



**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA**

EDSON LUIZ ZANGRANDO FIGUEIRA

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS INIBIDORES DE
AMILASE EM MILHO (*Zea mays* L.) VISANDO CONTROLE
DE *Fusarium verticillioides***

LONDRINA
2003

EDSON LUIZ ZANGRANDO FIGUEIRA

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS INIBIDORES DE
AMILASE EM MILHO (*Zea mays* L.) VISANDO CONTROLE
DE *Fusarium verticillioides***

Tese apresentada ao Programa de Mestrado e Doutorado em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, como requisito final à obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Profa. Dra. Elisa Yoko Hirooka
Coorientador: Prof. Dr. Alejandro Blanco
Labra

Londrina

2003

COMISSÃO EXAMINADORA

Londrina, ____ de _____ de 2003

A DEUS, por TUDO.

Aos meus pais, Edison e Thereza pelo
amor e por estarem sempre presentes

Aos meus irmão Rodrigo e Fernando
pela alegria e estímulo

AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Elisa Yoko Hirooka, pela orientação, dedicação, incentivo e sobretudo amizade.

À Universidade Estadual de Londrina e aos professores do Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos, pelos valiosos ensinamentos.

Ao Dr. Alejandro Blanco Labra pela orientação, dedicação, incentivo e sobretudo amizade, durante permanência no Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN-Unidad Irapuato, Gto-México.

Ao Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN-Unidad Irapuato e aos professores desta Instituição.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento e Pesquisa-CNPq pela Bolsa de Doutorado (processo 144787/1998-9) e apoio financeiro (projeto: CNPq-Faixa A, proc. 463379/00).

À Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPEs pela Bolsa de Doutorado Sanduíche (processo BEX0119/01-6).

À Fundação Araucária (processo 614) e ao Programa Sul de Pesquisa e Pós Graduação-CNPq/Fundação Araucária (processo 520896/99-8) pelo apoio financeiro.

Ao pesquisador Antônio Carlos Gerage do Instituto Agrônomo do Paraná-IAPAR-Londrina, pelo plantio e fornecimento das amostras de milho utilizadas no desenvolvimento do trabalho.

À pesquisadora Brigda e ao Dr. João de Lima do Instituto Agrônomo do Paraná-IAPAR-Londrina, pelo permissão do uso de centrífuga refrigerada.

À Lic. Elizabeth Mendiola Olaya pelo apoio no laboratório, dedicação, incentivo e sobretudo amizade, durante permanência no Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN-Unidad Irapuato, Gto-México.

À Dra. Elza Louko Ida pela colaboração e apoio.

À Dra. Tereza C.R. Moreira, Dra. Dalva Tomoe Miyagui, Dra. Antônia Miwa Iguti e Dra. Elizabete Y. S. Ono pela colaboração.

Ao Doutorando César Leobardo Aguirre Mancilla (Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN-Unidad Irapuato, Gto-México) pelo auxílio no laboratório e amizade

Ao Doutorando Eduardo Armienta Aldana (Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN-Unidad Irapuato, Gto-México) pelo apoio e amizade.

À Dra. Teresa Garcia Gasca, Dra. Tereza Carrillo, Dr. Juan Carlos, Lic. Juan Carlos, Magali, Verónica, Maria Leonor, Enrique, Anahí, Felipe, Marlen, Lucrecia, Alícia Chagolla, Adriane, Sarita, Ernesto e a todos os funcionários do Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN-Unidad Irapuato, Gto-México.

À Adriana L. Soares, Alexandre Coelho, Ronaldo M. Levy, Simone Fuji, Angélica Grigole, Elaine Amorim, Fábio A. Coró, Mayka R. Pedrão, Fabianne Garcia, Lenita Brunieri, Sueli Obara, Hélio, Rosa Maria L. Alves, Suzana Mali, Márcia Kamogae, Elisabete H. Hashimoto, Patrícia Kadozawa, Carlos J. Ono, Camilla, Érica, Lídia, Sandra Rezende, Fabrício, Ricardo, Kelly, Fernanda, Aléscio, Rafhaele, Tatiane, Thaís, Lucíola, Dani Luci, Carol, Valéria, Luciana, Maria Angela, Patrícia e aos funcionários do Depto. TAM pela alegria, companheirismo e amizade durante esses anos.

RESUMO

O milho (*Zea mays* L.) é uma cultura de interesse mundial envolvendo produção de 583 milhões de toneladas, sendo que o Brasil produz aproximadamente 7% do total. Devido as propriedades nutricionais, o milho está sujeito a diversos predadores com ênfase a insetos e fungos micotoxigênicos, destacando-se *Fusarium verticillioides* Nirenberg (*F. moniliforme* Sheldon), por ser contaminante predominante de distribuição mundial, produtor de fumonisina na micoflora. Considerando que o controle de fungos em milho seja difícil, pesquisas estratégicas tem como alvo o estudo de compostos envolvidos nos mecanismos naturais de defesa das plantas, citando-se os inibidores de amilase (IA). Esta pesquisa contribuiu com o estudo dos mecanismos naturais de defesa com ênfase a inibidores contra amilase de *F. verticillioides*, assim como de insetos predadores relevantes na agricultura, visando o melhoramento genético do milho. A triagem de inibidores de amilase (IA) contra amilase de *F. verticillioides* foi realizada em 37 híbridos. O nível de IA variou de 5,5 a 16,0 unidades inibidoras de amilase (UIA/g) por grama de milho nos híbridos MASTER e AG5011, respectivamente. O híbrido com maior atividade inibidora de amilase foi utilizado na purificação da nova proteína por precipitação fracionada com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, cromatografia de filtração em gel (Sephadex G-75), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em coluna de Superose HR 10/30 e troca aniônica em CLAE, obtendo 20,7 vezes de purificação. A massa molecular aparente de 23,8 kDa foi determinada em SDS-PAGE sob condições redutoras com pI ácido de 5,4, diferindo de outros inibidores descritos em milho (14 e 22 kDa). O IA apresentou amplo espectro de atividade, inibindo amilase salivar e pancreática humana, de fungos como *F. verticillioides* e *A. flavus*, de insetos como *A. obtectus*, *Z. subfasciatus*, *T. castaneum* e *S. cerealella*. *Fusarium* spp. foi o principal contaminante do milho (81,1% das amostras) com contagem entre $1,5 \times 10^2$ a $2,4 \times 10^6$ ufc/g de milho, e fumonisina foi detectada em 21 híbridos com concentrações de 0,05 a 2,67 μg de FB/g de milho. No entanto, a correlação entre o nível de IA nos grãos de milho com a presença de *Fusarium* spp. e fumonisina nas condições experimentais avaliadas não foi significativa. Outro IA estudado apresentou alta hidrofobicidade com massa molecular de 19,7 kDa, foi purificado de milho procedendo extração com etanol a 95%, seguida de cromatografia de troca iônica. O IA ativo contra *Fusarium verticillioides* apresentou ponto isoelétrico de 3,6, estabilidade em ampla variação de pH e temperatura, mantendo 47,6% da atividade após tratamento a 94°C por 60 min. O IA purificado apresentou alto conteúdo de valina, leucina, glicina, alanina e glutamina/ácido glutâmico, com destaque especial ao teor de valina (41,2%). O inibidor não apresentou carboidrato na estrutura molecular e requereu 30 min de pré-incubação com amilase de *F. verticillioides*, para estabilizar a complexa enzima-inibidor. O pH ótimo de interação foi 6,5 e caracterizou-se com amplo espectro de ação, incluindo desde atividade sobre amilase salivar humana, pancreática de porco, *F. verticillioides*, a insetos de interesse agrônômico (*Acanthoscelides obtectus*, *Zabrotes subfasciatus*, *Sitophilus zeamais* e *Prostephanus truncatus*). A nova proteína hidrofóbica demonstrou potencial de utilidade como marcadores moleculares de resistência fúngica, uma vez que também inibe a germinação de conídios de *F. verticillioides*, constituindo em alternativa promissora para minimizar a produção de fumonisina em milho. A comparação entre a microbiota fúngica, concentração de fumonisina e nível de IA contra amilase de *F. verticillioides* entre os 21 híbridos do grupo precoce e 16 de ciclo super precoce, não foi estatisticamente significativa

($P > 0,05$), sugerindo que maior ênfase deve ser dada às características inerentes do híbrido conforme interesse particular dos produtores, durante a escolha do ciclo a ser cultivado. Em suma, a atividade inibidora não se restringiu apenas a fungos micotoxigênicos relevantes no milho, mas também inibiu enzima de insetos de interesse agrônômico, gerando novas perspectivas no estudo desta proteína contra resistência a predadores/fitopatógenos. I.e., desenvolvimento de plantas biotecnologicamente melhoradas, com a vantagem de não inibir as amilases de origem humana, aliada a baixa atividade sobre amilase de milho, arroz e cevada.

