérias primas. Os ensaios utilizando exoantígenos são os mais empregados na detecção e identificação de fungos toxigênicos, além de serem empregados também na resolução de problemas taxonômicos (LIN et al., 1986; NOTERMANS et al., 1986; LU et al., 1994; BARNA-VETRÓ et al., 1994; ABRAMSON et al., 1998; PESTKA et al., 1995; THORNTON et al., 2002).

Os exoantígenos são macromoléculas imunogênicas produzidas por fungos durante o seu desenvolvimento (LI et al., 2000). Estes apresentam grande valor, seja na imunoidentificação de fungos patogênicos ou na resolução de problemas taxonômicos, uma vez que a maioria dos fungos

produz exoantígenos espécie-específicos (KAUFFMAN & STANDARD, 1987). Devido à termoestabilidade, os exoantígenos são detectados por ELISA mesmo após o processamento térmico, fornecendo inclusive informações sobre possíveis contaminações fúngicas de alimentos processados (NOTERMANS et al., 1986).

Além de serem utilizados na identificação de fungos, os exoantígenos têm sido empregados para diferenciar vários fungos similares morfológicamente. KAUFMANN & STANDARD (1987) sugeriram que as características antigênicas dos fungos poderiam ser utilizadas como ferramentas taxonômicas, uma vez que são produzidas durante todo o crescimento do fungo e geralmente são independentes do meio de cultura, temperatura ou idade do cultivo.

Este estudo teve por objetivo produzir e caracterizar exoantígenos de *Fusarium verticillioides* para obtenção de anticorpos policlonais.

MATERIAL E MÉTODOS

Culturas fúngicas

Foram utilizados oito isolados de *Fusarium verticillioides* (97K, 164G, 113F, 103Br, 119Br, 103F, 162A e 104Ga) obtidos a partir de rações envolvidas em intoxicação animal.

Obtenção de exoantígenos

A melhor condição para produção de exoantígenos foi determinada a partir do cultivo de *F. verticillioides* 162A em 6 diferentes condições.

Após o cultivo de *F. verticillioides* 162A em ágar batata dextrose (BDA) a 28° C por 7 dias, uma suspensão de esporos (10^7 esporos/mL) foi preparada em solução de Tween 80 0,1% em água destilada estéril (v/v). Aliquotas de 1 mL da suspensão de esporos foram transferidas para

erlenmeyers de 1 L contendo 250 mL de caldo BHI. O experimento foi realizado em duplicata. Os cultivos foram incubados a 28° C em condição agitada (180 r.p.m) ou estacionária por 7, 14 e 21 dias e inativados com timerosal 0,02% por 24 horas a 4° C.

Após a inativação, os cultivos foram filtrados a vácuo em papel de filtro Whatman n.º 1 e centrifugados a 4500 x g a 4° C por 20 minutos. O sobrenadante contendo os exoantígenos foi liofilizado e ressuspendido em 2 mL de salina tamponada 0,15M (PBS). O material foi dialisado por 24 horas a 4° C contra água deionizada e PBS (2 últimas trocas) em tubos de diálise com limite de exclusão de 12 - 16 kDa e armazenado a -20° C até o momento do uso.

A condição que apresentou maior concentração de proteínas foi selecionada para a obtenção de exoantígenos dos demais isolados de *F. verticillioides*.

Determinação de proteínas

A concentração de proteínas dos exoantígenos foi determinada segundo a metodologia de Bradford (1976) utilizando soroalbumina bovina como padrão. As amostras foram diluídas em PBS e adicionadas de 1 mL do reativo de Bradford. As leituras foram realizadas a 595 nm (FEMTO 600 plus).

Determinação de carboidratos

A concentração de carboidratos totais dos exoantígenos foi determinada segundo Dubois et al. (1956), utilizando glicose como padrão. As leituras foram realizadas a 490nm (FEMTO 600 plus).

Eletroforese Desnaturante em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

Os exoantígenos foram submetidos a SDS-PAGE, segundo Laemmli (1970), utilizando gel de empilhamento (5%) e gel de separação (10%), juntamente com um padrão de massa molecular de 20,4 a 208 kDa (Bio-Rad). A corrida eletroforética foi realizada em tampão Tris-glicina pH 8,3 a 60V por 4 horas.

As bandas de proteínas foram reveladas pelo método da prata (NIELSEN & BROWN, 1984).

Imunização dos coelhos e obtenção de anticorpos

Os exoantígenos dos 3 isolados de *F. verticillioides* (97K, 113F e 162A) que apresentaram as mais elevadas concentrações de proteínas e maior número de bandas foram selecionados para a imunização dos coelhos.

Os anticorpos para os exoantígenos dos 3 diferentes isolados foram produzidos a partir de imunizações de 3 coelhos machos, adultos jovens, da raça Nova Zelândia. A concentração dos exoantígenos foi ajustada para 320 µg/mL e então homogeneizados (v/v) com adjuvante incompleto de Freund. Os coelhos foram imunizados com 3 doses de exoantígeno (0,5 mL contendo 80 µg de exoantígenos) por via subcutânea com intervalos de uma semana entre as doses. Uma semana após a 3ª dose o sangue de cada animal foi coletado e os soros titulados por imunodifusão radial dupla e ELISA.

Imunodifusão radial dupla

A imunodifusão radial dupla foi realizada em gel de ágar segundo Camargo et al. (1988). Os exoantígenos (300 µg/mL) foram adicionados ao orifício central e 30 µL de cada diluição do soro imune (1:2 a 1:32) foram adicionados aos orifícios laterais. Após 24 horas, as lâminas foram lavadas com salina por 2 dias. Em seguida as lâminas foram desidratadas e coradas com Comassie.

ELISA indireto

A titulação dos anticorpos policlonais foi realizada por ELISA indireto de acordo com o método de Engvall e Pearlmann (1971) com algumas modificações. Os anticorpos policlonais foram testados nas diluições de 1:100 a 1:12.800 e os exoantígenos nas concentrações de 2 a 16 µg/mL.

A microplaca foi sensibilizada com 100 µL/poço de exoantígenos de *F. verticillioides* em tampão carbonato/bicarbonato 0,2 M pH 9,6 seguido de incubação a 4° C por 16 horas. Após 3 lavagens com PBS-Tween 20 0,05% (PBS-T), a microplaca foi bloqueada com 150 µL de PBS leite desnatado 1% a 25° C por 30 minutos. A placa foi novamente lavada 3 vezes com PBS-T e 100 µL de diluições dos soros imunes e pré-imune (1:100) em PBS leite desnatado 1% foram adicionados e incubados a 25° C por uma hora. Após lavagens da microplaca conforme previamente descrito foram adicionados 100 µL do conjugado anti-IgG de coelho-peroxidase (1:1.000), seguido de incubação a 25° C por uma hora. A microplaca foi novamente lavada 3 vezes com PBS-T e uma vez com PBS, seguido da adição de 100 µL da solução de substrato/cromógeno (H₂O₂/tetrametilbenzidina) por 15 minutos. A reação foi bloqueada com 50 µL de H₂SO₄ 1 N e as absorvâncias foram determinadas a 450 nm em leitora de ELISA (ELX 800 Reader - Bio Tek Instruments, Inc). Como controle negativo

foram utilizados os soros pré-ímmunes (1:100), sendo as amostras consideradas positivas quando apresentaram leitura de absorvância 2 vezes maior que a do controle negativo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As condições ideais para a produção de exoantígenos de *Fusarium* spp. foram determinadas pelo cultivo de um dos isolados de *F. verticillioides* (162A) em diferentes períodos (7, 14 e 21 dias) nas condições agitada e estacionária. O cultivo por 14 dias sob agitação demonstrou maior concentração de proteínas (47mg%), sendo que no 7º dia a produção atingiu 43 mg% (figura 1). No 21º dia de cultivo houve uma redução da produção de exoantígenos, nas duas condições, provavelmente devido ao fato de que neste tempo o cultivo já estaria na fase de declínio (morte celular), com aumento do catabolismo. O cultivo por 14 dias sob agitação foi selecionado para a obtenção de exoantígenos dos demais isolados de *F. verticillioides*.

(Inserir Figura 1 aqui)

Os exoantígenos dos 8 isolados de *F. verticillioides* apresentaram uma ampla variação tanto na concentração de proteínas (100,3 a 530,0 µg/mL) quanto na de carboidratos (54,7 a 252,0 µg/mL), porém a concentração de proteínas sempre foi maior que a de carboidratos (Tabela 1). O perfil eletroforético dos exoantígenos apresentou uma grande diversidade de bandas, com massas moleculares aparentes variando entre 17 e 170 kDa (Figura 2), enquanto que os exoantígenos de *F. sporotrichioides*, *F. poae* e *F. graminearum* apresentaram massas moleculares entre 7,2 e 80 kDa (Gan et al., 1997). Não foi observada relação direta entre o número de bandas e a concentração de proteínas dos exoantígenos. Os exoantígenos de *F. verticillioides* 97K e 164G apresentaram maior número de bandas, enquanto que o isolado 103Br apresentou menor número.

(Inserir Tabela 1 aqui)

(Inserir Figura 2 aqui)

Os exoantígenos dos 3 isolados de *F. verticillioides* (162A, 113F e 97K) que apresentaram maior concentração de proteínas, com grande número de bandas no perfil eletroforético foram selecionados para a produção de anticorpos policlonais.

Após a obtenção dos anticorpos policlonais (anti-162A, anti-113F e anti-97K), foram realizados ensaios para a seleção do anticorpo mais específico, titulação e padronização da concentração dos exoantígenos. Primeiramente, os três anticorpos policlonais produzidos foram analisados quanto ao reconhecimento ao antígeno por imunodifusão radial dupla (Figura 3). O soro anti-97K apresentou maior reatividade, sendo escolhido para a realização dos demais ensaios imunológicos.

(Inserir Figura 3 aqui)

Para o desenvolvimento dos ensaios imunoenzimáticos (ELISA) foi realizada inicialmente uma padronização da concentração dos exoantígenos. A reatividade do anticorpo policlonal anti-97K foi avaliada utilizando-se exoantígenos em concentrações variando de 0,2 a 1,6 µg/poço. Entre as diferentes concentrações dos exoantígenos testadas, a concentração de 0,8 µg/poço foi padronizada para realização dos ensaios imunoenzimáticos, uma vez que não houve diferença significativa entre as duas maiores concentrações (Figura 4). Gan et al. (1997) utilizaram uma concentração de 0,5 µg/poço para realização de um ELISA com exoantígenos de *F. sporotrichioides*, *F. poae* e *F. graminearum*, enquanto Lu et al. (1994) utilizaram 0,1 µg/poço de exoantígenos para realização de um ELISA com exoantígenos de *P. aurantiogriseum*.

(Inserir Figura 4 aqui)

A especificidade dos anticorpos produzidos em coelhos foi analisada por ELISA indireto. Cada antígeno foi testado com soro pré-imune 1:100 (controle negativo) e diluições do soro imune. Para a titulação dos anticorpos foi utilizado o valor de "cut off" de duas vezes o valor da absorvância do soro pré-imune na diluição 1:200.

Os soros anti-113F e anti-162A apresentaram um título de 1:400 e 1:800, respectivamente, enquanto que o anti-97K apresentou o maior título de anticorpos (1:12.800), sendo selecionado para os ensaios posteriores (Figura 5). Este ensaio confirmou o resultado observado no teste de imunodifusão, indicando ser o anticorpo anti-97K o mais adequado para utilização em imunoenaios. Por outro lado, Gan et al. (1997) encontraram um título de 1:6.000 para *F. sporotrichioides* e *F. graminearum* e de 1:12.000 para *F. poae*, sendo que os anticorpos para *F. sporotrichioides* e *F. graminearum* eram gênero-específicos e os anticorpos para *F. poae* eram espécie-específicos. No mesmo estudo, o título encontrado para os antígenos micelianos nas três espécies foi de 1:6.000, porém os anticorpos reconheciam outros gêneros além de *Fusarium*. Estes resultados indicaram que a especificidade do ELISA para exoantígenos é maior do que para antígenos micelianos.

(Inserir Figura 5 aqui)

Os resultados obtidos até o momento sugerem que os anticorpos policlonais produzidos contra os exoantígenos de *F. verticillioides* apresentam potencial para a imunodeteção deste fungo toxigênico.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq, FINEP, à CAPES, à Fundação Araucária, ao Fundo Paraná e à Universidade Estadual de Londrina, pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAMSON, D.; GAN, Z.; CLEAR, R.M.; GILBERT, J.; MARQUARDT, R. R. Relationships among deoxynivalenol, ergosterol and *Fusarium* exoantigens in Canadian hard and soft wheat. **International Journal of Food Microbiology**, v. 45, p. 217-224, 1998.
- BARNA-VETRÓ, I.; GYÖNGYÖSI, A.; SOLTI, L. Monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay of *Fusarium* T-2 and zearalenone toxins in cereals. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 2, p. 729-731, 1994.
- BEZUIDENHOUT, S. C.; GELDERBLUM, W. C. A.; GROST-ALLMAN, C. P.; HORAK, R. M.; MARASAS, W. F. O.; SPITELLER, G.; VLEGGGAAR, R. Structure elucidation of fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*, **Journal of the Chemical Society Communications**, p. 743-745, 1988.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** v. 72, p. 248-254, 1976.
- BULLERMAN, L. B. Occurrence of *Fusarium* and fumonisins on food grains and in foods. In: JACKSON, L. S.; DEVRIES, J. W.; BULLERMAN, L. B. (eds.) **Fumonisin in food**. New York: Plenum Press, p. 27-38, 1996.
- CAMARGO, Z. P. Production of *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for immunodiffusion tests. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 26, p. 2147-2151, 1988.
- DUBOIS, N.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, B. A.; SMITH, F. Colorimetric method determination of sugars and substances. **Anal. Chem.**, v. 23, p. 350-356, 1956.
- 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.
- GAN, Z.; MARQUARDT, R.R.; ABRAMSON, D. et al . The characterization of chicken antibodies raised against *Fusarium* spp. by enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblotting. **International Journal of Food Microbiology**, v. 38, p. 191- 200, 1997.
- GELDERBLUM, W.C.A.; JASKIEWICZ, K.; MARASAS, W.F.O., THIEL, P.G.; HORAK, R. M.; VLEGGGAAR, R. KRIEK, N. P. J. Fumonisin – novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 54, n. 7, p. 1806-1811, 1988.
- GELDERBLUM, W.C.A.; KRIEK, N. P. J.; MARASAS, W. F. O., THIEL, P. G. Toxicity and carcinogenicity of the *Fusarium moniliforme* metabolite, fumonisin B₁ in rats. **Carcinogenesis**, v. 12, p. 1247-1251, 1991.
- GELDERBLUM, W.C.A.; SAMPLE, E.; MARASAS, W.F.O. The cancer initiating potential of the fumonisin B mycotoxins. **Carcinogenesis**. v 13, p. 433-43, 1992a.
- GELDERBLUM, W.C.A.; MARASAS, W.F.O.; VLEGGGAAR, R.; THIEL, P. G.; CAWOOD, M. E. Fumonisin: isolation, chemical characterization and biological effects. **Mycopathologia**, v. 117, p. 11-16, 1992b.
- GLENN, A. E.; HINTON, D. M.; YATES, E.; BACON, C. W. Detoxification of corn antimicrobial compounds as the basis for isolating *Fusarium verticillioides* and some other *Fusarium* species from corn. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 7, p. 2973-2981, 2001.