ABSTRACT

Corn (*Zea mays* L.) is the main worldwide crop, producing 583 million tons, where Brazil produces 7% the total production with 50% destined for livestock feeding. Due the nutritional properties, the corn is attacked by several predators, with emphasis on *Fusarium verticillioides* Nirenberg (*F. moniliforme* Sheldon), which is the main contaminant producing fumonisin in corn worldwide. The fungal control in corn is difficult, and research nowadays points the insertion into the area of natural mechanisms of plant defense, where the importance of amylase inhibitors has been concerned in corn. This work contributed in the study of natural mechanism of corn defense with emphasis on inhibitor against *F. verticillioides* amylase, as the insects of economical interest in agriculture. A screening for specific amylase inhibitor levels against amylase from *F. verticillioides*, was conducted on 37 corn hybrids. The amylase inhibitor levels in these hybrids ranged from 5.5 to 16.0 amylase inhibitor units (AIU/g) per gram of corn in the MASTER and AG5011 hybrids, respectively. The hybrid with the highest content of inhibitor was used as the source of this new protein. The inhibitor was partially purified using fractional precipitation, gel filtration on Sephadex G-75 column, HPLC Superose HR 10/30 column, and HPLC anion exchange chromatography, obtaining a 20.7-fold purification. Electrophoresis after denaturing and heating under reductive conditions showed an apparent 23.8 kDa molecular weight, and an acidic isoelectric point of 5.4, which differs from previous molecular weights reported for other inhibitors present in corn seeds (14 and 22 kDa). This inhibitor showed activity against amylases from human saliva and pancreas, from the fungi *F. verticillioides*, and *A. flavus*, and from the insects: *A. obtectus*, *Z. subfasciatus*, *T. castaneum*, and *S. cerealela*. The mycoflora found in the corn grain indicated *Fusarium* sp. as the most prevalent fungi (81.1% of the samples) with a count ranging from 1.5×10^2 to 2.4×10^6 CFU/g of corn. Fumonisin were detected in 21 out of the 37 hybrids studied, ranging from 0.05 to 2.67 μg of FB/g of corn. No correlation could be established between this amylase inhibitor level in the corn seeds and the presence of *Fusarium* sp. or with the fumonisin content under the experimental conditions of the test. Another AI studied was a hydrophobic 19.7 kDa amylase inhibitor (AI) was purified from corn kernels by 95% ethanol extraction and anionic exchange chromatography. The AI has a 3.6 isoelectric point, and was very stable at different pH and high temperatures, maintaining 47.6% activity heating at 94°C for 60 min. Its amino acid analysis showed high valine, leucine, glycine, alanine and glutamic acid/glutamine, with particular high content in valine (41.2 mol %). This inhibitor is not a glycoprotein and it showed a requirement of 30 min preincubation time to stabilize the complex enzyme-inhibitor, when the amylase from *F. verticillioides* was used. The optimal pH of interaction found, was 6.5. Its wide spectrum of activity includes the following amylases: human saliva, porcine pancreas, *Fusarium verticillioides*, as well as those from some insects of agronomical importance (*Acanthoscelides obtectus*, *Zabrotes subfasciatus*, *Sitophilus zeamais* and *Prostephanus truncatus*). This novel hydrophobic protein showed potential for its possible use as molecular marker for fungi resistance, since not only inhibited the amylase from *F. verticillioides*, but it also decreased the conidia germination, representing an alternative to decrease the production of fumonisin in corn crops. The correlation between corn mycoflora, fumonisin and AI level against amylase from *F. verticillioides* was not significant ($P > 0.05$), recommending the selection of corn essentially based on producer option. Summarizing, the AI activity did not

restrict only against mycotoxigenic fungi, but it also inhibited the amylase of insect of agricultural interest, creating a new perspective for application on predators/phytopathogens. I.e., development of biotecnologically modified plants using AI without activity on human amylase, in addition to low inhibition against amylases of corn, rice and barley origin.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2- OBJETIVOS	12
3- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
4- MATERIAL E MÉTODOS	48
5- RESULTADOS E DISCUSSÕES	60
5.1 INIBIDOR DE AMILASE EM GRÃOS DE MILHO COM ATIVIDADE <i>IN VITRO</i> CONTRA AMILASE DE <i>FUSARIUM VERTICILLIOIDES</i>	62
5.2 INIBIDOR DE AMILASE HIDROFÓBICO DE MILHO (<i>ZEAMAYS</i>) ATIVO CONTRA AMILASE DE <i>FUSARIUM VERTICILLIOIDES</i>	81
5.3 CORRELAÇÃO ENTRE MICROBIÓTA FÚNGICA, FUMONISINA E NÍVEL DE INIBIDORES DE AMILASE NOS HÍBRIDOS DE MILHO DE CICLO PRECOCE E SUPER PRECOCE.....	100
6 CONCLUSÃO	113
REFERÊNCIAS	114
ANEXOS	135
Amylase inhibitor present in corn seeds active <i>in vitro</i> against amylase from <i>Fusarium verticillioides</i>	136
Characterization of an hydrophobic amylase inhibitor from corn (<i>Zea mays</i>) seeds with activity against amylase from <i>Fusarium verticillioides</i>	153

1 INTRODUÇÃO

O milho é uma cultura mundial com produção anual de 583 milhões de toneladas, onde o Brasil participa com 7% do total e o Estado do Paraná com 29% da safra.

As propriedades nutritivas o elegeram entre os principais constituintes de ração animal (60% da composição), assim como base alimentar em diversos países. Não obstante, este fator torna-o também alvo vulnerável de deterioração, com destaque em *Fusarium verticillioides* Nirenberg (*F. moniliforme* Sheldon), que além de predominar na fitopatologia de milho, produz micotoxinas representadas principalmente pela fumonisina (FB). Esta toxina é produzida no estágio de pré-armazenagem, não sendo degradada pelo processamento industrial.

A deterioração fúngica no estágio de pré-colheita/armazenagem oculta os perigos potenciais de micotoxinas aliados às perdas no rendimento agrícola, qualidade sanitária e valor nutricional, estendendo o prejuízo econômico no percurso de toda cadeia alimentar. Salienta-se a importância de micotoxinas entre as barreiras fitossanitárias imprescindíveis na comercialização de produtos agrícolas no mundo globalizado.

Diante dessa realidade, o desenvolvimento de híbridos resistentes à infecção fúngica/micotoxinas torna-se assunto indiscutível. Os inibidores enzimáticos, com ênfase em inibidores de amilase (IA), amplamente estudados entre os mecanismos naturais de defesa de plantas contra insetos predadores, apresentam também atividade antifúngica. Todavia, o estudo desta classe protéica na resistência contra fungos micotoxigênicos é recente e pouco elucidado, devendo-se investigar a potencialidade de aplicação no controle fúngico e subsequente produção de fumonisina no milho.

Esta pesquisa pretendeu contribuir com o estudo sobre fatores de defesa natural de milho, centrada na purificação e atuação de IA contra fungos potencialmente micotoxigênicos, com ênfase em *F. verticillioides*. O direcionamento do melhoramento genético de milho com componentes naturais de defesa minimizaria a contaminação fúngica e produção de micotoxinas.

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivo Geral

A pesquisa pretendeu contribuir com o estudo dos mecanismos naturais de defesa de milho com ênfase nos inibidores contra amilase de *F. verticillioides*, assim como a defesa contra insetos predadores relevantes na agricultura, visando o melhoramento genético do milho.

2.2- Objetivos Específicos

- Identificar a presença de IA em diferentes híbridos de milho de ciclo precoce e super precoce, assim como purificar e caracterizar os IA presentes no híbrido que contém o maior nível de atividade;
- Avaliar e comparar a microbiota fúngica em diferentes híbridos de milho de ciclo precoce e super precoce;
- Determinar e comparar o nível de fumonisina nos diferentes híbridos de milho de ciclo precoce e super precoce;
- Comparar o nível de IA entre o grupo de híbridos precoce e super precoce;
- Avaliar a atividade antifúngica do IA.

3- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1- Milho

O milho é uma monocotiledônea de distribuição mundial pertencente à família das gramíneas (*Poaceae*), tribo *Maydeae*, gênero *Zea*, cientificamente denominado de *Zea mays* L. (FANCELLI, 1983). Classificado como cereal de extrema importância na alimentação humana e animal, apresenta alta eficiência na produção de alimentos com qualidade nutricional, justificando sua introdução como ingrediente nos mais diversos produtos derivados. A tribo *Maydeae* compreende sete gêneros, sendo cinco asiáticos e dois americanos, onde *Zea mays* pertence ao último grupo. Este se subdivide em cinco grupos, denominados de amiláceo, dentado, duro, pipoca e doce (MANGELSDORF, 1974).

PIPERNO & FLANNERY (2001) demonstraram que o espécime mais antigo, proveniente de Guilá Naquitz, Estado de Oaxaca-México, tem aproximadamente 6.250 anos (Figura 1). A domesticação do milho ocorreu entre 5.000 a 10.000 anos no México, provavelmente no Vale de Oaxaca (Estado de Oaxaca) e Vale de Balsas (Estados de Michoacán e Guerrero), seguindo-se para Tehuacán (Estado de Puebla) e Estado de Tamaulipas, atingindo o sudoeste dos Estados Unidos, conforme Figura 1 (WANG et al., 1999; PIPERNO, 2001; SMITH, 2001). Posteriormente difundiu-se para toda a América, permitindo expansão para outros continentes (WATSON & RAMSTAD, 1987).

As teorias sugerem que o milho seja originário do teosinte, envolvendo as espécies *Z. mays* subespécies *mexicana* e *parviglumis* (SZABÓ & BURR, 1996). Recentes estudos genéticos, citológicos e enzimáticos acumulados apontaram a origem tendendo para *Z. mays* subespécie *parviglumis*, proveniente do Vale de Balsas no Estado de Michoacán e Guerrero-México (PIPERNO & FLANNERY, 2001).



Figura 1: Mapa do México localizando a origem e rota de disseminação do milho (*Zea mays*). Fonte: PIPERNO (2001).

Embora citologicamente não haja diferença entre milho e teosinte, quatro diferenças morfológicas marcantes localizam-se na inflorescência feminina (KATO, 1976; SZABÓ & BURR, 1996; WANG et al., 1999). A característica mais evidente é a inflorescência simples com a presença de envoltório em cada grão formando espiga frágil com dupla fileira de grãos no teosinte, comparada à inflorescência aos pares, formando espiga com múltipla fileira, empalhada e resistente no milho (Figura 2).

O milho mantém aproximadamente 70% da diversidade genética do progenitor (HILTON & GAUT, 1998; EYRE-WALKER et al., 1998). Os poucos genes que controlam a diferença majoritária entre o milho e o teosinte concentram-se em cinco genes, denominados de *pd*, *dis 1*, *tr1*, *inc 1e tga 1* (BEADLE, 1980; SZABÓ & BURR, 1996).

3.2- Importância

O milho é o cereal mais cultivado, produzido em 77, países incluindo 53 em desenvolvimento, devido a facilidade de adaptação, i.e., permite cultivo desde regiões de clima tropical a temperado (0 a 55° de latitude norte e sul) e ao nível do mar até altitudes de 3.600 m (DOWSWELL et al., 1996). A produção anual está estimada em 583 milhões de toneladas (ton) e concentra-se nos Estados Unidos da América (EUA) com 264 milhões de ton, que consomem 211 milhões e exportam 64 milhões de ton liderando as exportações mundiais, seguido da Argentina e África do Sul. Em contrapartida, a União Européia, Japão, México, Sudeste Asiático e Coréia do Sul são os maiores importadores, somando-se 50 milhões de ton (DEPARTAMENTO DE AGRICULTURA DOS EUA, out 2001).

O milho brasileiro é cultivado em todo país, correspondendo a 7% da produção mundial com área de 13 milhões de hectares (ha). A produtividade média atingiu 3 ton/ha e gerou 41 milhões de ton no ano de 2001, com 36 milhões destinados ao consumo; o excedente de 6 milhões de ton destinou-se a exportação (3 milhões) e armazenagem (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, jul/2001).

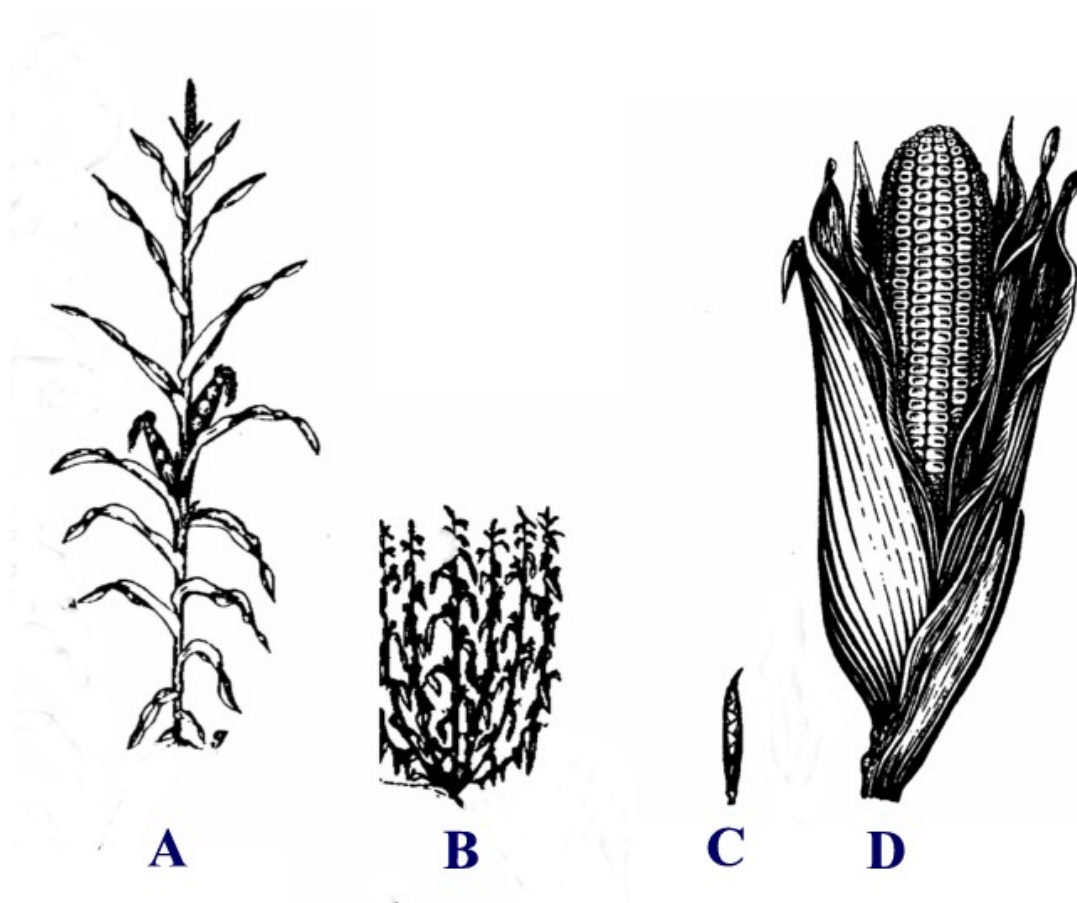


Figura 2: Principais diferenças entre o milho e o teosinte. **A.** inflorescência aos pares no milho. **B.** inflorescência simples no teosinte. **C.** espiga de teosinte com envoltório individual nos grãos e dupla fileira de grãos. **D.** espiga de milho com empalhamento e múltipla fileira de grãos. Fonte: GALINAT (1992).

A produção brasileira apresenta-se em pleno desenvolvimento e expansão, com o incremento nos índices de produtividade refletindo diretamente no rendimento total, dobrando nos últimos 11 anos. Nas safras 1992/93, 1993/94 e 1994/95 o Brasil produziu respectivamente 29,9; 29,6 e 36,1 milhões de ton, comparado a 41 milhões de ton na safra 2001. A região Norte produz 1,06 milhões de ton (produtividade média de 1,6 ton/ha), Nordeste 1,8 milhões de ton (produtividade de 0,7 ton/ha), Sudeste 8,1 milhões de ton (3,2 ton/ha) e Centro-Oeste 8,2 milhões de ton (3,7 ton/ha). Estes valores distanciam-se num fator de 7 a 20 vezes da região Sul, contemplada com produção de 21,8 milhões de ton e produtividade de 4,1 ton/ha (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, jul/2001).

O Estado do Paraná é o maior produtor nacional produzindo 8,3, 7,0 e 11,9 milhões de ton nos últimos 3 anos (1999 a 2001), correspondente a 26, 22 e 29%, respectivamente, da produção nacional (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, jul/2001).

A importância sócio-econômica do milho como ingrediente essencial da dieta evidencia-se pela participação em mais de 500 produtos alimentícios. O milho sobressai pela maior diversidade aplicativa em relação a outros cereais, estendendo desde planta forrageira/ração a alimento humano. Em adição, a distribuição global, baixo custo, elevado número de cultivares e ampla propriedade biológica/industrial geram centenas de derivados. Cerca de 66% da produção mundial destina-se à alimentação animal, 20% ao consumo humano direto e 8% à indústria, e o restante (6%) constitui a somatória de perdas e produção de sementes (DOWSWELL et al., 1996). No Brasil, 15% da safra 1996/97 destinou-se ao consumo industrial e 42% ao arraçamento animal (ACOMPANHAMENTO DA SITUAÇÃO AGROPECUÁRIA NO PARANÁ, fev/97).