- HIROOKA, E. Y.; YAMAGUCHI, M. M.; AOYAMA, S.; SUGIURA, Y.; UENO, Y. Natural occurrence of fumonisins in Brazilian corn kernels. **Food Additives and Contaminants**, v. 13, n. 2, p. 173-183, 1996.
- JACKSON, L. S.; DEVRIES, J. W.; BULLERMAN, L. B. (eds.) **Fumonisin in Food**. New York: Plenum Press, 399 p., 1996.
- JARVIS, B.; SCILER, D. A. L.; OULD, A. J. L.; WILLIAMS, A. P. Observations on the enumeration of molds in food and feedstuffs. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 55, p. 325-336, 1983.
- KAUFMANN, 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.
- KERÉNYI, Z.; ZELLER, K.; HORNOK, L.; LESLIE, J. F.; Molecular standardization of mating type terminology in the *Gibberella fujikuroi* species complex. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 9, p. 4071-4076, 1999.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n.15, p. 680-685, 1970.
- LI, S.; MARQUARDT, R.R.; ABRAMSON, D. Immunochemical detection of molds: a review. **Journal of Food Protection**. v. 63, n. 2, p. 281-291, 2000.
- LIN, H. H.; LISTER, R. M.; COUSIN, M. A. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of mold in tomato puree. **Journal of Food Science**, v. 51, n. 1, p. 180-183, 1986.
- 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, p. 3267-3276, 1994.
- MALLMANN, C. A.; SANTURIO, J. M.; DILKIN, P. Equine leukoencephalomalacia associated with ingestion of corn contaminated with fumonisin B₁. **Revista de Microbiologia**, v. 30, p. 249-252, 1999.
- MARASAS, W. F. O.; KELLERMAN, T. S.; GELDERBLUM, W. C. A.; COETZER, J. A. W.; THIEL, P. G.; van der LUGT, J. J. Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B₁ isolated from *Fusarium moniliforme*. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 55, p. 197-203, 1988.
- MUSSER, S. M.; PLATTNER, R. D. Fumonisin composition in cultures of *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum* and *Fusarium nygami*. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 45, p. 1169-1173, 1997
- NAGARAJ, R.Y; WU, W.D; VESONDER, R.J. Toxicity of corn culture material of *Fusarium proliferatum* M-7176 and nutritional intervention in chicks. **Poultry Science**, v. 73, p. 617-626, 1994.
- NIELSEN, B.L; BROWN, L.R. The basis of coloured silver-protein complex formation in stained polyacrylamide gels. **Analytical Biochemistry**. v. 141, p. 311-315, 1984.
- NORRED, W. P. Fumonisin – mycotoxins produced by *Fusarium moniliforme*. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 38, p. 309-328, 1993.
- NOTERMANS, S.; HEUVELMAN, C.J.; VAN EGMOND, H. P.; PAULSCH, W. E.; BESLING, J. R. Detection of mold in food by enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of Food Protection**, n. 49, n. 10, p. 786-791, 1986.

PESTKA, J.J.; ABOUZEID, M.N.; SUTIKNO. Immunological assays for mycotoxins detection. **Food Technology**, v. 49, n. 2, p. 120-128, 1995.

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

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

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

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

THORNTON, C. R.; PITT, D.; WAKLEY, G. E.; TALBOT, N. J. Production of a monoclonal antibody specific to the genus *Trichoderma* and closely related fungi, and its use to detect *Trichoderma* spp. in naturally infested compost. **Microbiology**, v. 148, p. 1263-1279, 2002.

UENO, Y. **Trichotecenes – chemical, biological and toxicological aspects**. Tokyo: Kodansha, 1983.

UENO, Y.; IJIMA, K.; WANG, S. et al. Fumonisins as a possible contributory risk factor for primary liver cancer. A 3-year study of corn harvested in Haimen, China, by HPLC and ELISA. **Food and Chemical Toxicology**, v. 35, p. 1143-1150, 1997.

VISCONTI, A. & DOKO, M. B. Survey of fumonisin production by *Fusarium* isolated from cereals in Europe. **Journal of the Association of Official Analytical Chemistry International**, v. 77, p. 546-550, 1994.

VISCONTI, A.; BONKE, A.; DOKO, M. B. Occurrence of fumonisins in Europe and the BCR-Measurement and Testing Projects. **Natural Toxins**, v. 3, n. 4, p. 269-274, 1995.

WANG, D.S; LIANG, Y.X; IJIMA, K; et al. Co-contamination of mycotoxins in corn harvested in Haimen, a high risk area of primary liver cancer in China. **Mycotoxins**. v. 41, p. 67-70, 1995.

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

Tabela 1 - Concentração de proteínas e de carboidratos dos exoantígenos de 8 isolados de *F. verticillioides*.

Isolados	Concentração de proteínas ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração de carboidratos ($\mu\text{g/mL}$)
162A	530,0	129,1
113F	459,2	167,3
97K	320,0	252,0
164G	303,6	169,5
103Br	282,9	126,4
104Ga	229,8	210,0
119Br	139,5	109,2
103F	100,3	54,7

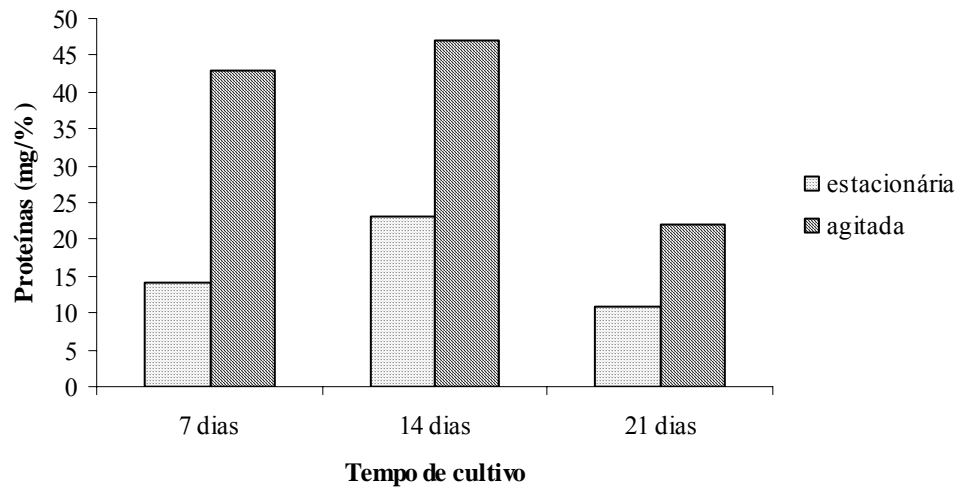


Figura 1 - Concentração de proteínas dos exoantígenos obtidos sob condição agitada e estacionária por 7, 14 e 21 dias a 28 °C

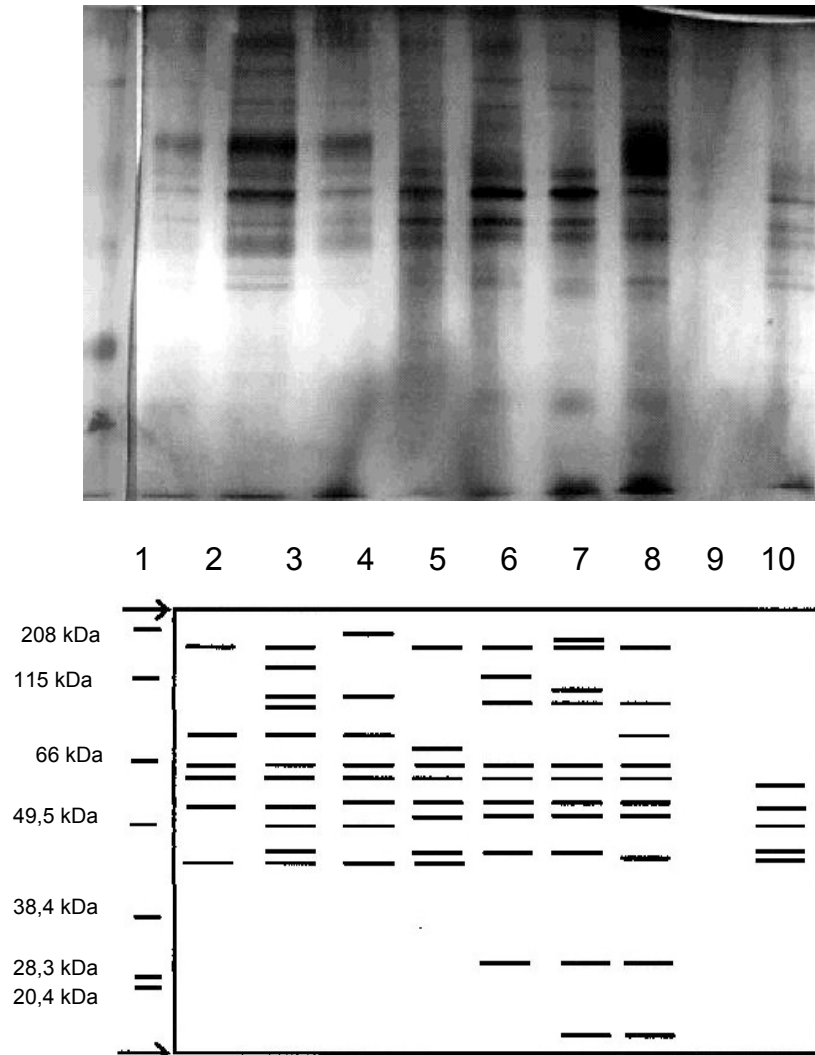


Figura 2 – Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS de exoantígenos de *F. verticillioides* obtidos em condição agitada por 14 dias: (1) padrão de massa molecular; (2) 119Br; (3) 164G; (4) 113F; (5) 103F; (6) 104Ga; (7) 97K; (8) 162A; (9) vazio; (10) 103Br

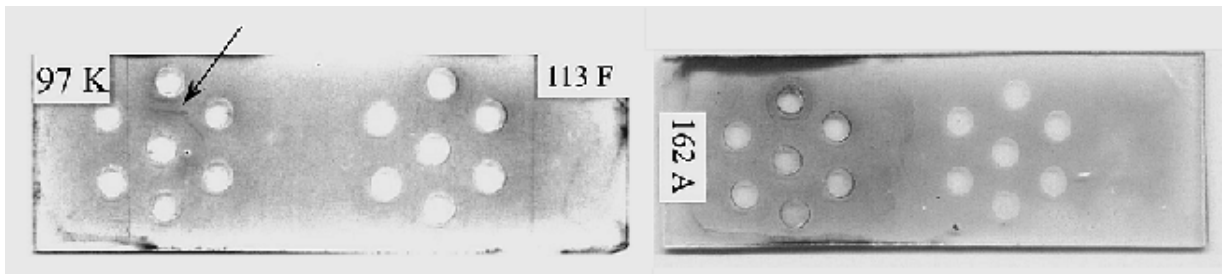


Figura 3 - Imunodifusão radial dupla dos anticorpos anti-97K, anti-113F e anti-162A em diluição seriada contra seus respectivos antígenos. A seta indica a presença da linha de precipitação do anticorpo anti-97K.

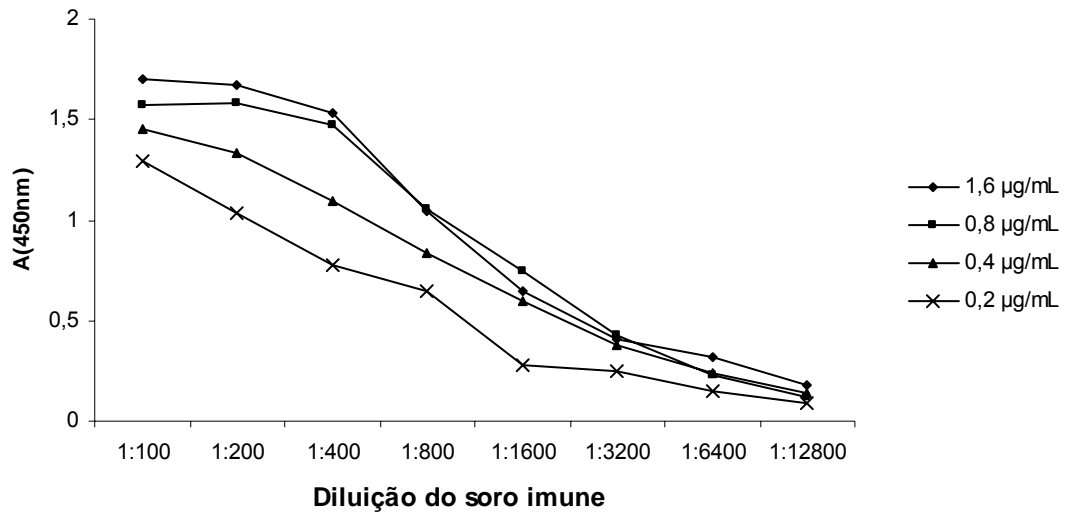


Figura 4 – Reatividade dos anticorpos anti-97K com diferentes concentrações dos exoantígenos do isolado 97K de *F. verticillioides* por ELISA indireto.