Salienta-se que nos países desenvolvidos, o consumo per capita anual de grãos atinge aproximadamente 1.000 kg, sendo 70 kg consumidos diretamente e 930 kg indiretamente na forma de ração para a produção de carne e leite. Nos países em desenvolvimento da Ásia, o consumo per capita de 150 kg é quase na totalidade ingerido sob forma de grãos *in natura* (DOWSWELL et al., 1996).

As propriedades nutritivas ricas em carboidratos (71,7% bs), proteínas (9,5% bs) e lipídios (4,3% bs) conferem qualidade apreciável a esta matéria-prima. Aliadas à presença de micronutrientes, as proteínas de considerável valor nutricional justificam a aplicação como principal ingrediente nas rações animais, além de contribuição à culinária humana (MUNKVOLD & DESJARDINS, 1997).

O milho constitui o principal alimento em diversos países da África, Ásia, América Central, América do Norte e América do Sul. Na América do Norte e Europa, o milho destina-se a produção de alimentos e bebidas, incluindo cereais matinais, “snacks” e cerveja. Nos últimos anos, a forte corrente migratória de mexicanos aos EUA originou uma nova indústria, ampliando a variedade de alimentos tipo mexicano no mercado norte americano (MUNKVOLD & DESJARDINS, 1997).

Não obstante, essa versatilidade no uso também se traduz em substrato adequado a microrganismos indesejáveis, capaz de ocultar os riscos oriundos de metabólitos secundários e tóxicos produzidos pelos fungos da microbiota do cereal.

3.3- Contaminação Fúngica e de Micotoxinas

O requerimento de água divide os fungos presentes nos grãos em dois grupos ecológicos, denominados de fungos de campo e armazenagem (CHRISTENSEN & KAUFMANN, 1974; CHRISTENSEN & SAUER, 1982). Os fungos de campo invadem os grãos no estágio de pré-colheita, ou nas espigas pós-colheita antes do debulhamento. O grupo requer alto teor de umidade (20-21%) e inclui os gêneros *Alternaria*, *Cladosporium*, *Fusarium* e *Helminthosporium*. Os fungos de armazenagem requerem teor de umidade na faixa de 16% para a invasão micelial e compreendem espécies do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* (WATSON & RAMSTAD, 1987).

Determinados fungos desenvolvem-se nos grãos imaturo ou maduro, desde que seja próximo ao período de pós-colheita ou armazenagem, vindo a constituir o terceiro grupo intermediário, que compreende os gêneros *Epicoccum*, *Nigrospora* e *Papularia* (KULIK & JUSTICE, 1967; MARSH & PAYNE, 1984). Segundo HILL et al. (1985), esta classificação é inadequada nos trópicos úmidos, já que *Aspergillus* e *Penicillium* também podem desenvolver-se ainda no campo e produzir micotoxinas no estágio de pré-colheita.

As propriedades intrínsecas associam o milho a fatores biológicos de ataque fitopatogênicos e/ou de deterioração, com destaque especial a fungos micotoxigênicos. Salienta-se que *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. oxysporum*, *F. subglutinans*, *F. graminearum*, *F. solani*, *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *Colletotricum graminicola*, *Helminthosporium maydis*, *Stenocarpella maydis*, *S. macrospora*, *Diplodia* spp., *Penicillium* spp., *Alternaria* spp., *Cladosporium* spp., *Epicoccum* spp., *Nigrospora* spp., *Trichoderma* spp. e *Acremonium* spp. constituem fungos mais frequentes na microbiota do milho (GONZÁLEZ et al., 1995; JULIAN et al., 1995; MACDONALD & CHAPMANN, 1997; KEDERA et al., 1999; ONO et al., 1999; DESJARDINS et al., 2000; KPODO et al., 2000; ORSI et al., 2000).

F. verticillioides Nirenberg (*F. moniliforme* Sheldon) e *F. proliferatum* são fungos de distribuição mundial, com alta ocorrência e infecção atingindo > 90% de milho, sendo que 90% das linhagens de *F. verticillioides* isoladas produzem fumonisina (BACON & NELSON, 1994). Esta frequência associada a concentração elevada de fumonisina causa prejuízo na suinocultura, avicultura, equinocultura e risco à saúde humana. THIEL et al. (1991) analisaram a toxigenicidade de *Fusarium* spp. obtidos de diferentes localidades, com efeito comprovado de intoxicação em cavalos, aves e suínos. A produção de fumonisina por *F. verticillioides* em meio preparado com milho variou de 85 a 7.100 µg/g (FB₁) e 0 a 3.000 µg/g (FB₂), enquanto que *F. proliferatum* produziu 20 a 1.130 µg/g (FB₁) e 65 a 450 µg/g (FB₂). Os mesmos autores relataram pela primeira vez a toxicidade de *F. nygamai*, com produtividade de 605 µg/g (FB₁) e 530 µg/g (FB₂).

Os dois principais danos causados pelos fungos no milho são (i), perda de peso/descoloração/necrose dos grãos e (ii), produção de micotoxinas, que consiste no fator decisivo na atual liberação de produtos agrícolas no comércio internacional (JULIAN et al., 1995).

Relatos recentes sobre a incidência de fungos e as respectivas micotoxinas evidenciam constante perigo a humanos e animais, requerendo medidas de controle eficazes, deflagrado principalmente pelos países fornecedores de produtos agrícolas. Atualmente, o Brasil foi inserido no quadro de exportadores, porém apresenta deficiência no sistema de monitoramento e controle de micotoxinas (CONAB, jul/2001).

Nas variedades brasileiras, deve-se enfatizar a predominância de contaminação por *F. verticillioides*, atingindo positividade de até 90,2% (FB₁) e 97,4% (FB₂) no Estado de São Paulo (ORSI et al., 2000) e de 100% (FB₁) e 97,7% (FB₂) no Estado do Paraná (HIROOKA et al., 1996; ONO et al., 1999). Os níveis mais elevados de fumonisinas com 0,87 a 49,31 µg/g (FB₁) e 1,96 a 129,16 µg/g (FB₂) foram detectados em São Paulo (ORSI et al., 2000), em relação ao valor máximo detectado de 10,59 µg/g (FB₁) e 10,31 µg/g (FB₂) no Paraná (HIROOKA et al., 1996). Procedendo-se um estudo detalhado sobre os níveis de contaminação em 3 diferentes regiões no Estado do Paraná, maiores concentrações ocorreram nas amostras de milho provenientes da Região Norte com níveis de 0,37 a 14,36 µg/g (FB₁) e 0,20 a 6,92 µg/g (FB₂), seguida da Região Centro-Oeste com 0,09 a 10,67 µg/g (FB₁) e 0,08 a 5,17 µg/g (FB₂); menor concentração ocorreu na Região Centro-Sul (0,07 a 2,52 µg/g de FB₁ e 0,11 a 1,14 µg/g de FB₂) (ONO et al., 1999).

Os principais países exportadores de milho apresentaram perfil semelhante. MURPHY et al. (1993) monitorando FB₁, FB₂ e FB₃ em milho proveniente de Iowa, Wisconsin e Illinois durante 4 anos (1988-1991) observaram oscilações nas concentrações de FB₁ (0 a 37,9 µg/g), FB₂ (0 a 123,3 µg/g) e FB₃ (0 a 4.0 µg/g), com maiores níveis na safra 1989. Salienta-se que nesta safra o “National Service Laboratories” detectou numerosos relatos de leucoencefalomalácia equina e síndrome de edema pulmonar em suínos nos Estados de Arizona e Mayland, EUA.

ROSS et al. (1991) analisaram ração animal envolvida em intoxicação em Iowa, Illinois, Georgia, Carolina do Norte, Indiana, Nova York, Louisiana, Texas, Arizona, Mississippi, Virginia, Maryland e Delaware e detectaram níveis de FB₁ de até 330 µg/g. MUNKVOLD & DESJARDINS (1997) detectaram até 330 µg/g (FB₁) em rações provenientes dos EUA, sendo elevados níveis também detectados em milho da China (155 µg/g de FB) e África do Sul (118 µg/g de FB).

GONZÁLEZ et al. (1995), preocupados com micotoxinas na Argentina, estudaram a microbiota interna e externa de 178 amostras de milho das regiões produtoras. *Fusarium* spp. predominou nas sementes, seguido de *Penicillium* spp., *Alternaria* spp., *Aspergillus* spp., *Cladosporium* spp., *Epicoccum* spp., *Nigrospora* spp. e *Trichoderma* spp. Entre os integrantes internos de sementes prevaleceram *F. verticillioides* e *F. proliferatum*, enquanto que na microbiota externa predominou *Penicillium* spp.

SYDENHAM et al. (1993) analisando 17 amostras de milho de dois municípios argentinos detectaram fumonisina total em níveis de 1,59 a 9,99 µg/g, sendo 1,11 a 6,70 µg/g (FB₁), 0,33 a 2,68 µg/g (FB₂) e 0,11 a 0,86 µg/g (FB₃). O principal contaminante consistiu de *F. verticillioides*, com todos os 12 isolados produzindo 50 a 8.160 µg/g (FB₁), 5 a 1.380 µg/g (FB₂) e 15 a 1.430 µg/g (FB₃). Além desses, todos os três isolados de *F. proliferatum* produziram fumonisina. MAGNOLI et al. (1999) obtiveram maior frequência de *F. verticillioides* (60,7%), seguido de *F. nygamai* (35,4%) no milho argentino, sendo que todos os isolados de *F. verticillioides*, *F. nygamai* e *F. proliferatum* produziram FB₁ (5,4 a 3.991 µg/g), FB₂ (1,01 a 198 µg/g) e FB₃ (0,4 a 765 µg/g).

Nos países africanos constituídos de Botswana, Moçambique, África do Sul, Malawi, Zâmbia, Zimbabue, Kenia, Tanzânia e Uganda, fumonisina ocorreu na frequência de 92,5% e nas concentrações de 0,02 a 2,74 µg/g, com FB₁ variando de 0,02 a 1,91 µg/g (DOKO et al., 1996). As maiores concentrações foram detectadas em amostras provenientes de Zimbabue, embora todas as amostras de Botswana, África do Sul, Moçambique e Zâmbia

apresentaram-se positivas para fumonisina. Avaliações posteriores realizadas em Botswana (SIAME et al., 1998), Kenia (KEDERA et al., 1999), Zimbabue (MUBATANHEMA et al., 1999), Nepal (DESJARDINS et al., 2000) e em Gana (KPODO et al., 2000) confirmaram a ocorrência e níveis de fumonisina semelhantes.

Na Comunidade Européia também encontraram situação semelhante, monitorando milho proveniente da Itália, Croácia, Polônia, Portugal, Romênia (DOKO et al., 1995). DOKO et al. (1995) dividiram os países em dois grupos baseados na incidência/contaminação. No primeiro agruparam-se aqueles com alto índice de contaminação e incluíram Itália e Portugal com incidência de 100% de *F. verticillioides* e níveis de FB₁ variando de 1,71 a 4,45 µg/g no milho. No segundo grupo incluíram países com *F. verticillioides* em 50% das amostras e níveis de FB₁ situado em valores ≤ 0,07 µg/g.

VISCONTI & DOKO (1994) examinaram 58 isolados de *F. verticillioides* e *F. subglutinans* provenientes de milho (41), sorgo (4), trigo (6), cevada (5) e rações (2) e um isolado de *F. proliferatum* de países europeus. Todos os isolados de *F. verticillioides* e *F. proliferatum* produziram FB₁ (0,7 a 4.100 µg/g), porém não se detectaram concentrações significantes de FB₁ em *F. subglutinans*. Os isolados de milho produziram maiores concentrações de FB₁ (1.259 µg/g), em relação aos de trigo (769 µg/g) e de cevada (320 µg/g).

LOGRIECO et al. (1995) analisaram 42 amostras de milho coletadas de diferentes regiões da Itália no período 1992/93 e obtiveram 34% de *F. proliferatum* e 54% de *F. verticillioides*. Os isolados de *F. proliferatum* produziram FB₁ em concentrações entre 75 e 2.250 µg/g, sugerindo maior significância desta espécie associada a micotoxinas em milho. Além destas espécies, *F. subglutinans* e *F. antophilum* pertencentes à secção Liseola produziram FB₁ e FB₂ (SALA et al., 1994).

CASTELLÁ et al. (1999) detectaram *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. e *Fusarium* spp. em milho, produtos de milho e outros cereais da Espanha. *F. verticillioides* ocorreu em maior frequência (47,4%), sendo maiores as concentrações de fumonisina detectada no milho.

JULIAN et al. (1995) avaliaram amostras de milho em Honduras e obtiveram resultados similares a GONZÁLEZ et al. (1995). *F. verticillioides* foi o maior integrante na microflora, com FB₁ variando entre 0,07 a 6,55 µg/g, sendo que amostras positivas para *A. flavus* continham 0,01 a 0,13 µg/g de aflatoxina.

Em suma, a ocorrência de *F. verticillioides* e fumonisina no milho abrange os cinco continentes, constatando-se também no Canadá (MILLER et al., 1995), Venezuela (MEDINA-MARTÍNEZ & MARTÍNEZ, 2000), Uruguai (PIÑEIRO et al., 1997), Índia (MACDONALD & CHAPMAN, 1997; SHETTY & BHAT, 1997; JANARDHANA et al., 1999; JINDAL et al., 1999), China (GROVES et al., 1999), Coréia (SEO & LEE, 1999), Taiwan (TSENG & LIU, 1999) e Irã (SHEPHARD et al., 2000).

3.4- Vias de Contaminação

F. verticillioides (fase anamórfica) ou *Giberella fujikuroi* (fase teleomórfica) foi descrito e relacionado com patologia animal em 1904 (SHELDON, 1904 apud MUNKVOLD & DESJARDINS, 1997). *G. fujikuroi* consiste de sete espécies biológicas designadas de letras A a G, sendo que a maioria corresponde a espécies da seção Liseola, onde *F. verticillioides* pertence ao grupo A (LESLIE, 1996). As espécies pertencentes aos grupos A e D produzem micotoxinas, com o grupo A englobando aproximadamente 90% das espécies de *Fusarium* endofíticas em milho (LESLIE, 1996).

A ampla distribuição geográfica de *F. verticillioides* se estende desde regiões de clima temperado e tropical úmido a subtropical, causando podridão de raiz, colmo (Figura 3A), espiga (Figura 3B) e deterioração de grãos armazenados. A contaminação é uma questão preocupante devido à perda de qualidade, agravada pela ocorrência de fumonisina em infecções assintomáticas (NELSON et al., 1983). *F. verticillioides* causa doença em todas as fases de desenvolvimento do milho, seja nas raízes, colmo e grãos, cuja predominância de infecção assintomática permite disseminação total na planta (MUNKVOLD & DESJARDINS, 1997).

Embora a colonização fúngica de plantas ocorra facilmente através de aberturas naturais ou regiões não celulolíticas, a estratégia de invasão consiste na secreção de enzimas hidrolíticas com ênfase em quitinases, celulasas, pectinases e proteases. Os três principais grupos enzimáticos exigidos na hidrólise de celulose durante a invasão são endoglucanases, exoglucanases e β -glucosidases (KNOGGE, 1996).

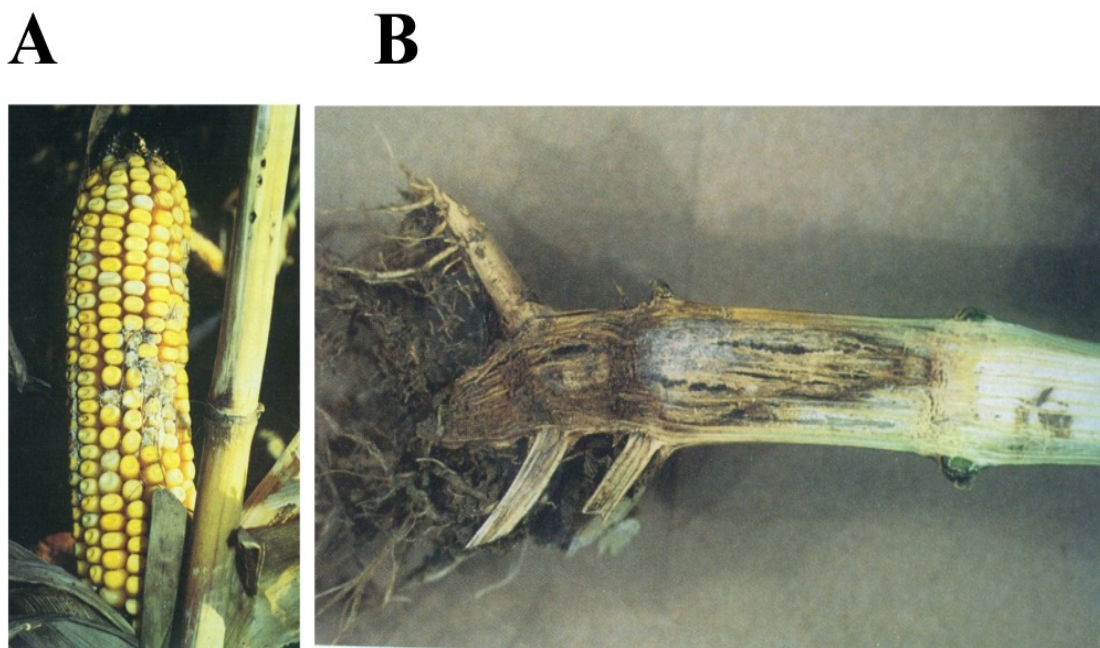


Figura 3: Podridão causada por *F. verticillioides*. **A.** podridão na espiga. **B.** Podridão no colmo. Fonte: MUNKVOLD & DESJARDINS (1997).