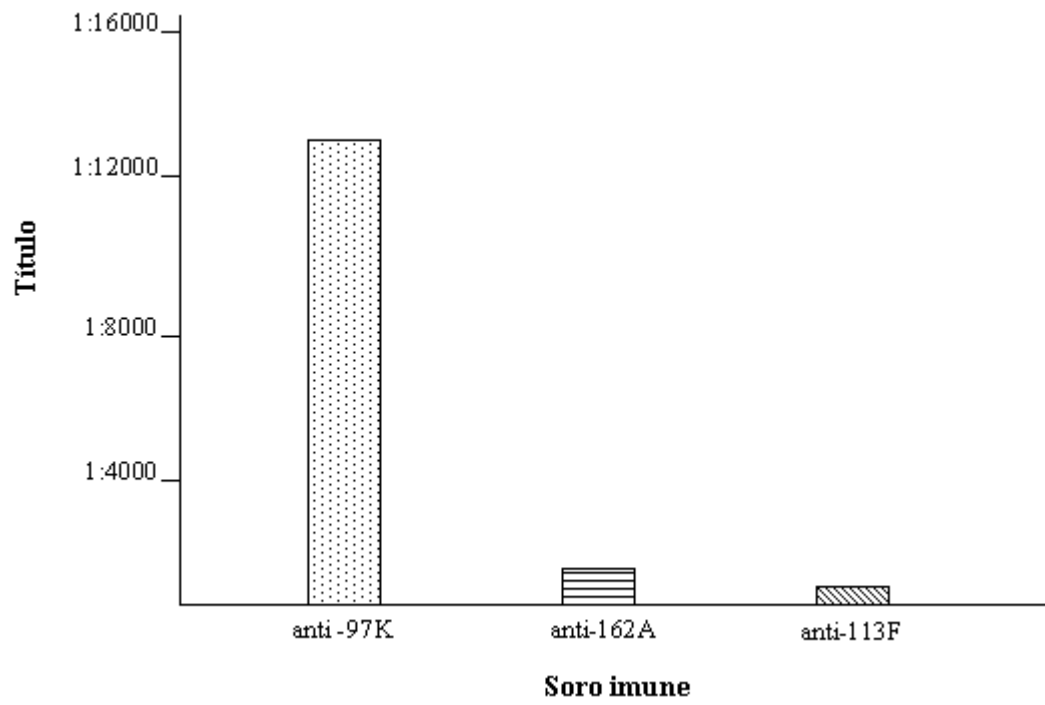


Figura 5 - Titulação dos anticorpos policlonais contra exoantígenos dos 3 isolados de *F. verticillioides* por ELISA indireto

ARTIGO 2

Direct detection of *Fusarium* sp. contamination in corn using enzyme-linked immunosorbent assay

Fusarium verticillioides is a primary corn pathogen and one of the main producers of fumonisin, a group of mycotoxins that cause several diseases in animals and probably in human beings. An indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ic-ELISA) based on polyclonal antibodies was developed to detect this fungus in corn and its correlation with traditional methods for mould detection was evaluated. Forty freshly harvested corn samples were analysed for *F. verticillioides* exoantigens, as well as for total mould count, ergosterol and fumonisin levels in order to evaluate the relationship between these parameters. In addition, *F. verticillioides* was grown in brain heart infusion (BHI) broth in order to evaluate the correlation between biomass and exoantigen concentration. There was no significant correlation between exoantigen concentration and total mould count, *Fusarium* sp. count and fumonisin levels. Otherwise, the correlation coefficient between exoantigens and ergosterol content was 0.52 and between biomass and *F. verticillioides* exoantigens in BHI broth was 0.84. These results suggest that this ic-ELISA has potential for *Fusarium* sp. detection in corn samples.

Keywords: *F. verticillioides*, exoantigens, fumonisins, enzyme-linked immunosorbent assay, corn.

Introduction

Fusarium verticillioides (Sacc.) Nirenberg (= *Fusarium moniliforme* Sheldon) is a primary corn pathogen and one of the main fumonisin producers. Twenty-eight fumonisin analogues were characterized so far, however FB₁, FB₂ and FB₃ occur as natural contaminants at significant levels in corn and corn-based products and FB₁ is the most toxic and abundant (Gelderblom et al., 1988; Musser & Plattner, 1997; Rheeder et al. 2002).

Ingestion of corn and corn-based products contaminated with fumonisins is a topic of concern due to association with leukoencephalomalacia in equine, pulmonar edema in swine, weight loss and immunosuppression in poultry (Gelderblom et al., 1991; Nagaraj et al., 1994; Mallmann et al., 1999). In human, epidemiologic studies suggest their association with esophageal and liver cancer (Gelderblom et al., 1992; Ueno et al., 1997).

High incidence of *F. verticillioides* and fumonisins in corn, associated with serious risks to human and animal health, require an effective measure in order to control the mould and mycotoxin contamination.

The complexity of *Fusarium* species identification is due to the morphological variability in culture and mutations caused by successive subculturing. The traditional methods for mould identification and detection are based on culture in several media, microscopic examination and chemical analysis of chitin, ergosterol or secondary metabolites (Jarvis et al., 1983). Except for the identification of secondary metabolites (including mycotoxins), most of these methods have low specificity and reproducibility, and are time-consuming (Li et al., 2000). Otherwise, immunological methods have several advantages, such as high sensitivity, specificity and potential for use in rapid quality control. The development of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Engvall & Pearlmann, 1972) could be a promising alternative to the traditional methods (Lin et al., 1986). Several ELISAs have been developed for detecting and identifying moulds with variable success

(Notermans et al., 1986; Tsai & Yu, 1997 e 1999; Chen et al., 2000; Yong & Cousin, 2001), however a limited number have been developed for the detection of *Fusarium* species in foods (Gan et al., 1997; Abramson et al., 1998; Iyer & Cousin et al., 2003)

The aims of this study were to develop an ELISA based on polyclonal antibodies for *Fusarium* sp. detection in corn and evaluate its correlation with traditional methods (total mould count and ergosterol assay) for mould detection and fumonisin levels.

Material & Methods

Reagents and Material

The microtitre plates (96 wells, flat bottom) were purchased from Corning Costar Co. (USA), the anti-rabbit IgG-peroxidase conjugate, hydrogen peroxide, 3,3',5,5' tetramethylbenzidine and fumonisin standards (FB₁ and FB₂) were from Sigma Co. (USA). The solid-phase extraction cartridges (tC₁₈ Sep-Pak Vac, 3 mL column volume, 500 mg of sorbent, and Sep Pak accell plus QMA) were from Waters Co. (USA). Methanol, acetonitrile and isopropanol (HPLC grade) were from J. T. Baker (USA). Ergosterol standard was purchased from Fluka (Germany). Other reagents were analytical grade.

Fungal Culture

F. verticillioides strain 97K was isolated from feed sample involved in animal intoxication outbreaks and provided by the Department of Food and Drug Technology (State University of Londrina, Paraná, Brazil).

Samples

A total of forty freshly harvested corn (*Zea mays* L.) samples were collected directly from the trucks at the delivery post of a cooperative in the Northern region of the Paraná State, during

February and March/2004 crop. Each sampling was carried out by collecting 400 to 500 g of corn from 9 to 12 points of the truck bin to obtain a total of 4 to 5 kg and the samples were classified following the Brazilian guideline protocol (Brasil, 1976). A homogenized 1 kg portion of the sample, with initial moisture content between 14.3 and 19.0%, was sent to the laboratory and maintained at 4°C for no more than 7 days for microbiological analysis. For the determination of exoantigens, ergosterol and fumonisins, 200 g of corn kernels were ground to 50 mesh in a laboratory mill and maintained at -20°C until use.

Production of polyclonal antibodies

F. verticillioides 97K was used for the production of exoantigens and polyclonal antibodies as described by Biazon (2004).

Briefly, aliquots of 1 mL spore suspensions (10^7 spores/mL) were inoculated into 1 L Erlenmeyer flasks containing 250 mL brain-heart infusion (BHI) broth. The cultures were incubated at 28° C in a rotary shaker (180 rpm) for 14 days and inactivated by 0.02% thimerosal at 4°C for 24 hours. Then, the cultures were filtered through two layers of Whatman n° 1 filter paper and centrifuged at 4500 x *g* at 4° C for 20 minutes. The supernatants containing the exoantigens were freeze-dried, stored at -20°C and later dissolved in 0.15M phosphate-buffered saline (PBS) and dialyzed for 24 hours at 4°C against deionized water and PBS (two final changes). The dialyzates were used for immunization of two young male, New Zealand rabbits (Biazon, 2004). Pre immunization blood samples from the rabbits were negative to *F. verticillioides* exoantigens before immunization in indirect ELISA. The exoantigen mixture was adjusted to give a protein concentration of 320 µg/mL and then mixed (v/v) with an equal amount of Freund's incomplete adjuvant. Each rabbit was immunized subcutaneously with three injections of exoantigens (0.5 mL containing 80 µg

proteins) at one-week intervals. One week after the 3rd injection, the rabbits were bled and the sera were titred by indirect ELISA.

Total mould count and exoantigen extraction from corn samples

Ground corn samples (10 g) were blended with 90 mL of sterile 0.15M PBS and serial dilutions were carried out in tubes with 9.0 mL of the same diluent until 10^{-4} . One mL of each dilution was transferred into Petri dishes and pour-plated with 25 mL potato dextrose agar (PDA, pH 4.0) added with chloramphenicol (50 µg/mL) and incubated at 28°C for 7 days. After fungal counting, genera identification was carried out according to Nelson et al. (1983), Singh et al. (1991) and Samson et al. (1995).

The remaining corn suspension was filtered through Whatman n° 1 filter paper and stored at -20°C for further quantification of *F. verticillioides* exoantigens.

Exoantigen quantification

Exoantigen quantification in corn samples was carried out by indirect competitive ELISA (ic-ELISA).

The microtitre plate wells were coated with 100 µL *F. verticillioides* 97K exoantigens (0.4 µg/well) in 0.2M carbonate/bicarbonate buffer pH 9.6, at 4°C for 16 hours. After washing three times with PBS-0.05% Tween 20 (PBS-T), the wells were blocked with 150 µL 1% skim milk in PBS for 3 hours, at 25°C. After washing with PBS-T, 50 µL anti-*F. verticillioides* 97K immune serum and 50 µL corn sample extracts were incubated for 16 hours at 4°C. After washing with PBS-T, 100 µL anti-rabbit IgG-peroxidase conjugate were added and incubated at 25°C for 1.5 hour. After washing with PBS-T, 100 µL substrate solution ($\text{H}_2\text{O}_2/3,3',5,5'$ -tetramethylbenzidine) were added and incubated for 30 minutes at 25°C. The reaction was stopped by adding 50 µL 1M H_2SO_4 and absorbance was determined

at 450 nm (ELISA ELX 800 Reader – Bio Tek Instruments Inc.). Average absorbance was calculated from triplicate wells and results were expressed as the percentage of binding:

$$\text{Binding (\%)} = \frac{A^+}{A^-} \times 100$$

Where A^+ is the mean absorbance in the presence of soluble exoantigens and A^- is the mean absorbance in their absence.

The detection limit was estimated as the minimum concentration over 22% inhibition (3-fold SD of 0 ng exoantigens mL⁻¹) detected by ic-ELISA (Iijima et al., 1996).

Exoantigen recoveries were determined by spiking 10 g of ground corn in duplicate at three concentrations (10, 20 and 30 µg/g), in triplicate analysis.

Culture of *F. verticillioides* for biomass and exoantigen determination

Aliquots of 1 mL *F. verticillioides* 97K spore suspension (10⁷ spores/mL) were grown in BHI broth (50 mL), at 28°C in a rotary shaker (180 rpm) for different periods (1 to 7 days), in order to evaluate the correlation between biomass and exoantigen concentration. Uninoculated flasks of BHI were used as controls. Separate flasks of inoculated medium were analysed every 24 hours for exoantigens (ic-ELISA) and biomass (mycelial dry weight).

Ergosterol analysis

Ergosterol content in corn samples was determined by high performance liquid chromatography (HPLC) according to Gessner & Schmitt (1996) with modification.

Ground corn samples (2 g) were mixed with 60 mL 0.14M KOH in pure methanol and refluxed for three hours. After cooling, the final volume of the extract was adjusted to 30 mL with 0.14M KOH in methanol and 5.0 mL 0.75M HCl were added. The

extract was then submitted to clean-up procedure using solid phase extraction cartridge (tC₁₈ Sep Pak Vac.). After conditioning the cartridge with 2.5 mL methanol, followed by 2.5 mL 0.12M KOH in methanol:0.75M HCL (6:1, v/v), the sample was added to the cartridge at a flow rate of 1.0 mL/min. The cartridge was washed with 2.5 mL 0.4M KOH in 60% methanol and dried under a stream of air for 50 min. Ergosterol was eluted into tared HPLC vials with 1.4 mL 0.1M KOH in pure isopropanol and 0.3 mL 1M KOH in pure methanol was immediately added. Ergosterol was analysed by a reverse-phase isocratic HPLC system (Shimadzu LC-10AD pump, CTO-10A oven and SPD-10A UV/VIS detector), using a Nucleosil 100-5 C₁₈ (250 mm x 4.6 mm, Macherey Nagel – Germany) and the absorbance was determined at 282 nm. The eluent was 100% methanol at a flow rate of 1.5 mL/min, at 38°C. The detection limit for ergosterol was 10 ng/g.

Ergosterol recovery was evaluated by spiking ground corn (2 g) in duplicate at two concentrations (10 and 50 µg/g), in triplicate analysis.

Fumonisin analysis

Fumonisin B₁ and B₂ were analysed according to Shephard *et al.* (1990) with modification (Ueno *et al.*, 1993). Ground corn samples (10 g) were mixed with 30 mL methanol:water (3:1, v/v). After standing for 10 min at room temperature, the suspension was shaken at 150 rpm for 30 min and centrifuged at 4500 x g for 10 min. The crude extract (1.0 mL) was applied to a preconditioned clean-up cartridge. After washing the cartridge with methanol:water (3:1, v/v, 6 mL) followed by methanol (3 mL), the fumonisins were eluted with 10 mL methanol containing 0.5% acetic acid. The eluate was evaporated to dryness under a stream of nitrogen at 45°C, the residue was dissolved in methanol:water (3:1, 800 µL) and a 200 µL aliquot dried under nitrogen. After derivatization with 200 µL O-phthalaldehyde reagent (40 mg OPA, 1 mL methanol, 5 mL 0.1M sodium borate and 50 µL 2-mercaptoethanol), HPLC injections

were made within 1 min. Fumonisin were analysed by a reversed-phase isocratic HPLC system (Shimadzu 10AT pump and RF 10A fluorescence detector), using a Shim-pack CLC-ODS (M) column (4.6 x 250 mm, Shimadzu). Excitation and emission wavelengths were 335 nm and 450 nm, respectively. The eluent was CH₃OH:0.1 M NaH₂PO₄ (80:20, v/v) adjusted to pH 3.3 with ortho-phosphoric acid. The flow rate was 1 mL/min. The detection limits for FB₁ and FB₂ were 50 ng/g and 80 ng/g, respectively.

Statistical analysis

The correlation between exoantigen concentration and *Fusarium* sp. count, total mould count, biomass, fumonisin and ergosterol levels was analysed by Pearson's correlation test. Statistical analysis was performed by STATISTICA software version 5.1 (Statsoft Inc., Tulsa, USA).

Results and discussion

Polyclonal antibodies raised against *F. verticillioides* exoantigens were used to develop an ic-ELISA for detecting *Fusarium* sp. in naturally contaminated corn samples. The detection limit of this assay was 1.6 µg/g. Cross-reactivities of polyclonal antibodies against exoantigens from 14 fungi species from other genera were low (4.5 to 14.7%). High cross-reactivities were observed for exoantigens from *F. graminearum*, *F. subglutinans* and *F. sporotrichioides* (51% to 76%) (Biazon, 2004).

Total mould and *Fusarium* sp. count, ergosterol, exoantigen and fumonisin levels in 40 freshly harvested corn samples from Northern region of Paraná State (Brazil) are summarized in Table 1. Total mould count ranged from 1.5×10^4 to 9.9×10^5 CFU/g (Table 1), and 75% of the samples (Table 2) showed high contamination (10^5 to $<10^6$ CFU/g). *Fusarium* sp. prevailed (100%) with mean contamination of 2.1×10^5 CFU/g and

contamination in a range of 10^5 to $<10^6$ CFU/g was detected in 58% of the samples (Table 2). *Penicillium* sp. and *Aspergillus* sp. were detected in 93% and 37% of the samples, respectively.