Durante a colonização, *F. verticillioides* produz α -D-galactosidase, β -D-glucosidase e N-acetil- β -D-glucosamidase, cuja atividade é complementada por mais quatro enzimas, excretadas em menor quantidade: β -D-fucosidase, α -D-manosidase, β -D-xilosidase e N-acetil- α -D-glucosamidase (MARÍN et al., 1998).

F. verticillioides é endofítico para o milho, penetrando nos grãos através do ponto de inserção da semente com a espiga (CHAMBERLAIN et al., 1993), alojando-se abaixo do pericarpo e prosseguindo a disseminação pela semente (BULLERMAN & TSAI, 1994).

O ciclo de infecção/doença de *F. verticillioides* é um sistema complexo, associado com todas as fases do desenvolvimento. A fusariose parece iniciar com a permanência do fungo nos resíduos de colheitas anteriores, que prolongam a sobrevivência de hifas e contaminam as sementes, seguida de disseminação sistêmica ao colmo e espiga. Embora ainda não seja confirmado, outro mecanismo proposto seria o desenvolvimento dos esporos durante a germinação, seguida de disseminação total (MUNKVOLD & DESJARDINS, 1997).

Outra via de contaminação consiste, também, na disseminação de macro e microconídeos pelo ar ou gotículas de chuva, atingindo diretamente o tecido vegetal,

principalmente o estigma. A transmissão por insetos integra o vetor com injúria à planta, estabelecendo local adequado para a instalação/germinação de conídeos disseminados pelo ar ou chuva (Figura 4) (MUNKVOLD & DESJARDINS, 1997).

MUNKVOLD et al. (1997), investigando as prováveis vias de invasão com sementes pré-inoculadas, detectaram transmissão de 10% (infectividade de 0 a 70%), para as espigas da nova planta. Outrossim, os resultados indicaram efetividade com 100% de contaminação utilizando vias baseadas na invasão pelo estigma, evidenciando que *F. verticillioides* introduzidos por esta via podem prosseguir sistemicamente para a geração subsequente.

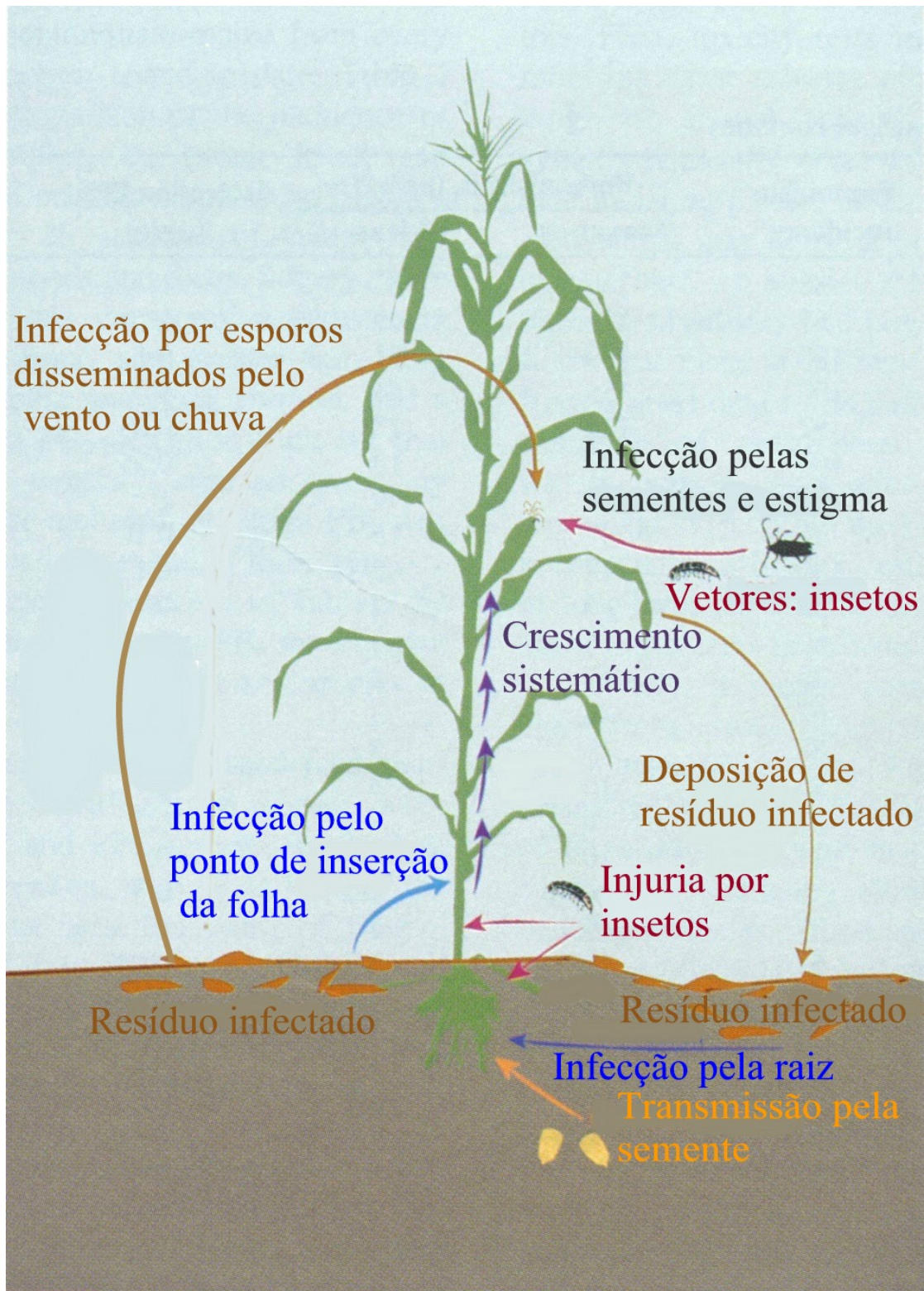


Figura 4: Ciclo da fusariose em milho com diferentes vias de infecção, destacando-se a infecção pelos grãos, estigma e injúria por insetos. Fonte: MUNKVOLD & DESJARDINS (1997).

3.5- Condição de Crescimento

A germinação dos conídios de *F. verticillioides* é influenciada pela atividade de água (a_w), temperatura e pH (MARÍN et al., 1995; MARÍN et al., 1996). Pesquisas estabeleceram a temperatura ótima do crescimento de *F. verticillioides* entre 22,5 e 27,5°C, com máxima entre 32 e 37°C e mínima entre 2,5 e 5,0°C (BACON & NELSON, 1994). Todavia, MARÍN et al. (1995) obtiveram desenvolvimento de *F. verticillioides* e *F. proliferatum* a 40°C, em $a_w > 0,94$. Nas temperaturas de 25, 30 e 40°C, estes cresceram em meios de cultivo com $a_w 0,90$, aumentando o crescimento com o aumento da a_w para 0,98. O crescimento máximo ocorreu em pH 7,0 (*F. verticillioides*) e 5,5 (*F. proliferatum*). Analisando a interação a_w /temperatura/pH, o crescimento máximo a 20, 25 e 30°C ocorreu em $a_w 0,994-0,980$ a pH 7, não havendo diferenças nas condições de pH e temperatura em $a_w 0,96$, porém $a_w 0,92$ alterou as condições ótimas de pH (5,5) e temperatura (30°C). Os conídios de *F. verticillioides* germinaram entre 5-37°C em $a_w > 0,88$, cujo valor elevou-se com a queda de temperatura e a germinação deixou de ocorrer em temperaturas $> 42^\circ\text{C}$ (MARÍN et al., 1996).

O milho armazenado com umidade de 18,4 a 23% forneceu condições ótimas para o crescimento de *F. verticillioides* (BACON & NELSON, 1994). A porcentagem de grãos infectados aumentou significativamente em milho colhido com umidade inicial de 12,4% e armazenados por 8 meses (umidade final, 13,7%). A constatação de crescimento durante a armazenagem indicou provável produção de micotoxinas no período (BACON & NELSON, 1994). Não obstante, a competição entre os fungos da microflora diminuiu a colonização de *F. verticillioides* na estocagem em diferentes temperaturas e a_w , devendo-se considerar o efeito de interação microbiana.

3.6- Fumonisin

Micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos, relevantes devido a bioatividade associada a efeitos tóxicos em humanos, animais e plantas (BENNETT & RICHARD, 1996; RITIENI et al., 1997; PLACINTA et al., 1999).

A fumonisina é um grupo de micotoxinas descoberto em 1988 (BEZUIDENHOUT et al., 1988), com produção constatada em *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. nygamai*, *F. anthophilum* e *F. napiforme* (NELSON et al., 1993). *F. verticillioides* e *F. proliferatum* são os principais produtores, enquanto que *F. subglutinans*, o fungo frequente em condições climáticas similares, não produz fumonisina ou produz baixo nível sob determinadas condições (LESLIE et al., 1992).

A estrutura química da fumonisina consiste de um diéster de propano-1,2,3-ácido tricarbaminas e 2-acetilamina ou 2-amino-12,16-dimetil-3,5,10,14,15-pentahidroxiicosano, sendo que os grupos hidróxi dos carbonos 14 e 15 encontram-se esterificados com o carbóxi terminal do ácido tricarbálico (Figura 5) (BEZUIDENHOUT et al., 1988). As quatro principais categorias, denominadas de fumonisina A, B, C e P, são compostas por FA₁, FA₂, FA₃, FAK₁; FB₁, FB₂, FB₃, FB₄; FC₁, FC₂, FC₃, FC₄; FP₁, FP₂ e FP₃ (MUSSER & PLATTNER, 1997). Além destes 15 análogos, existem metabólitos adicionais pertencentes ao grupo, porém de menor importância (IPCS, 2000). As FB₁, FB₂ e FB₃ ocorrem como contaminantes naturais em milho, contrastando-se com os análogos derivados, que não têm sido naturalmente detectados (MURPHY et al., 1993).

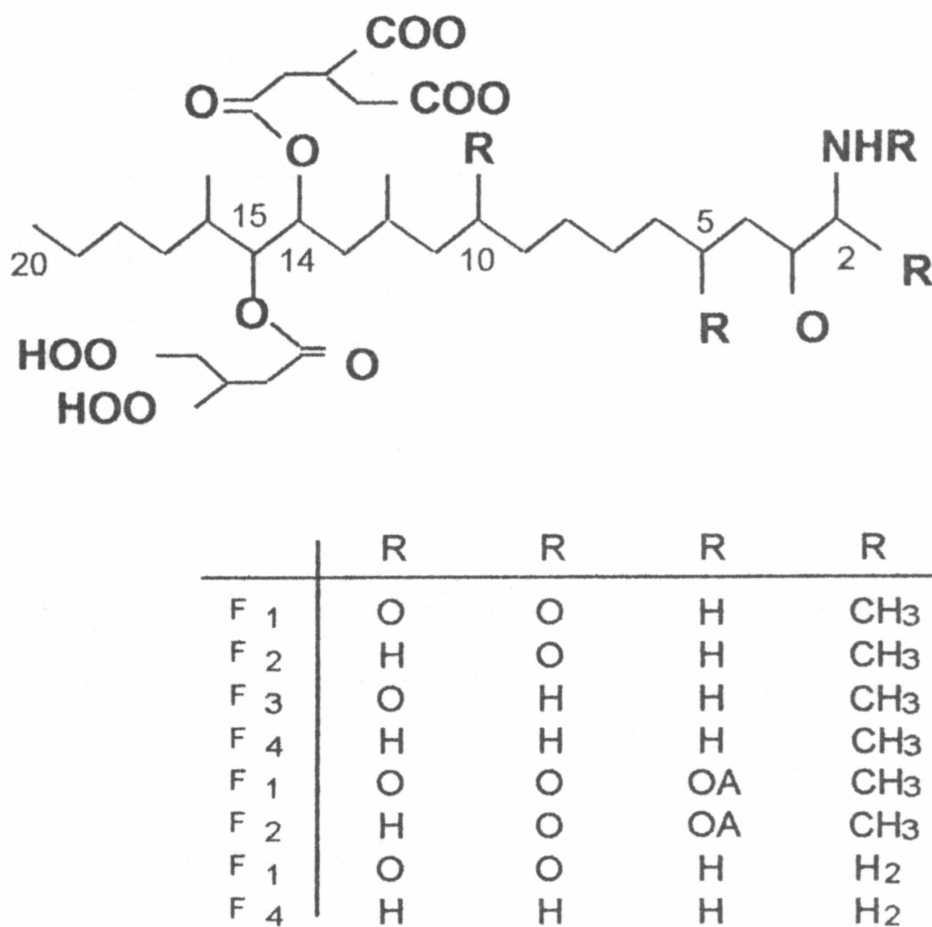


Figura 5: Estrutura das fumonisinas. Fonte: SYDENHAM & SHEPHARD (1996).

O estudo genético determinou três loci relacionados com a síntese de fumonisina em *F. verticillioides*, denominados de *fum1*, responsável pelo controle da capacidade produtiva de toxina, enquanto que *fum2* e *fum3* controlariam a hidroxilação nos C-10 e C-5, respectivamente (DESJARDINS et al., 1995). Provavelmente a fumonisina é sintetizada pela rota metabólica similar a esfingosina, iniciando-se com a condensação de um aminoácido com acil-CoA, catalisada pela serina palmitoiltransferase. Estudos com isótopos estáveis indicaram a incorporação direta de alanina, que constituiria no precursor biossintético dos C-1 e C-2 (BRANHAM & PLATTNER, 1993; BLACKWELL et al., 1994; PLATTNER & BRANHAM, 1994). Os carbonos C-3 ao C-20 poderiam derivar de acetato pela via ácido graxo sintetase (BLACKWELL et al., 1994), enquanto que o grupo hidroxila do C-4 poderia

advir de uma molécula de hidrogênio dependente de hidroxilação (KULMACZ & SCHOEPFER, 1978). A conversão de ácido graxo a FB₄ resultaria de oxigenação nos C-14 e C-15; a oxigenação subsequente nos C-5 e C-10 produziria FB₃, FB₂ e FB₁, deduzindo-se que FB₄, FB₃ e FB₂ sejam intermediários na síntese de FB₁.

3.7- Patogenia

A fumonisina causa perdas econômicas na avicultura, suinocultura e equinocultura, além de provável dano à saúde humana (NORRED & VOSS, 1994). Os ensaios biológicos demonstraram alta toxicidade da FB₁, estrutura hidrolisada ou cadeias N-acetiladas (FAO/WHO, 2001).

Das hipóteses propostas para o mecanismo de ação da fumonisina na toxicose animal, dois envolvem inibição na fase inicial do metabolismo lipídico. O primeiro envolve a inibição do metabolismo de esfingolípídios (Figura 6), i.e., inibição de ceramida sintetase, também denominada esfinganina ou esfingosina N-acil transferase (FAO/WHO, 2001). A semelhança estrutural da fumonisina com a esfinganina e esfingosina resulta na inibição competitiva, com toxicidez resultante do aumento destes precursores e diminuição de esfingolípídios, induzindo inibição metabólica em vários tecidos (GELDERBLOM et al., 1992; RILEY et al., 1993). O segundo mecanismo proposto envolve inibição do metabolismo de ácidos graxos e glicerofosfolípídios (FAO/WHO, 2001).

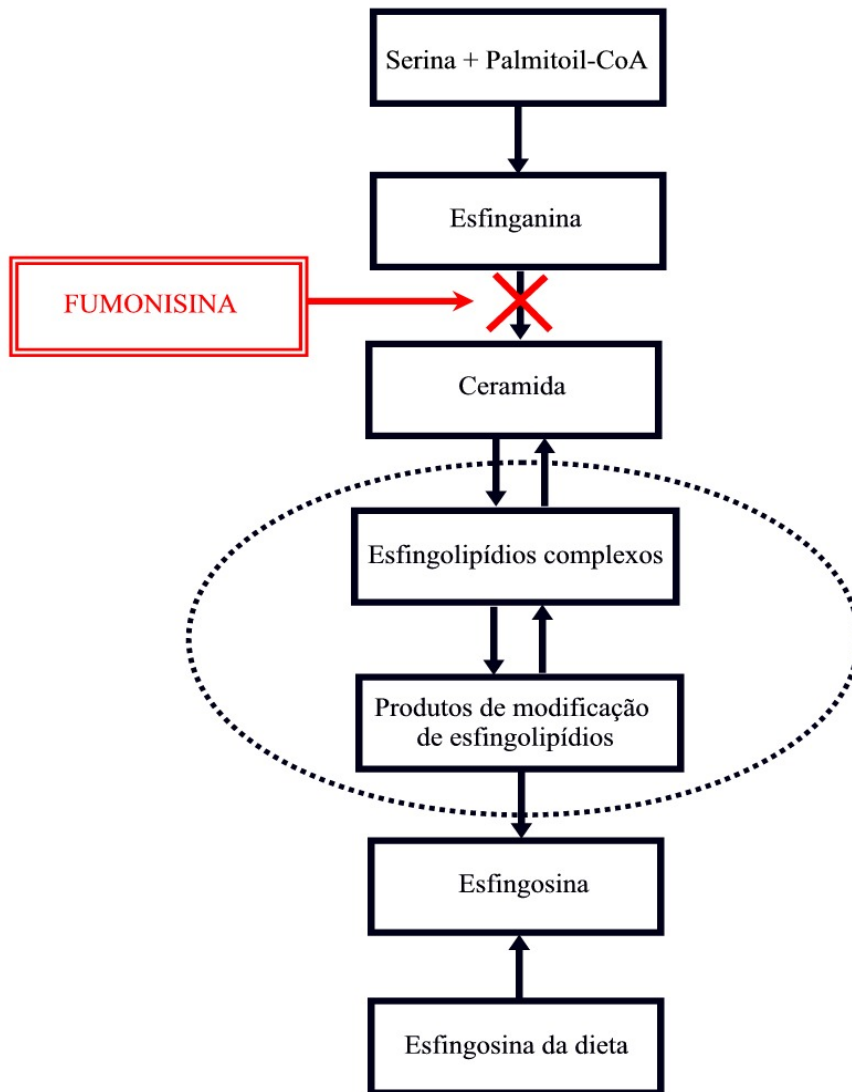


Figura 6: Mecanismo de ação da fumonisina com inibição do metabolismo de esfingolípídios. Fonte: RILEY et al. (1994).