[Insert Table 1 about here]

[Insert Table 2 about here]

These results were similar to the data obtained by Ono et al. (1999) that showed higher contamination with *Fusarium* sp. (98.7% to 100%) and *Penicillium* sp. (93 to 100%) than with *Aspergillus* sp. (non detected to 27.7%) in 150 freshly harvested corn samples from three regions of Paraná State. Total mould count in a range from 10^5 to $<10^6$ CFU/g was detected in 55.5 to 66.3% of the samples (Ono et al., 1999). Almeida et al. (2000) analysed the natural contamination in 66 corn samples from different regions of São Paulo State (Brazil), and *Fusarium* sp. were detected in 55.5 to 80% of the samples, with predominance of *F. verticillioides* (60.6%), while *Penicillium* sp. and *Aspergillus* sp. were detected in 40 to 50% and from 22.2 to 23.3% of the samples, respectively.

Fumonisin were detected in 100% (FB₁) and 52.5% (FB₂) of the samples, with levels ranging from 0.03 to 2.4 µg/g for FB₁ and 0.02 to 0.71 µg/g for FB₂ (Table 1). These results showed lower fumonisin levels than previously obtained by Ono et al. (1999) and Camargos et al. (2000). Ono et al. (1999) detected FB₁ in 96.3% to 100% (range from 0.07 to 13.46 µg/g) and FB₂ in 63 to 100% of the samples (range from 0.08 to 6.92 µg/g). Camargos et al. (2000) evaluated the fumonisin occurrence in 23 samples cultivated at experimental stations in different regions of São Paulo State (Brazil) and these mycotoxins were detected in all samples at levels ranging from 1.63 to 25.79 µg/g (FB₁) and from 0.38 to 8.60 µg/g (FB₂).

Ergosterol is the main fungal sterol and plays an important role in cell membranes. This sterol was found to be a useful method to evaluate the fungal contamination in grains, which can quantify total fungal biomass, whereas the plating technique detects only viable fungi (Gourama & Bullerman, 1995).

Ergosterol content in 40 corn samples ranged from 0.8 to 31.7 $\mu\text{g/g}$, with mean value of 7.2 $\mu\text{g/g}$ (Table 1). Abramson et al. (1998) reported a mean value of 16.87 $\mu\text{g/g}$ ergosterol in hard wheat and 14.25 $\mu\text{g/g}$ in soft wheat.

Mean recoveries of ergosterol from corn spiked at two concentrations were $89.6 \pm 4.4\%$ at 10 $\mu\text{g/g}$ and $96 \pm 12.7\%$ at 50 $\mu\text{g/g}$, based on duplicate spiking and triplicate analysis. These data were similar to Gessner & Schmitt (1996), who reported recoveries from 85.1 to 98.1% in samples of different plant tissues spiked with 114 μg ergosterol in 50 mg of sample. Moreover, recoveries from canola samples spiked at 10 $\mu\text{g/g}$ and 20 $\mu\text{g/g}$ were 103% and 90%, respectively (Abramson et al., 2005).

F. verticillioides exoantigen concentrations in corn samples ranged from 8.9 to 956.0 $\mu\text{g/g}$, with mean value of 217.3 $\mu\text{g/g}$ (Table 1). Exoantigen recoveries from corn spiked at three concentrations, based on duplicate spiking and triplicate analysis, were 95.8% at 10 $\mu\text{g/g}$, 80.7% at 20 $\mu\text{g/g}$ and 106.4% at 30 $\mu\text{g/g}$ (Table 3). Exoantigen concentration did not correlate with *Fusarium* sp. count ($r = -0.11$; $p < 0.05$) nor with total mould count ($r = -0.15$, $p < 0.05$) (Figures 1 and 2). These results were similar to Yong & Cousin (2001) that developed a double-sandwich ELISA for detection of aflatoxin producer *Aspergillus* species in naturally contaminated corn and no correlation between exoantigens and total mould count was observed. This was probably due to differences in substrate composition and storage condition of corn samples, since they were obtained from different sources (Yong & Cousin, 2001). Furthermore, total mould count is not a precise method for total biomass estimation, taking into account that only the viable propagules can be detected (Gouramma & Bullerman,

1995). Otherwise, there was a positive correlation between ergosterol content, viable plate count and exoantigens when corn and peanut samples were inoculated artificially with *Aspergillus parasiticus* (Yong & Cousin, 2001).

[Insert Table 3 about here]

[Insert Figures 1 and 2 about here]

The correlation coefficient between ergosterol and exoantigen concentration was 0.52 ($p < 0.05$) (Figure 3), however there was no correlation between fumonisin and exoantigen concentration ($r = 0.05$, $p < 0.05$) (Figure 4). Although there was no significant correlation between exoantigens and fumonisin levels, *Fusarium* exoantigens were detected in all fumonisins positive samples. Abramson et al. (1998) analyzing *Fusarium sporotrichioides* exoantigens by ic-ELISA, in hard and soft wheat samples artificially inoculated with *Fusarium*, reported a correlation coefficient of 0.66 (hard wheat) and 0.81 (soft wheat) between exoantigens and ergosterol, and a correlation coefficient of 0.8 and 0.76 between deoxinivalenol and exoantigen concentrations.

[Insert Figures 3 and 4 about here]

The correlation coefficient in this study was lower than that obtained by Abramson et al (1998), probably because naturally contaminated corn samples (different hybrids) collected from different areas were analysed instead of artificially inoculated samples. Fungal growth and mycotoxin production depend on crop susceptibility, mould toxigenicity and environmental factors, such as rainfall, temperature, relative humidity during plant development and crop harvest (Pestka & Casale, 1990; Ono et al., 1999). Studies with

artificially contaminated samples minimize many of these factors, however they don't correspond to all the variability observed in naturally contaminated samples. In addition, ergosterol quantification indicates total mould contamination of samples, and the differentiation among genera or species is not possible. Moreover, different fungal species produce different levels of ergosterol, and the synthesis of this metabolite can be influenced by substrate composition, mycelial growth phase and storage conditions (Tothill et al., 1992). As shown in Table 2, *Penicillium* sp. and *Aspergillus* sp. were detected in corn samples and the ELISA developed in this study detects only *Fusarium* species, showing low cross-reactivity with other fungal genera (Biazon, 2004).

F. verticillioides 97K was cultured in BHI broth in order to evaluate the relationship between biomass (dry micellium weight) and exoantigens production, at different periods. The correlation coefficient between these parameters was 0.84 ($p < 0.05$) (Figure 5). Notermans et al. (1986) also demonstrated a correlation between dry mycelium weight and exoantigens analysed by an ELISA for detection of *Penicillium* species, *Mucor racemosus* and *Geotrichum candidum*, inoculated in several fruit juices.

[Insert Figure 5 about here]

Several researches carried out so far had demonstrated that exoantigen immunoassays can be useful for the detection of several fungi in food and feed stuff, including *F. verticillioides*. In this study, there was a positive correlation between exoantigen and ergosterol content analysed in naturally contaminated corn samples, as well as between exoantigen concentration and biomass in BHI broth. Therefore, this ic-ELISA is promising as a screening method for *Fusarium* sp. detection in corn samples.

Acknowledgements

The authors thank to CNPq (the Brazilian Government Organization for grant aid and fellowship to Brazilian researchers), Araucária Foundation, Paraná Fund/SETI, FINEP and CAPES (Coordination for Formation of High Level Professionals) for the financial support.

References

Abramson D, Gan Z, Clear RM, Gilbert J, Marquardt RR. 1998. Relationships among deoxynivalenol, ergosterol and *Fusarium* exoantigens in Canadian hard and soft wheat. *International Journal of Food Microbiology* 45:217-224.

Abramson D, Hulasare R, York RK, White NDG, Jayas DS. 2005. Mycotoxins, ergosterol, and odor volatiles in durum wheat during granary storage at 16% and 20% moisture content. *Journal of Stored Products Research* 41:67-76.

Almeida AP, Corrêa B, Mallozzi MAB, Sawazaki E, Soares, LMV. 2000. Mycoflora and aflatoxin/fumonisin production by fungal isolates from freshly harvested corn hybrids. *Brazilian Journal of Microbiology* 31:321-326.

Biazon L. 2004. Caracterização de *Fusarium verticillioides* por métodos imunológicos (in Portuguese) [dissertation] Londrina (PR, Brazil): State University of Londrina. 154 p.

Brasil. 1976. Portaria nº 845, 8 November 1976. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*. 30 November 1976 (Brasília).

Camargos SM, Soares LMV, Sawazaki E, Bolonhezi D, Castro JL, Bortolletto N. 2000. Fumonisin in corn cultivars in the State of São Paulo. *Brazilian Journal of Microbiology* 31:226-229.

Chen F-S, Chen JW, Zhao S, Gan Z, Luo X-C, Zhou Q. 2000. Characterization of chicken antisera raised against *Aspergillus* spp. by enzyme-linked immunosorbent assay. *Nahrung* 44(5):323-327.

Engvall E, Perlmann P. 1972. Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA. III. Quantification of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen coated tubes. *Journal of Immunology* 109:129.

Gan Z, Marquardt RR, Abramson D, Clear, RM. 1997. The characterization of chicken antibodies raised against *Fusarium* spp. by enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblotting. *International Journal of Food Microbiology* 38:191- 200.

Gelderblom WCA, Kriek NPJ, Marasas WFO, Thiel PG. 1991. Toxicity and carcinogenicity of the *Fusarium moniliforme* metabolite, fumonisin B₁ in rats. *Carcinogenesis* 12:1247-1251.

Gelderblom WCA, Sample E, Marasas WFO. 1992. The cancer initiating potential of the fumonisin B mycotoxins. *Carcinogenesis* 13:433-43.

Gessner MO, Schmitt AL. 1996. Use of solid-phase extraction to determine ergosterol concentrations in plant tissue colonized by fungi. *Applied and Environmental Microbiology* 62:415-419.

Gourama H, Bullerman LB. 1995. Detection of molds in foods and feeds: potential rapid and selective methods. *Journal of Food Protection* 58(12):1389-1394.

Iijima K, Kawamura O, Wang DS, Manabe M, Tanaka K, Chen G, Yu SZ, Ueno W. 1996. Development of highly sensitive immunosorbent assay for fumonisins and its application for contaminated corn. *Mycotoxins* 42:63-66.

Jarvis B, Sciler DAL, Ould AJL, Willims AP. 1983. Observations on the enumeration of molds in food and feedstuffs. *Journal of Applied Bacteriology* 55:325-336.

Li S, Marquardt RR, Abramson D. 2000. Immunochemical detection of molds: a review. *Journal of Food Protection* 63(2):281-291.

Lin HH, Lister RM, Cousin MA. 1986. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of mold in tomato puree. *Journal of Food Science* 51(1):180-183.

Mallmann CA, Santurio JM, Dilkin P. 1999. Equine leukoencephalomalacia associated with ingestion of corn contaminated with fumonisin B₁. *Brazilian Journal of Microbiology* 30:249-252.

Musser SM, Plattner RD. 1997. Fumonisin composition in cultures of *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum* and *Fusarium nygami*. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 45:1169-1173.

Nagaraj RY, Wu WD, Vesonder RJ. 1994. Toxicity of corn culture material of *Fusarium proliferatum* M-7176 and nutritional intervention in chicks. *Poultry Science* 73:617-626.

Nelson PE, Tousson TA, Marasas WFO. 1983. *Fusarium* species – An illustrated manual for identification. Pennsylvania: Pennsylvania State University Press. 193 p.

Noterman S, Heuvelman CJ, van Egmond HP, Paulsch WE, Besling JR. 1986. Detection of mold in food by enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Food Protection* 49(10):786-791.

Ono EYS, Sugiura Y, Homechim M, Kamogae M, Vizzoni E, Ueno Y, Hirooka EY. 1999. Effect of climatic conditions on natural mycoflora and fumonisins in freshly harvested corn of the State of Paraná, Brazil. *Mycopathologia* 147:139-148.

Pestka JJ, Casale WL. 1990. Naturally occurring fungal toxins. In: Simons MS, Niagry J. (Eds.). *Food Contamination from environmental sources*. John Wiley and Sons Ltd., New York, 613-638.

Rheeder JP, Marasas WFO, Vismer HF. 2002. Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species. *Applied and Environmental Microbiology* 68(5):2101-2105.

Samson RA, Hoeksstra ES, Frisvad JC et al. *Introduction to food-borne fungi*. 1995. 4 ed. The Netherlands, Centraalbureau voor Schimmelcultures.

Shephard GS, Sydenham EW, Thiel PG, Gelderblom WCA. 1990. Quantitative determination of fumonisin B₁ and B₂ by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Liquid Chromatography* 13:2077-2087.

Singh K, Frisvad JC, Thrane U et al. 1991. An illustrated manual on identification of some seed-borne *Aspergilli*, *Fusaria*, *Penicillia* and their mycotoxins. Danish Government, Hellerup, Denmark.

Tothill LE, Harris D, Magan N. 1992. The relationship between fungal growth and ergosterol content of wheat grains. *Mycological Research* 96:965-970.

Tsai G-J, Yu S-C. 1997. An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus*. *Journal of Food Protection* 60(8):978-984.

Tsai G-J, Yu S-C. 1999. Detecting *Aspergillus parasiticus* in cereals by An enzyme-linked immunosorbent assay. *International Journal of Food Microbiology* 50:181-189.

Ueno Y, Aoyama S, Sugiura Y, Wang DS, Lee US, Hirooka EY, Hara S, Karki T, Chen G, Yu SZ. 1993. A limited survey of fumonisins in corn and corn-based products in Asian countries. *Mycotoxin Research* 9:27-34.

Ueno Y, Iijima K, Wang S et al. 1997. 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* 35:1143-1150.

Yong RK, Cousin MA. 2001. Detection of moulds producing aflatoxins in maize and peanuts by an immunoassay. *International Journal of Food Microbiology* 65:27-38.

Table 1. Total mould count, ergosterol, exoantigen and fumonisin analysis in 40 freshly harvested corn samples of Northern region of Paraná State (February and March/2004 crop).

Parameter	Range	Mean
Total count (CFU/g)	$1.5 \times 10^4 - 9.9 \times 10^5$	2.8×10^5
<i>Fusarium</i> sp. count (CFU/g)	$6.5 \times 10^3 - 7.5 \times 10^5$	2.1×10^5
Ergosterol ($\mu\text{g/g}$)	0.8 - 31.7	7.2
Exoantigens ($\mu\text{g/g}$)	8.9 - 956.0	217.3
Fumonisin ($\mu\text{g/g}$)		
FB ₁ *	0.03 – 2.4	0.64
FB ₂ **	0.02 – 0.71	0.28
Total	0.03 - 2.4	0.8

* fumonisin B₁

** fumonisin B₂

Table 2. Levels of mould contamination in 40 freshly harvested corn samples of Northern region of Paraná State (February and March/2004 crop).

Parameter	$10^2 - <10^3$		$10^3 - <10^4$		$10^4 - <10^5$		$10^5 - <10^6$	
	AF*	RF** (%)	AF	RF (%)	AF	RF (%)	AF	RF (%)
Total count	—	—	—	—	10	25	30	75
<i>Fusarium</i> sp.	—	—	3	7	14	35	23	58
<i>Penicillium</i> sp.	1	2	10	25	17	43	9	23
<i>Aspergillus</i> sp.	9	22	5	13	1	2	—	—

* Absolute frequency

** Relative frequency

Table 3. Exoantigen recoveries from corn samples spiked at three levels.

Concentration ($\mu\text{g/g}$)	Recoveries (%)*
10	95.8 ± 4.2
20	80.7 ± 4.8
30	106.4 ± 13.4

* Recoveries based on duplicate spiking and triplicate analysis by ic-ELISA

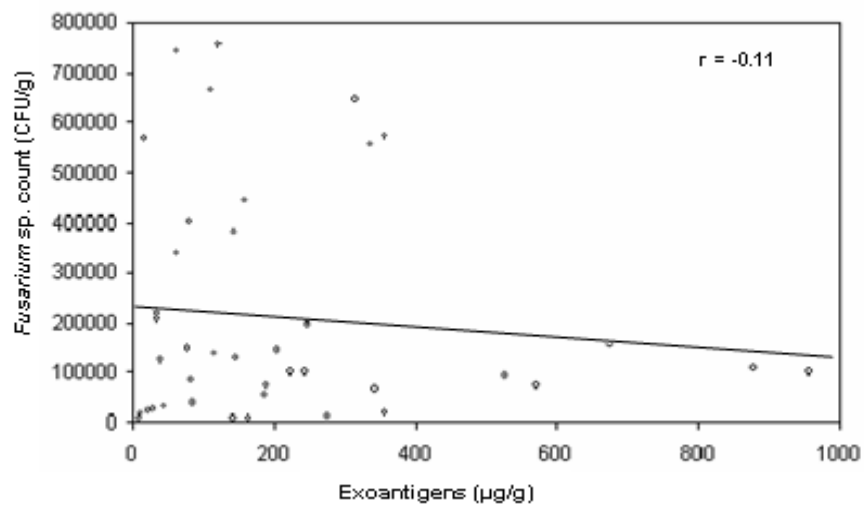


Figure 1. Relationship between *Fusarium* sp. count and exoantigen concentration, determined by ic-ELISA, in naturally contaminated corn samples (n=40).

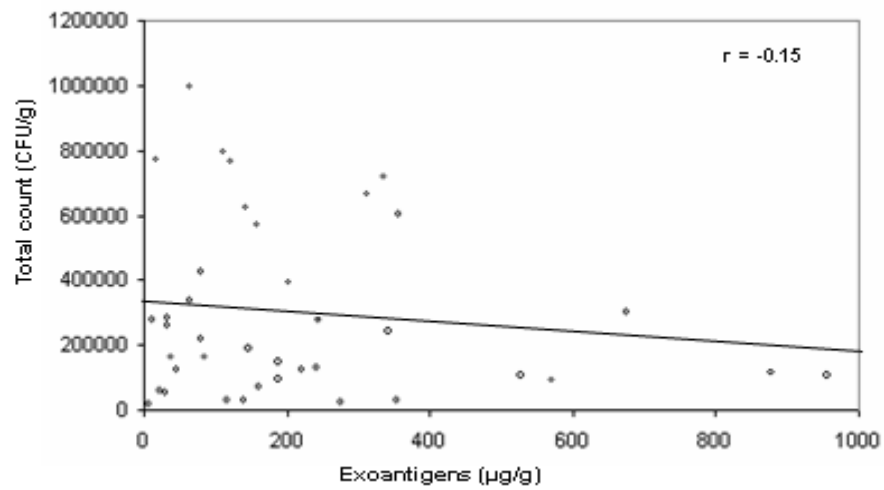


Figure 2. Relationship between total mould count and exoantigen concentration, determined by ic-ELISA, in naturally contaminated corn samples (n=40).

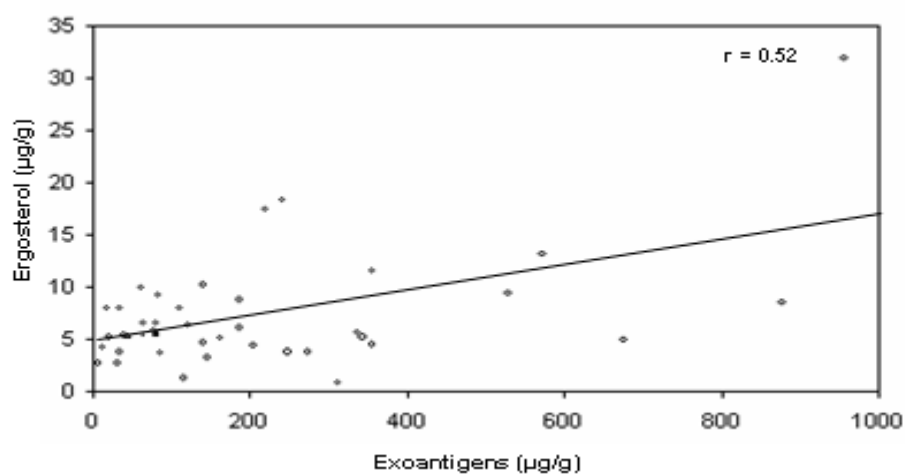


Figure 3. Correlation between ergosterol and exoantigen concentration in naturally contaminated corn samples (n=40). Linear regression equation ($y = 4.4792 + 0.01243 * x$) was obtained with correlation coefficient of 0.52. x and y represents exoantigen and ergosterol concentrations determined by ic-ELISA and HPLC, respectively.

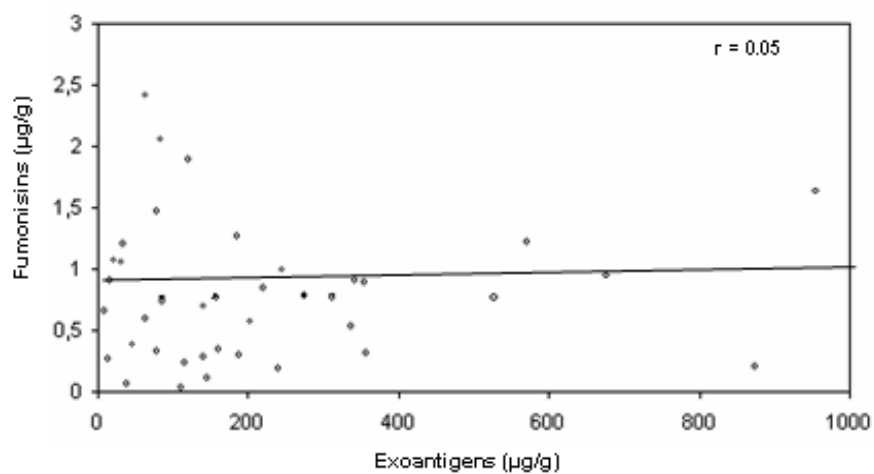


Figure 4. Relationship between fumonisin (FB₁ + FB₂) levels, determined by HPLC, and exoantigen concentration, determined by ic-ELISA, in naturally contaminated corn samples (n=40).

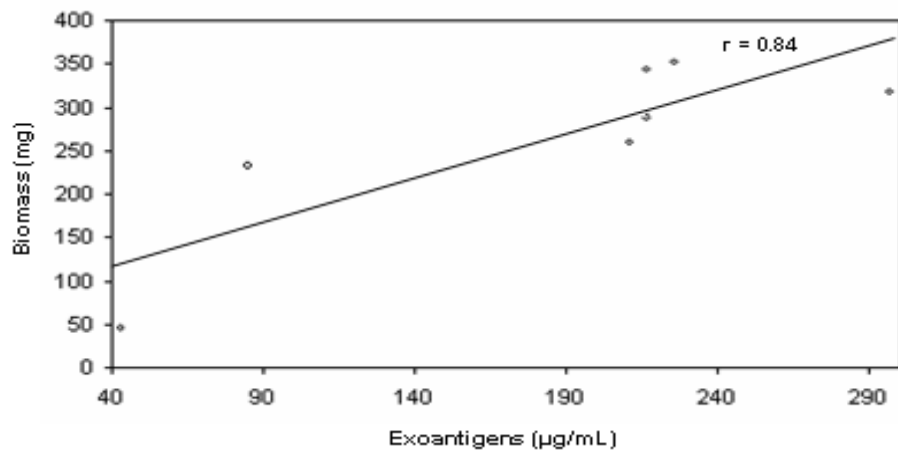


Figure 5. Correlation between biomass and exoantigen concentration for *F. verticillioides* 97K grown in BHI broth. Linear regression equation ($y = 78.197 + 0.99006 * x$) was obtained with correlation coefficient of 0.84. x and y represent exoantigen concentration and biomass determined by ic-ELISA and mycelial dry weight, respectively. Circles represent the mean value from duplicate analysis.

6 CONCLUSÕES

Muitos estudos realizados até o momento demonstraram que os imunoenaios para exoantígenos podem ser úteis na detecção de diversos fungos em alimentos, incluindo *F. verticillioides*. Neste estudo, houve correlação positiva entre concentrações de exoantígenos e ergosterol, analisados em amostras de milho naturalmente contaminadas, bem como entre concentração de exoantígenos e biomassa, em meio de cultivo líquido. Desta forma, o ic-ELISA desenvolvido apresenta potencial como método de triagem para detecção de *Fusarium* spp. em amostras de milho.

Aparentemente, mutações no domínio “FAD-binding” do gene FUM6 estão relacionadas à alta produção de fumonisinas, porém uma análise mais ampla, com maior número de isolados deve ser realizada para comprovar essa associação.

REFERÊNCIAS

- ABRAMSON, D.; GAN, Z.; CLEAR, R. M.; GILBERT, J.; MARQUARDT, R. R. Relationships among deoxynivalenol, ergosterol and *Fusarium* exoantigens in Canadian hard and soft wheat. **International Journal of Food Microbiology**, v. 45, p. 217-224, 1998.
- ABRAMSON, D.; HULASARE, R.; YORK, R. K.; WHITE, N. D. G.; JAYAS, D. S. Mycotoxins, ergosterol, and odor volatiles in durum wheat during granary storage at 16% and 20% moisture content. **Journal of Stored Products Research**, v. 41, p. 67-76, 2005.
- ALBERTS, J. F.; GELDERBLOM, W. C. A.; THIEL, P. G.; MARASAS, W. F. O.; VAN SCHALKWIK, D. J.; BEHREND, Y. Effects of the temperature and incubation period on production of fumonisin B₁ by *Fusarium moniliforme*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 1729-1733, 1990.
- ALEXANDER, N. J.; HOHN, T. M.; McCORMICK, S. P. The *TR111* Gene of *Fusarium sporotrichioides* encodes a cytochrome P-450 monooxygenase required for C-15 hydroxylation in trichothecene biosynthesis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 1, p. 221-225, 1998.
- ALMEIDA, A. P.; CORRÊA, B.; MALOZZI, M. A. B.; SAWAZAKI, E.; SOARES, L. M. V. Mycoflora and aflatoxin/fumonisin production by fungal isolated from freshly harvested corn hybrids. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 321-326, 2000.
- AVANTAGGIATO, G. et al. Fumonisin contamination of maize hybrids visibly damaged by *Sesamia*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 83, p. 13-18, 2002.
- AYRES, J. C. Significance of food mycology – an overview. In: RHODES, M.E. **Food Mycology**, Massachusetts: G. K. Hall & Co., p. 3-10, 1979.
- AZCONA-OLIVEIRA, J. I.; ABOUZIED, M. M.; PLATTNER, R. D.; NORRED, W. P.; PESTKA, J. J. Generation of antibodies reactive with fumonisins B₁, B₂ and B₃ by using cholera toxin as the carrier-adjuvant. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 1, p. 169-173, 1992a.
- AZCONA-OLIVEIRA, J. I.; ABOUZIED, M. M.; PLATTNER, R. D.; PESTKA, J. J. Production of monoclonal antibodies to the micotoxins fumonisins B₁, B₂ e B₃. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 40, p. 531-534, 1992b.

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, p. 144-148, 1992.

BACON, C. W.; BENNETT, R. M.; HINTON, D. M.; RICHARDSON, M. J. A corn seedling assay for resistance to *Fusarium moniliforme*. **Plant Disease**, v. 78, p. 302-305, 1994.

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

BANKS, J. N.; COX, S. J.; NORTHWAY, B. J. Polyclonal and monoclonal antibodies to field and storage fungi. **International Biotechnology & Biodegradation**, v. 32, p. 137-144, 1993.

BARNA-VETRÓ, I.; GYONGYÖSI, A.; SOLTI, L. Monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay of *Fusarium* T-2 and zearalenone toxins in cereals. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 2, p. 729-731, 1994.

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

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

BIAZON, L. **Caracterização de *Fusarium verticillioides* por métodos imunológicos**. 2004. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, 154 p.

BLACKWELL, B. A.; EDWARDS, O. E.; FRUCHIER, A.; APSIMON, J.; MILLER, J. D. NMR structural studies of fumonisin B₁ and related compounds from *Fusarium moniliforme*. In: JACKSON, L. S.; DEVRIES, J. W.; BULLERMAN, L. B. (eds.) **Fumonisin in food**. New York: Plenum Press, p. 75-91, 1996.

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, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Portaria nº 845, 8 de novembro de 1976. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. 30 de novembro de 1976 (Brasília).

BRITZ, H.; COUTINHO, T. A.; WINGFIELD, M. J.; MARASAS, W. O.; GORDON, T. R.; LESLIE, J. F. *Fusarium subglutinans* f. sp. *pini* represents a distinct mating population in the *Gibberella fujikuroi* species complex. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 3, p. 1198-1201, 1999.

BULLERMAN, L. B.; TSAI, W. Y. L. Incidence and levels of fumonisins in corn and corn-based foods and feeds. **Journal of Food Protection**, v. 57, n. 6, p. 541-546, 1994.

BULLERMAN, L. B. Occurrence of *Fusarium* and fumonisins on food grains and in foods. In: JACKSON, L. S.; DEVRIES, J. W.; BULLERMAN, L. B. (eds.) **Fumonisin in food**. New York: Plenum Press, p. 27-38, 1996.

BURGESS, L. W.; SUMMERELL, B. A. Mycogeography of *Fusarium*: Survey of *Fusarium* species in subtropical and semi-arid grassland soils from Queensland, Australia. **Mycological Research**, v. 96, p. 780-784, 1992.

BUTCHKO, R. A. E.; PLATTNER, R. D.; PROCTOR, R. H. FUM9 is required for C-5 hydroxylation of fumonisins and complements the meiotically defined *Fum3* locus in *Gibberella moniliformis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 11, p. 6935-6937, 2003.

CAHAGNIER, B.; MELCION, D.; RICHARD-MOLARD, D. Growth of *Fusarium moniliforme* and its biosynthesis of fumonisin B1 on maize grain as a function of different water activities. **Letters in Applied Microbiology**, v. 20, p. 217-251, 1995.

CAMARGO, Z. P. Production of *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for immunodiffusion tests. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 26, p. 2147-2151, 1988.

CAMARGOS, S. M.; SOARES, L. M. V.; SAWAZAKI, E.; BOLONHEZI, D.; CASTRO, J. L.; BORTOLLETO, N. Fumonisin in corn cultivars in the State of São Paulo. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 226-229, 2000.

CASA, R. T.; REIS, E. M.; ZAMBOLIM, L. Fungos associados à semente do milho produzida nas Regiões Sul e Sudeste do Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 23, p. 370-373, 1998.

CHEN, F-S.; CHEN, J. W.; ZHAO, S.; GAN, Z.; LUO, X-C.; ZHOU, Q. Characterization of chicken antisera raised against *Aspergillus* spp. by enzyme-linked immunosorbent assay. **Nahrung**, v. 44, n. 5, p. 323-327, 2000.

CHRISTENSEN, C. M.; KAUFMANN, H. H. Mycoflora. In: CHRISTENSEN, C. M. **Cereal Grains and their Products**, Saint Paul: American Association of Cereal Chemists, p. 158-192, 1974.

COUSIN, M. A.; DUFRENNE, J.; ROMBOUTS, F. M.; NOTERMANS, S. Immunological detection of *Botrytis* and *Monascus* species in food. **Food Microbiology**, v. 7, p. 227-235, 1990.

DE RUITER, G. A.; VAN DER LUGT, A. W.; VORAGEN, A. G. J.; ROMBOUTS, F. M.; NOTERMANS, S. H. W. High-performance size-exclusion chromatography and ELISA detection of extracellular polysaccharides from Mucorales. **Carbohydrate Research**, v. 21, p. 47-57, 1991.

DESJARDINS, A. E.; PLATTNER, R. D.; PROCTOR, R. H. Genetic and biochemical aspects of fumonisin production. In: JACKSON, L. S.; DEVRIES, J. W.; BULLERMAN, L. B. (eds.) **Fumonisin in food**. New York: Plenum Press, p. 165-173, 1996a.

DESJARDINS, A. E.; PLATTNER, R. D.; PROCTOR, R. H. Linkage among genes responsible for fumonisin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi* mating population A. **Applied Environmental Microbiology**, v. 62, n. 7, p. 2571-2576, 1996b.

DEWEY, F. M.; BANHAM, A. H.; PRIESTLEY, R. A.; MARTIN, B.; HAWES, C.; PHILLIPS, S. I.; WAREING, P. W. Monoclonal antibodies for the detection of spoilage fungi. **International Biodegradation & Biodeterioration**, v. 32, p. 127-136, 1993.

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

DILKIN, P.; ZORZETE, P.; MALLMANN, C. A.; GOMES, J. D. F.; UTIYAMA, C. E.; OETTING, L. L.; CORRÊA, B. Toxicological effects of chronic low doses of aflatoxin B₁ and fumonisin B₁-containing *Fusarium moniliforme* culture material in weaned piglets. **Food and Chemical Toxicology**, v. 41, p. 1345-1353, 2003.

DING, Y.; BOJJA, R. S.; DU, L. Fum3p, a 2-ketoglutarate-dependent dioxygenase required for C-5 hydroxylation of fumonisins in *Fusarium verticillioides*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 4, p. 1931-1934, 2004

DUBOIS, N.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, B. A.; SMITH, F. Colorimetric method determination of sugars and substances. **Analytical Chemistry**, v. 23, p. 350-356, 1956.

EDEL, V.; STEINBERG, C.; GAUTHERON, N.; ALABOUVETTE, C. Ribosomal DNA-targeted oligonucleotide probe and PCR assay specific for *Fusarium oxysporum*. **Mycological Research**, v. 104, n. 5, p. 518-526, 2000.

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.

FLAHERTY, J. E.; PIRTILLÄ, A. M.; BLUHM, B. H.; WOLOSHUK, C. P. PAC1, a pH-regulatory gene from *Fusarium verticillioides*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 9, p. 5222-5227, 2003.

FLAHERTY, J. E.; WOLOSHUK, C. P. Regulation of fumonisina biosynthesis in *Fusarium verticillioides* by a zinc binuclear cluster-type gene, ZFR1. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 5, p. 2653-2659, 2004.

FUHRMANN, B.; ROQUEBERT, M. F.; van HOEGAERDEN, M.; STROSSBERG, A. D. Immunological differentiation of *Penicillium* species. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 1043-1047, 1989.

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, p. 191-200, 1997.

GASSER, R. B. What's in that band? **International Journal for Parasitology**, v. 28, p. 989-996, 1998.

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

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

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

GELDERBLOM, W. C. A.; MARASAS, W. F. O.; VLEGGAR, R.; THIEL, P. G.; CAWOOD, M. E. Fumonisin: isolation, chemical characterization and biological effects. **Mycopathologia**, v. 117, p. 11-16, 1992b.

GESSNER, M. O.; SCHMITT, A. L. Use of solid-phase extraction to determine ergosterol concentrations in plant tissue colonized by fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 415-419, 1996.

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

GOURAMA, H. & BULLERMAN, L. B. Detection of molds in foods and feeds: potential rapid and selective methods. **Journal of Food Protection**, v. 58, n. 12, p. 1389-1394, 1995.

HAYASHI, K. PCR-SSCP: a method for detection of mutations. **Genetic Analysis: Technology Applications**, v. 9, n. 3, p. 73-79, 1992.

HAYASHI, K. Recent enhancements in SSCP. **Genetic Analysis: Biomolecular Engineering**, v. 19, p. 193-196, 1999.

HEFLE, S. L. Immunoassay fundamentals. **Food Technology**, v. 49, n. 2, p. 102-107, 1995.

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

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.

JACKSON, M. A. & BENNET, G. A. Production of fumonisin B₁ by *Fusarium moniliforme* NRRL 13616 in submerged culture. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 2296-2298, 1990.

JACKSON, L. S.; DEVRIES, J. W.; BULLERMAN, L. B. (eds.) **Fumonisin in Food**. New York: Plenum Press, 399 p., 1996.

JARVIS, B.; SCILER, D. A. L.; OULD, A. J. L.; WILLIAMS, A. P. Observations on the enumeration of molds in food and feedstuffs. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 55, p. 325-336, 1983.

JURGENSON, J. E.; ZELLER, K. A.; LESLIE, J. F. Expanded genetic map of *Gibberella moniliformis* (*Fusarium verticillioides*). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 4, p. 1972-1979, 2002.

KAUFMANN, 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.; LESLIE, J. F.; CLAFILIN, L. E. Systemic infection of corn by *Fusarium moniliforme*. **Phytopathology**, v. 82, p. 1138 (Abstract), 1992.

KELLER, N. P.; HOHN, T. M. Metabolic pathways gene clusters in filamentous fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v. 21, p. 17-29, 1997.

KELLER, N. P.; WATANABE, C. M. H.; KELKAR, H. S.; ADAMS, T. H.; TOWNSEND, C. A. Requirement of monooxygenase-mediated steps for sterigmatocystin biosynthesis by *Aspergillus nidulans*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 359-362, 2000.

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

KONG, P.; CHUANXUE, H.; RICHARDSON, P. A.; GALLEGLY, M. E. Single-strand conformational polymorphism of ribosomal DNA for rapid species differentiation in genus *Phytophthora*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 39, p. 238-249, 2003.

KONG, P.; RICHARDSON, P. A.; MOORMAN, G. W.; HONG, C. Single-strand conformational polymorphism analysis of the ribosomal internal transcribed spacer 1 for rapid species identification within the genus *Pythium*. **FEMS Microbiological Letters**, v. 240, p. 229-236, 2004.

KUMEDA, Y.; ASAO, T. Single-strand conformational polymorphism analysis of PCR-amplified ribosomal DNA internal transcribed spacers to differentiate species of *Aspergillus* section *Flavi*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 8, p. 2947-2952, 1996.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n.15, p. 680-685, 1970.

LESLIE, J. F.; PLATTNER, R. D.; DESJARDINS, A. E.; KLITTICH, C. H. R. Fumonisin B₁ production by strains from different mating populations of *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium* section *Liseola*). **Mycotoxology**, v. 82, p. 341-345, 1992.

LESLIE, J. F. Introductory Biology of *Fusarium moniliforme*. In: JACKSON, L. S.; DEVIRES, J. W.; BULLERMAN, L. B. (eds.) **Fumonisin in food**. New York: Plenum Press, p. 153-164, 1996.

LI, S.; MARQUARDT, R. R.; ABRAMSON, D. Immunochemical detection of molds: a review. **Journal of Food Protection**. v. 63, n. 2, p. 281-291, 2000.

LIN, H. H.; LISTER, R. M.; COUSIN, M. A. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of mold in tomato puree. **Journal of Food Science**, v. 51, n. 1, p. 180-183, 1986.

LIN, H. H.; COUSIN, M. A. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of molds in foods. **Journal of Food Science**, v. 52, p. 1089-1094, 1987.

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, p. 3267-3276, 1994.

LU, P.; MARQUARDT, R. R.; KIEREK-JASZCZUK, D. Immunochemical detection of fungi using polyclonal antibodies raised in rabbits to exoantigens from *Aspergillus ochraceus*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 20, p. 41-45, 1995.

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

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

MARÍN, S.; SANCHIS, V., VINAS, I.; CANELA, R.; MAGAN, N. Effect of water activity and temperature on growth and fumonisin B₁ and B₂ production by *Fusarium proliferatum* and *Fusarium moniliforme* on maize grain. **Letters on Applied Microbiology**, v. 21, p. 298-301, 1995.

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

MARÍN, S.; MAGAN, N.; BELLI, N.; RAMOS, A. J.; CANELA, R.; SANCHIS, V. Two-dimensional profiles of fumonisin B₁ production by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* in relation to environmental factors and potential for modeling toxin formation in maize grain. **International Journal of Food Microbiology**, v. 51, p. 159-167, 1999a.

MARÍN, S.; MAGAN, N.; SERRA, J.; RAMOS A. J.; CANELA, R.; SANCHIS, V. Fumonisin B₁ production and growth of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* on maize, wheat and barley grain. **Journal of Food Science**, v. 64, n. 5, p. 921-924, 1999b.

MILLER, J. D.; SAVARD, M. E.; SIBILIA, A.; RAPIOR, R.; HOCKING, A. D.; PITT, J. I. Production of fumonisins and fusarins by *Fusarium moniliforme* from southeast Asia. **Mycologia**, v. 85, p. 385-391, 1993.

MINERVINI, F.; FORNELLI, F. FLYNN, K. M. Toxicity and apoptosis induced by the mycotoxins nivalenol, deoxinivalenol and fumonisin B₁ in a human erythroleukemia cell line. **Toxicology in Vitro**, v. 18, p. 21-28, 2004.

MISLIVEC, P. B. Specific requirements and physical factors affecting fungal growth and multiplication. In: RHODES, M.E. (Ed) **Food Mycology**, Boston: G. K. Hall & Co., 1979.

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

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

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

NCBI. National Council for Biotechnology Information. Disponível em: www.ncbi.nlm.nih.gov. Acesso em 04 de julho de 2005.

NELSON, P. E.; TOUSSON, T. A.; MARASAS, W. F. O. ***Fusarium* species – An illustrated manual for identification**. Pennsylvania, Pennsylvania State University Press, 1983, 193 p.

NELSON, P. E.; PLATTNER, R. D.; SHACKELFORD, D. D.; DESJARDINS, A. E. Production of fumonisins by *Fusarium moniliforme* strains from various substrates and geographic areas. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 2410-2412, 1991.

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

NORRED, W. P. Fumonisins – mycotoxins produced by *Fusarium moniliforme*. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 38, p. 309-328, 1993.

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, p. 247-258, 1985.

NOTERMANS, S.; HEUVELMAN, C. J.; VAN EGMOND, H. P.; PAULSCH, W. E.; BESLING, J. R. Detection of mold in food by enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of Food Protection**, n. 49, n. 10, p. 786-791, 1986.

NOTERMANS, S.; SOENTORO, P. S. S. Immunological relationship of extracellular polysaccharide antigens produced by different molds species. **Antoine van Leeuwenhoek**, v. 52, p. 593-601, 1986.

O'DONNELL, K.; CIGELNIK, E.; NIREMBERG, H. I. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. **Mycologia**, v. 90, n. 3, p. 465-493, 1998.

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

ONO, E. Y. S.; SASAKI, E. Y.; HASHIMOTO, E. H.; HARA, L. N.; CORRÊA, B.; ITANO, E. N.; SUGIURA, T.; UENO, Y.; HIROOKA, E. Y. Post-harvested 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.; MENDES, A. M.; MEIRELLES, P. G.; HIROOKA, E. Y.; ONO, M. A. Micotoxinas em alimentos – progressos na imunodeteccção. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 32, p. 69-80, 2004.

PESTKA, J. J.; CASALE, W. L. Naturally occurring fungal toxins. In: SIMMONS, M. S. & NIAGRY, J. (Eds.) **Food contamination from environmental sources**. New York: John Wiley and Sons Ltd., p. 613-638, 1990.

PESTKA, J. J.; ABOUZEID, M. N.; SUTIKNO. Immunological assays for mycotoxins detection. **Food Technology**, v. 49, n. 2, p. 120-128, 1995.

PLATTNER, R. D.; NORRED, W. P.; BACON, C. W.; VOSS, K. A.; PETERSON, R.; SHACKELFORD, D. D.; WEISLEDER, D. A method for detection of fumonisins in corn samples associated with field cases of equine leukoencephalomalacia. **Mycologia**, v. 82, p. 698-702, 1990.

PROCTOR, R. H.; DESJARDINS, A. E.; PLATTNER, R. D. Biosynthetic and genetic relationships of B-series fumonisins produced by *Gibberella fujikuroi* mating population A. **Natural Toxins**, v. 7, p. 251-258, 1999a.

PROCTOR, R. H.; DESJARDINS, A. E.; PLATTNER, R. D.; HOHN, T. M. A polyketide synthase gene required for biosynthesis of fumonisins micotoxins in *Gibberella fujikuroi* mating population A. **Fungal Genetics and Biology**, v. 27, p. 100-112, 1999b.

PROCTOR, R. H.; BROW, D. W.; PLATTNER, R. D.; DESJARDINS, A. E. Co-expression of 15 contiguous genes delineates a fumonisina biosynthetic gene cluster in *Gibberella moniliformis*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 27, p. 100-112, 2003.

RAEDER, U.; BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. **Letters in Applied Microbiology**, v.1, p.16-20, 1985.

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

RICHARDSON, M. D.; BACON, C. W. Catabolism of 6-methoxy-benzoxazolinone and 2-benzoxazolinona by *Fusarium moniliforme*. **Mycologia**, v. 87, n. 4, p. 510-517, 1995.

ROSS, P. F.; RICE, L. G.; PLATTNER, R. D.; OSWEILLER, G. D.; WILSON, T. M.; OWENS, D. L.; NELSON, H. A.; RICHARD, J. L. Concentrations of fumonisin B₁ in feeds associated with animal health problems. **Mycologia**, v. 114, p. 129-135, 1991.

SANGUINETTI, C. J.; DIAS NETO, E.; SIMPSON, A. J. G. Rappid silver staining and recovery of PRC products separated on polyacrylamide gels. **Biotechniques**, v. 17, n. 5, p. 916-919, 1994.

SAMSON, R. A.; HOESKSTRA, E. S.; FRISVAD, J. C. et al. **Introduction to food-borne fungi**. 4 ed. The Netherlands, Centraalbureau voor Schimmelcultures, 1995.

SEKHON, A. S.; LI, J. S. K.; GARG, A. K. *Pennicilliosis marneffeii*: serological and exoantigen studies. **Mycopathologia**, v. 77, p. 51-57, 1982.

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

SEO, J-A.; PROCTOR, R. H.; PLATTNER, R. D. Characterization of four clustered and coregulated genes associated with fumonisina biosynthesis in *Fusarium verticillioides*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 34, p. 155-165, 2001.

SHAPIRA, R.; PASTER, N.; MENASHEROV, M.; EYAL, O.; METT, A.; MEIRON, T.; KUTTIN, E.; SALOMON, R. Development of polyclonal antibodies for the detection of aflatoxigenic molds involving culture filtrate and chimeric proteins expressed in *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 3, p. 990-995, 1997.

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

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

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

SHIM, W-B.; WOLOSHUK, C. P. Regulation of fumonisin B₁ biosynthesis and conidiation in *Fusarium verticillioides* by a cyclin-like (C-type) gene, FCC1. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 4, p. 1607-1612, 2001.

SILVA, J. B.; DILKIN, P.; FONSECA, H.; CORRÊA, B. Production of aflatoxins by *Aspergillus flavus* and fumonisins by *Fusarium* species isolated from Brazilian sorghum. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 182-186, 2004.

SINGH, K.; FRISVAD, J. C.; THRANE, U. et al. **An illustrated manual on identification of some seed-borne Aspergilli, Fusaria, Penicillia and their mycotoxins**. Danish Government, Hellerup, Denmark, 1991.

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**, v. 66, n. 10, p. 4378-4382, 2000.

SWEENEY, M. J.; DOBSON, A. D. W. Molecular biology of mycotoxin biosynthesis. **FEMS Microbiology Letters**, v. 175, p. 149-163, 1999.

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

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

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

THORNTON, C. R.; PITT, D.; WAKLEY, G. E.; TALBOT, N. J. Production of a monoclonal antibody specific to the genus *Trichoderma* and closely related fungi, and its use to detect *Trichoderma* spp. in naturally infested compost. **Microbiology**, v. 148, p. 1263-1279, 2002.

TORRES, M. R.; RAMOS, A. J.; SOLER, J.; SANCHIS, V.; MARÍN, S. SEM study of water activity and temperature effects on the initial growth of *Aspergillus ochraceus*, *Alternaria alternata* and *Fusarium verticillioides* on maize grain. **International Journal of Food Microbiology**, v. 81, p. 185– 193, 2003.

TOTHILL, L. E.; HARRIS, D., MAGAN, N. The relationship between fungal growth and ergosterol content of wheat grains. **Mycological Research**, n. 96, p. 965-970, 1992.

TSAI, G. J.; COUSIN, M. A. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of molds in cheese and yogurt. **Journal of Dairy Science**, v. 73, p. 3366-3378, 1990.

UENO, Y. **Trichotecenes – chemical, biological and toxicological aspects**. Tokyo: Kodansha, 1983.

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. et al. Fumonisin as a possible contributory risk factor for primary liver cancer. A 3-year study of corn harvested in Haimen, China, by HPLC and ELISA. **Food and Chemical Toxicology**, v. 35, p. 1143-1150, 1997.

UENO, Y. Risk of multi-exposure to natural toxins. **Mycotoxins**, v. 50, p. 13-22, 2000.

VENTURA, J. A. Taxonomia de *Fusarium* e seus segredos. In: FERNANDES, J. M.; PRESTES, A. M.; PICININI, E. C. eds. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 8, p. 303-338, 2000.

VISCONTI, A. & DOKO, M. B. Survey of fumonisin production by *Fusarium* isolated from cereals in Europe. **Journal of the Association of Official Analytical Chemistry International**, v. 77, p. 546-550, 1994.

VISCONTI, A.; BOENKE, A. Improvement of the determination of fumonisins (FB₁ and FB₂) in Maize-based feeds. **European Comisión BCR Information – Chemical Análisis**, Belgium, Brussels, 1995.

VISCONTI, A.; BONKE, A.; DOKO, M. B. Occurrence of fumonisins in Europe and the BCR-Measurement and Testing Projects. **Natural Toxins**, v. 3, n. 4, p. 269-274, 1995.

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

WANG, D. S.; LIANG, Y. X.; IJIMA, K.; et al. Co-contamination of mycotoxins in corn harvested in Haimen, a high risk area of primary liver cancer in China. **Mycotoxins**. v. 41, p. 67-70, 1995.

WARFIELD, C. Y.; GILCHRIST, D. G. Influence of kernel age on fumonisin B₁ production in maize by *Fusarium moniliforme* **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 7, p. 2853-2856, 1999.

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

WICKLOW D. T.; HORN, B. W.; SHOTWELL, O. L.; HESSELTINE, C. W.; CALDWELL, R. W. Fungal interference with *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin contamination of maize grown in a controlled environment. **Phytopathology**. v. 78, p. 68-74, 1988.

WILSON, T. M.; ROSS, P. F.; RICE, L. G.; OSWEILLER, G. D.; NELSON, H. A.; OWENS, D. L.; PLATTNER, R. D.; REGGIARDO, C.; NOOM, T. H.; PICKRELL, J. W. Fumonisin B₁ levels associated with a epizootic of equine leukoencephalomalacia. **Journal of Veterinarian Diagnostic Investigation**, v. 2, p. 213-216, 1990.

WOODWARD, M. P.; YOUNG JR., W. W.; BLOODGOOD, R. A. Detection of monoclonal antibodies specific for carbohydrate epitopes using periodate oxidation. **Journal of Immunological Methods**, v. 78, p. 143-153, 1985.

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, p. 27-38, 2001.

YU, J.; CHANG, P-K.; EHRlich, K. C.; CARY, J. W.; BHATNAGAR, D.; CLEVELAND, T. E.; PAYNE, G. A.; LINZ, J. E.; WOLOSHUK, C. P.; BENNETT, J. W. Clustered Pathway Genes in aflatoxin biosynthesis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 3, p. 1253-1262, 2004.

ANEXOS

ANEXO A

Normas para publicação no periódico SEMINA Ciências Agrárias

ANEXO A – Normas para publicação no periódico SEMINA Ciências Agrárias

Normas Editoriais para Publicação

Apresentação dos Trabalhos

1. Os originais devem ser enviados em disquete (3 ½), acompanhado de três cópias impressas, com entrelinhamento duplo. O trabalho deverá ser elaborado no editor de texto Microsoft Word for Windows, fonte Times New Roman, tamanho 11, normal; com margens de no mínimo 2cm, respeitando-se o número de páginas de acordo com a categoria do trabalho e devem estar devidamente numeradas.

2. Categorias dos Trabalhos:

- a) artigos e revisões no máximo 40 páginas;
- b) comunicações; divulgações e resenhas no máximo 20 páginas;
- c) resenhas de livros e revistas no máximo 4 páginas;
- e

3. Na primeira lauda do original deverá constar o título do trabalho, nome completo do autor principal, minicurrículo, endereço postal, número do telefone e/ou fax e e-mail; categoria do trabalho; área de publicação da Semina e classificação das áreas/sub-áreas do CNPq/CAPEs.

3.1. *Título do trabalho*: o título, acompanhado de sua tradução para o inglês, deve ser breve e suficientemente específico e descritivo, contendo as palavras-chave que representem o conteúdo do texto.

3.2. *Nome(s) completo(s) do(s) autor(es)*: Os demais dados como título e/ou credenciais, cargo(s) ocupado(s) pelo(s) autor(es) e local de realização do trabalho deverão constar em nota de rodapé.

3.3. *Resumo*: deve ser incluído um resumo informativo de aproximadamente 200 palavras, em português, acompanhado de sua tradução para o inglês, digitado com entrelinhamento duplo, na segunda lauda do original. (NBR 6028 da ABNT)

3.4. *Agradecimentos*: agradecimentos a auxílios recebidos para a elaboração do trabalho deverão ser mencionados no final do artigo.

3.5. *Notas*: notas referentes ao corpo do artigo devem ser indicadas com um asterisco alto, imediatamente depois da frase a que diz respeito. As notas deverão vir no rodapé do texto.

3.6. *Apêndices*: apêndices podem ser empregados no caso de listagens extensivas, estatísticas e outros elementos de suporte.

3.7. *Materiais gráficos*: fotografias nítidas e gráficos (estritamente indispensáveis à clareza do texto) poderão ser aceitos e deverão ser assinalados, no texto, pelo seu número de ordem, os locais onde devem ser intercalados. Se as ilustrações enviadas já tiverem sido publicadas, mencionar a fonte e a permissão para reprodução.

3.8. *Quadros e Tabelas*: os quadros e/ou tabelas deverão ser acompanhados de cabeçalho que permita compreender o significado dos dados reunidos, sem necessidade de referência ao texto. Assinalar, no texto, por seu número de ordem, os locais onde os quadros e/ou tabelas devem ser intercalados.

3.9. As grandezas, unidades e símbolos deverão obedecer às normas nacionais correspondentes (ABNT).

3.10. *Citações*: deverão seguir o sistema de chamada alfabética (NBR 10520 da

ABNT).

3.11. *Referências bibliográficas*: as referências bibliográficas, redigidas segundo a norma NBR 6023/2000 da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), deverão ser listadas na ordem alfabética no final do artigo. A exatidão e adequação das referências a trabalhos que tenham sido consultados e mencionados no texto do artigo são da responsabilidade do autor.

4. O autor principal deverá enviar, junto com o original, autorização para publicação do trabalho na SEMINA, comprometendo-se a não publicá-lo em outro periódico.

5. A publicação dos trabalhos depende de parecer da Assessoria Científica "*Ad hoc*" da Coordenadoria de Pesquisa e Pós-Graduação da UEL.

6. Após impressa a revista, o autor principal receberá gratuitamente um (1) exemplar da revista e dez (10) separatas de seu trabalho.

7. Os trabalhos não aceitos para publicação serão devolvidos ao autor.

8. As questões e problemas não previstos na presente norma serão dirimidos pelo Comitê Editorial da área para a qual foi submetido o artigo para publicação.

9. Os trabalhos devem ser enviados para:

Universidade Estadual de Londrina
Coordenadoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Edição da SEMINA
Campus Universitário - Caixa Postal 6001
86051-990 - Londrina, Paraná, Brasil.

ANEXO B**Normas para publicação no periódico Food and Agricultural Immunology**

ANEXO B – Normas para publicação no periódico *Food and Agricultural Immunology*

Aims and Scope: *Food and Agricultural Immunology* presents original immunological research with food, agricultural, environmental and veterinary applications. The primary focus of the journal is on research exploiting antibodies and the immune response with food and agricultural applications. The journal also welcomes papers directed towards understanding interactions at the interface of the food and immune systems. Submission of relevant review articles and short papers containing 'exceptional' preliminary information is also encouraged.

1. Introduction It is essential that authors prepare their manuscripts according to established specifications. Failure to follow them may result in your paper being delayed and the effectiveness of the search capabilities offered by electronic delivery will depend upon the care used by authors in preparing their manuscripts. Therefore, contributors are strongly encouraged to read these instructions carefully before preparing a manuscript for submission, and to check the manuscript for compliance with these notes before submitting it for publication.

2. Submitting a Paper to *Food and Agricultural Immunology* Papers for consideration should be sent to the Editor-in-Chief, Professor Chris Smith: Chester College University Department of Biological Sciences Parkgate Rd Chester, CH1 4BJ United Kingdom Email: fai@chester.co.uk <<mailto:fai@chester.co.uk>> Authors are encouraged to submit manuscripts electronically. Electronic submissions should be sent as email attachments using a standard word processing program, such as MSWORD. If email submission is not possible, please send an electronic version on disk along with three paper copies together with one set of high quality figures for reproduction. Please be aware that hard copy submission may hinder the publication process. When the accepted paper is submitted in final form, please send two paper copies and a copy on disk - see [Electronic Processing <./authors/electronicprocessing.pdf>](#). If you are not sure about the usability of your disk please contact the Editor-in-Chief, Chris Smith, at fai@chester.co.uk <<mailto:fai@chester.co.uk>>. Please make sure your contact address information is clearly visible on the outside of all packages you are sending to Editors.

3. General Guidelines *Food and Agricultural Immunology* considers all manuscripts on the strict condition that they have been submitted only to *Food and Agricultural Immunology*, that they have not been published already, or that they under consideration for publication or in press elsewhere, and the letter accompanying the submission of any manuscript should contain a clear statement to this effect. Authors who fail to adhere to this condition will be charged with all costs, which *Food and Agricultural Immunology* incurs and their papers will not be published. Contributions to *Food and Agricultural Immunology* must report original research. *Food and Agricultural Immunology* undertakes a peer-review process. Articles will be reviewed at the discretion of the Editor and the Editor's decision on the ultimate suitability of an article for publication is final. The Journal has no free colour pages within its annual page allowance. Authors who propose publishing figures in colour should consult Taylor & Francis to agree a financial contribution to additional colour reproduction costs. Figures, which appear in black-and-white in the print edition of the Journal, will appear in colour in the online edition, assuming colour originals are supplied.

Writing your paper For all manuscripts non-discriminatory language is mandatory. Sexist or racist terms should not be used. Authors should include a total word count with their manuscript, and all pages should be numbered. Each paper should have three to six keywords. Papers are accepted only in English and should use British (UK) English. Manuscripts should be typed on single sides of good quality white A4 or 8 x 11 inch paper, double-spaced throughout including the reference section, with wide (2.5 cm) margins. All the authors of a paper should include their full names, affiliations, postal addresses, telephone and fax numbers and email addresses on the

cover page of manuscripts. The manuscript must be written in Times New Roman, font 12 in double spaced lines. Abstracts of 100 - 150 words are required for all papers submitted and should precede the text of a paper - see [Notes on Style <./authors/cfaistylenotes.pdf>](#). Manuscripts should be compiled in the following order: title page; abstract; keywords; main text; acknowledgments; appendixes (as appropriate); references; table(s) with caption(s) (on individual sheets); figure caption(s) (as a list). Section headings should be concise and numbered sequentially, using a decimal system for subsections. Authors must adhere to [SI units <http://www.bipm.org/en/si/>](#). Units are not italicised. When using a word which is or is asserted to be a proprietary term or trade mark authors must use the symbol ® or TM or alternatively a footnote can be inserted using the wording below: *This article includes a word that is or is asserted to be a proprietary term or trade mark. Its inclusion does not imply it has acquired for legal purposes a non-proprietary or general significance, nor is any other judgement implied concerning its legal status.*

4. Copyright It is a condition of publication that authors vest or license copyright in their articles, including abstracts, in Taylor & Francis Ltd. This enables us to ensure full copyright protection and to disseminate the article, and the Journal, to the widest possible readership in print and electronic formats as appropriate. Authors may, of course, use the material elsewhere after publication providing that prior permission is obtained from Taylor & Francis Ltd. Authors are themselves responsible for obtaining permission to reproduce copyright material from other sources. For details on copyright permission [click here <./authors/copyrightpermission.pdf>](#). Copies of the permission letters should be sent with the manuscript to the Editors.

5. Notes on Style For a full description of the Journal's style (including referencing) [click here <./authors/cfaistylenotes.pdf>](#).

6. Early Electronic Offprints Corresponding authors can now receive their article by email as a complete PDF. This allows the author to print up to 50 copies, free of charge, and disseminate them to colleagues. In many cases this facility will be available up to two weeks prior to publication. Alternatively, corresponding authors will receive the traditional 50 offprints. A copy of the Journal will be sent by post to all corresponding authors after publication. Additional copies of the Journal can be purchased at the author's preferential rate of £15.00/\$25.00 per copy. Authors may also subscribe to the Journal by visiting the Journal homepage www.tandf.co.uk/journals/titles/09540105.asp [<http://www.tandf.co.uk/journals/titles/09540105.asp>](http://www.tandf.co.uk/journals/titles/09540105.asp) where up to date subscription prices are available [institutional and personal], or contacting our customer services department direct at Email: journal.orders@tandf.co.uk [<mailto:journal.orders@tandf.co.uk>](mailto:journal.orders@tandf.co.uk).

7. Electronic Processing For full details on electronic processing [click here <./authors/electronicprocessing.pdf>](#).

8. Supplementary Material For information on submitting animations, movie files and sound files or any additional information including indexes and calendars [click here <./authors/suppmaterial.pdf>](#).

9. Page Charges There are no page charges to individuals or institutions. [<javascript:history.go\(-1\)>](#)
[<javascript:history.go\(-1\)>](#)

Further Notes on Style

General Style

Authors are asked to take account of the diverse audience of the journal. Please avoid the use of terms that might be meaningful only to a local or national audience, or provide a clear explanation where this is unavoidable. However, papers that reflect the particularities of a social and cultural system are acceptable.

Some specific points on style follow:

1. "US" is preferred to "American", "USA" to "United States", and "UK" to "United Kingdom".
2. Double quotation marks rather than single are used unless the "quotation is 'within' another".
3. Punctuation should follow the British style, e.g. "quotation marks precede punctuation".
4. Punctuation of common abbreviations should adhere to the following conventions: "e.g."; "i.e."; "cf.". Note that such abbreviations should not generally be followed by a comma or a (double) point/period.
5. Dashes: en rules (–) and em rules (—) should be used where needed in applications on disk if possible, or be clearly indicated in manuscripts by way of either a double or a triple hyphen, (--) or (---), respectively.
6. Upper case characters in headings and references should be used sparingly, e.g. only the first word of paper titles, subheadings and any proper nouns begin upper case; similarly for the titles of papers from journals in the references and elsewhere.
7. Apostrophes should be used sparingly. Thus, decades should be referred to as follows: "The 1980s [not the 1980's] saw ...". Possessives associated with acronyms (e.g. APU), should be written as follows: "The APU's findings that ..." but note that the plural is "APUs".
8. All acronyms for national agencies, examinations, etc., should be spelt out the first time they are introduced in text or references. Thereafter the acronym can be used if appropriate, e.g. "The work of the Assessment of Performance Unit (APU) in the early 1980s ..." and subsequently, "The APU studies of achievement ...", in a reference "(Department of Education and Science [DES] 1989a)".
9. Brief biographical details of significant national figures should be outlined in the text unless it is quite clear that the person concerned would be known internationally. Some "suggested editorial comments in a "typical text are indicated in the following with square brackets: "From the time of H. E. Armstrong [in the 19th century] to the curriculum development work associated with the Nuffield Foundation [in the 1960s], there has been a shift from constructivism to heurism in the design of [British] science courses".
10. The preferred local (national) usage for ethnic and other minorities should be used in all papers. For the USA, "African-American", "Hispanic" and "Native American" are used, e.g. "The African-American presidential candidate, Jesse Jackson ..."; for the UK, "Afro-Caribbean" (not "West Indian"), etc.
11. Material to be emphasized by italicization in the printed version should preferably be italicized in the typescript rather than underlined. Please use such emphasis sparingly.
12. Numbers in text should take the following forms: 300, 3000, 30 000 (not 30,000). Spell out numbers under 10 unless used with a unit of measure, e.g. nine pupils but 9 mm (do not introduce periods with units). For decimals, use the form 0.05 (not .05, × 05 or 0× 05). "%" (not "per cent") should be used in typescripts.
13. Appendices should appear before the references section and after any acknowledgments section. The style of the title is shown by the following example:

"Appendix C: The random network generator"

Figures and tables within appendices should continue the sequence of numbering from the main body of the text. Sections within appendices should be numbered, for example, C.1, C.2. Equations in appendices should be numbered, for example, (C 1), (C 2). If there is only one appendix, it is referred to as "the appendix" and **not** called "Appendix A".

Title and authors

Title: the title should be initial capital letter only (except for names), bold and centred on the page; e.g.

This is the title of the paper

For over-long titles, please supply a shortened version, which can be used as a running head for the article.

Authors: Author names should be given in block capitals with first names given in full with middle initials. Omit all titles. Followed by the link to the relevant affiliation (if there is more than one) indicated with superscript numbers; e.g.

ANDREW N. OTHER¹, & JOE BLOGGS²

Affiliation: Upper and lowercase. Separated by comma. Relationship to authors indicated with superscript numbers, e.g.

¹College of Medicine, University of Malawi, Blantyre, Malawi, Central Africa, and ²National

Ageing Research Institute, Parkville, Victoria, Australia

Abstracts

No title. Structured or unstructured abstracts of 100–150 words, summarizing the significant coverage and findings of the paper are required for all papers, and should be submitted as detailed below, following the title and authors' names and affiliations, preceding the main text. For papers reporting original research, state the **primary objective** and any hypothesis tested; describe the **research design** and your reasons for adopting that methodology; state the **methods and procedures** employed, including where appropriate tools, hardware, software, the selection and number of study areas/subjects, and the central **experimental interventions**; state the **main outcomes and results**, including relevant data; and state the **conclusions** that might be drawn from these data and results, including their implications for further research or application/practice.

For review essays, state the **primary objective** of the review; the reasoning behind your literature selection; and the way you critically analyse the literature; state the **main outcomes and results** of your review; and state the **conclusions** that might be drawn, including their implications for further research or application/practice.

Keywords: Each paper should have three to six keywords. Format: "Keywords" followed by colon, then keywords. First keyword has initial cap. Subsequent keywords do not unless proper nouns. Separated by commas, e.g.

Keywords: Psychiatry, teaching, developing world, Africa, Malawi, primary care

Correspondence

After keywords, corresponding author details should be given, e.g.

Correspondence: Anna Casselbrant, B.S., Dept. of Gastro Research, Göteborg University, Medicinargatan 1J, SE-413 90 Göteborg, Sweden. Fax: +46 31 82 18 66. Email:

anna.casselbrant@gastro.gu.se

Headings

Three levels of headings can be used, as described below.

(A) Bold. Uppercase first word only.

(B) Italic. Uppercase first word only.

(C) Italic. Uppercase first word only. Followed by full point. Text runs on.

The first paragraph of text under each heading should not be indented. All consecutive paragraphs should be indented.

Tables and figures

Artwork submitted for publication will not be returned and will be destroyed after publication, unless requested otherwise. Whilst every care is taken of artwork, neither Editors nor Taylor & Francis shall bear any responsibility or liability for its non-return, loss or damage, nor for any associated costs or compensation. Authors are strongly advised to insure appropriately.

1. Tables and figures should be informative, relevant and visually attractive. The style and spelling of lettering in figures must correspond to the main text of the manuscript. Tables and figures must be referred to in the text and numbered with consecutive roman or arabic numbers respectively in the order of their appearance ("see Figure 1"; "see Tables I–IV"). Each table and figure should have a stand-alone descriptive caption that explains its purpose without reference to the text; each table column should have an appropriate heading. Cite as "Table I", "Table II", "Figure 1", etc., in text. Avoid the use of vertical rules in tables. Example of caption below:

Table I. Daily faecal output and total and single faecal BS concentration in rats fed on standard, BS-enriched and HFLF diets.

2. The ideal place at which a table or figure should be inserted in the printed text should be indicated clearly in the manuscript:

"[Insert Table I about here]"

3. Figures and tables must be on separate sheets or in separate files and not embedded in the text. The scale of figures should allow for reduction to 139 mm page width (B5 journals), or 80 mm column width or 169 mm page width (for 8½" x 11" journals) or page length (206 mm [B5], 240 mm [½" x 11"]) if to be placed landscape, but landscape reproduction (i.e. reading from bottom to top of the page) should be avoided. Electronic versions of figure artwork are preferred and should be supplied at resolutions of no less than 300 dpi for halftones (photographs) and colour and 600 dpi for line drawings. Please save as JPEG or TIFF format only.

Please number the hard copy of each figure on the reverse lightly in pencil.

Please do not type the caption for a figure on the artwork for that figure. A separate list of figure captions should appear at the end of the manuscript.

References

References should follow the Council of Biology Editors (CBE)

(<http://writing.colostate.edu/references/sources/cbe/index.cfm>) style. Only works actually

cited in the text should be included in the references. The name-year system should be used: place inside brackets the author's name and year of publication. Publications from the same author in a single year should use a, b, c, etc. Where there are three or more authors, the citation should give only the first author followed by "et al." (e.g., Smith et al. 1928). Spelling in the reference list should follow the original. References should then be listed in alphabetical order at the end of the article:

Book chapter:

Kuret JA, Murad F. 1990. Adenohypophyseal hormones and related substances. In: Gilman AG, Rall TW, Nies AS, Taylor P, editors. The pharmacological basis of therapeutics. 8th ed. New York: Pergamon. p 1334–1360.

Journal article:

Steiner U, Klein J, Eiser E, Budkowski A, Fetters LJ. 1992. Complete wetting from polymer mixtures. *Science* 258:1122–1129.

Conference proceedings:

Irvin AD, Cunningham MP, Young AS, editors. 1981. Advances in the control of Theileriosis. International Conference held at the International Laboratory for Research on Animal Diseases; 1981 Feb 9-13; Nairobi. Boston: Martinus Nijhoff Publishers. 427 p.

Dissertations or Thesis:

Mangie ED. 1991. A comparative study of the perceptions of illness in New Kingdom Egypt and Mesopotamia of the early first millenium [dissertation]. Akron (OH): University of Akron. 160 p. Available from: University Microfilms, Ann Arbor MI; AAG9203425.

Journal article on internet:

Loker WM. 1996. "Campesinos" and the crisis of modernization in Latin America. *Jour of Pol Ecol* [serial online]; 3(1). Available: http://www.library.arizona.edu/ej/jpe/volume_3/asciilokeriso.txt via the INTERNET. Accessed 1996 Aug 11.

Webpage:

British Medical Journal [Internet]. Stanford, CA: Stanford Univ; 2000 July 10 - [cited 2001 Apr 12]; Available from: <http://bmj.bmjournals.com/>

Internet databases:

Prevention News Update Database [Internet]. Rockville (MD): Centers for Disease Control and Prevention(US), National Prevention Information Network. 1988 Jun - [cited 2001 Apr 12]. Available from: <http://www.cdcnpin.org/db/public/dnmain.htm>

Mathematics

Special care should be taken with mathematical scripts, especially subscripts and superscripts and differentiation between the letter "ell" and the figure "one", and the letter "oh" and the figure "zero". If your keyboard or PC does not have the characters you need, or when using longhand, it is important to differentiate between: K and k; X, x and \times (multiplication); asterisks intended to appear when published as multiplication signs and those intended to remain as asterisks; etc. Special symbols, and others used to stand for symbols not available in the character set of your PC, should be highlighted in the text and explained in the margin. In some cases it is helpful to supply annotated lists of symbols for the guidance of the subeditor and the typesetter, and/or a "Nomenclature" section preceding the "Introduction". In both displayed equations and in text, scalar variables must be in italics, with non-variable matter in upright type.

For simple fractions in the text, the solidus "/" should be used instead of a horizontal line, care being taken to insert parentheses where necessary to avoid ambiguity. Exceptions are the proper fractions available as single type on keyboards and in character sets (e.g. $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$, $\frac{3}{4}$). The solidus is not generally used for units: m s⁻¹ m/s, but note electrons/s, counts/channel. Displayed equations referred to in the text should be numbered serially ((1), (2), etc.) on the right-hand side of the page. Short expressions not referred to by any number will usually be incorporated in the text.

Symbols used to represent tensors, matrices, vectors and scalar variables should either be used as required from the character set of the application you are using or marked on hardcopy by underlining with a wavy underline for bold, a straight underline for italic and a straight red underline for sans serif.

The following styles are preferred: upright bold sans serif **r** for tensors, upright bold serif **r** for vectors and matrices, and medium face sloping serif *r* for scalar variables.

Typographical requirements must be clearly indicated at their first occurrence, e.g. Greek, Roman, script, sans serif, bold, italic. Authors will be charged for corrections at proof stage resulting from a failure to do so.

Braces, brackets and parentheses are used in the order {{ () }}, except where mathematical convention dictates otherwise (e.g. square brackets for commutators and anticommutators; braces for the exponent in exponentials).

For units and symbols, the SI system should be used. Where measurements are given in

other systems, conversion factors or conversions should be inserted by the author. Mathematical equations should preferably be typewritten, with subscripts and superscripts clearly shown. It is helpful to identify unusual or ambiguous symbols in the margin when they first occur. Please ensure all symbols are described in the text. If equations are numbered, consecutive Arabic numbers in parentheses should be used. Equations may be referred to in the text as "Equation (1)", "equations (2)–(4)". To simplify typesetting, please use: (1) the "exp" form of complex exponential functions; (2) fractional exponents instead of root signs; and (3) the solidus (/) to simplify fractions e.g. 3/4, $\exp x^{1/2}$. Please underline all mathematical symbols to be set italic and put a wavy line under bold symbols. Other letters not marked will be set in roman type. Please supply reproducible artwork for equations containing ring formulae and other complex chemical structures. Schemes should also be numbered with consecutive Arabic numbers.

Footnotes

Footnotes are not to be used except for designation of the corresponding author of the paper or current address information for an author (if different from that shown in the affiliation). All other notes should appear in an "Endnotes" section. Information concerning grant support of research should appear in a separate Acknowledgements section at the end of the paper. Acknowledgements of the assistance of colleagues or similar notes of appreciation also properly belong in an Acknowledgements section.

Footnotes to tables should be typed directly below the table and are indicated by the following symbols: * (asterisk or star), † (dagger), ‡ (double dagger), ¶ (paragraph mark), § (section mark), || (parallels), # (number sign). Reinitialize symbol sequence within tables.

Acknowledgments

Any acknowledgments authors wish to make should be included in a separate headed section at the end of the manuscript preceding any appendices and before the references section. Please do not incorporate acknowledgments into notes or biographical notes.