A fumonisina também atua nos sítios de regulação celular, aparentemente independentes da inibição do metabolismo lipídico, alterando proliferação e comunicação celular, adesão, apoptose, indução de estresse oxidativo e modulação de expressão gênica (ABADO-BECOGNEE et al., 1998; MOBIO et al., 2000).

Em equinos, a fumonisina causa leucoencefalomalácia com alta letalidade e mortalidade, primeiramente demonstrada pela administração intravenosa de FB₁ (MARASAS

et al., 1988). A doença caracteriza-se pela necrose liquefativa no tecido cerebral e letargia, evoluindo para convulsões e morte (NORRED & VOSS, 1994). Soma-se ainda lesões hepáticas e aumento da proporção esfinganina/esfingosina sérica (WANG et al., 1991). Este último fator provavelmente está relacionado ao efeito promotor de câncer, com a esfinganina retardando a multiplicação de células normais e acelerando o desenvolvimento de mutantes iniciadas (RILEY et al., 1994). Embora a concentração de fumonisina necessária para causar leucoencefalomalácia não esteja determinada, os resultados evidenciam a sensibilidade dos equinos em relação a outros animais. Avaliações experimentais confirmaram o risco em níveis de fumonisina $> 10 \mu\text{g/g}$ de ração, não se observando aumento de risco em rações contendo níveis $< 6 \mu\text{g/g}$ (ROSS, 1994).

Em suínos, a síndrome de edema pulmonar é o principal efeito, mas também observam-se alterações hepáticas, cardiovasculares, do sistema imune, do metabolismo de esfingolipídios e no desenvolvimento animal (HASCHEK et al., 2001). O quadro clínico geral consiste de dispnéia, enfraquecimento e morte dentro de 4-7 dias após ingestão de ração contendo $> 92 \mu\text{g/g}$ de FB_1 , ou $16 \mu\text{g/g}$ de peso corporal por dia em experimentos de curta duração (HASCHEK et al., 1992; OSWEILER et al., 1992; MOTELIN et al., 1994). Na América do Norte e América do Sul observou-se síndrome de edema pulmonar com níveis de FB_1 entre 2 e $330 \mu\text{g/g}$ de ração, porém em ração naturalmente contaminada os resultados sugeriram necessidade de $100 \mu\text{g/g}$ (MARASAS, 1995).

A literatura sobre contaminação de ração com *F. verticillioides* concentra-se em aves (BRYDEN et al., 1987; JESCHKE et al., 1987; PRATHAPKUMAR et al., 1997; BUIM et al., 1999). Nestes animais, os principais efeitos da fumonisina caracterizam-se por diarreia, perda de peso/desenvolvimento corporal, aumento do volume hepático e imunossupressão (MARIJANOVIC et al., 1991). A alimentação com ração contendo 75 a $525 \mu\text{g/g}$ de FB_1 promoveu redução no ganho de peso, aumento do volume hepático/renal com elevação de enzimas séricas e necrose hepática (WEIBKING et al., 1993). Em doses próximas a $150 \mu\text{g/g}$ houve elevação de esfinganina livre, com aumento da razão esfinganina/esfingosina. O monitoramento de fumonisina em ovos embrionados indicou o acúmulo da toxina nas células epiteliais dos túbulos contorcidos distais e proximais, assim como no citoplasma de hepatócitos (BUIM et al., 1999). A morte do embrião ocorreu dentro de 10 dias após inóculo com $10 \mu\text{g}$ de FB (BACON et al., 1995).

Em animais experimentais, a fumonisina causou redução de peso em ratos alimentados com ração contendo FB_1 , FB_2 e FB_3 ou monometil éster de FB_1

(GELDERBLOM et al., 1988; GELDERBLOM et al., 1993; GELDERBLOM et al., 1994; BONDY et al., 1998). A FB₁ não causou efeito teratogênico em ratos, camundongos ou coelhos, porém em concentração elevada houve efeito embriotóxico, além de hepato/nefrotoxicidade em ratos, camundongos, equinos e suínos (IPCS, 2000; VOSS et al., 2001a). A exposição prolongada a alta concentração de FB₁ em roedores apresentou caráter promotor de câncer hepático, com estudos posteriores relatando, também, tumor renal (GELDERBLOM et al., 1994; FAO/WHO, 2001).

Embora o efeito de fumonisina em humanos não esteja definido, existem relatos de sintomas gastrointestinais na Índia (BHAT et al., 1997), assim como apoptose em cultura de células humanas (TOLLESON et al., 1999). Não obstante, a associação de exposição humana à fumonisina concentra-se no provável efeito promotor de câncer esofágico na África do Sul (SYDENHAM et al., 1990; RHEEDER et al., 1992), China (CHU & LI, 1994) e norte da Itália (FRANCESCHI et al., 1990). O milho é o principal alimento nas regiões endêmicas de câncer esofágico em Transkei (África do Sul), onde frequentemente ocorre alta contaminação por *F. verticillioides* e fumonisina (SYDENHAM et al., 1990; RHEEDER et al., 1992). O mesmo panorama ocorre na China e Itália (CHU & LI, 1994; FRANCESCHI et al., 1990), sendo este o motivo pelo qual a “International Agency for Research on Cancer” decidiu o enquadramento de FB₁ no grupo 2B, classificado como possível carcinógeno (IPCS, 2000).

UENO et al. (1997) apontaram as fumonisinas entre os fatores promotores de câncer hepático primário, baseando-se no levantamento epidemiológico de 3 anos consecutivos realizados em Haimen e Penlai, consideradas áreas de alto e baixo risco de câncer hepático na China, respectivamente. De um total de 120 amostras de Haimen, 66,7% apresentaram fumonisinas em níveis de 0,14 a 34,8 µg/g, em relação a 45% em Penlai (0,078 a 14,1 µg/g). Todavia, ainda depende de estudos conclusivos, em vista da constante exposição simultânea ao tabagismo e alcoolismo (NORRED & VOSS, 1994; BULLERMAN & DRAUGHON, 1994).

Embora ainda não existam limites legais estabelecidos para fumonisinas, os níveis máximos recomendados pelo “Mycotoxin Committee of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians” situam-se em 5, 10, 50 e 50 µg/g para ração de equinos, suínos, bovinos e aves, respectivamente (MUNKVOLD & DESJARDINS, 1997).

3.8- Fumonisina nos Subprodutos de Milho

O milho é um ingrediente largamente utilizada pela indústria de alimentos e ração animal, cujo processo industrial não elimina eficientemente a fumonisina pré-existente na matéria-prima, sendo detectada em cerveja (SCOTT & LAWRENCE, 1995; SCOTT, 1996), polenta, milho doce, pipoca (VISCONTI & DOKO, 1994), farinha de milho, semolina, “corn flakes”, “snacks”, biscoitos, purê, massas, tortilhas e leite (SHEPHARD et al., 1996).

Os estudos sobre a ocorrência de fumonisinas em milho demonstraram maiores níveis no grão integral e nos derivados submetidos a processamento mínimo, ou sob condições brandas. Conseqüentemente, comparando a farinha de milho, polvilho e canjica submetidos apenas ao processo de moagem, os derivados altamente processados constituídos de “corn flakes”, cereais matinais, “chips” e tortilha apresentam níveis não detectáveis ou baixos de fumonisinas (BULLERMAN, 1996).

A industrialização do milho emprega desde a quebra do grão por moagem seca ou úmida, a processos extensivos de fermentação, cozimento alcalino e extrusão. A moagem seca promove separação de diferentes frações e redução de granulometria, mantendo a maioria das características originais dos grãos (BENNETT & RICHARD, 1996). Não existem estudos específicos sobre a distribuição de fumonisinas nas diferentes frações obtidas, no entanto, tem-se detectado sua presença em diferentes produtos obtidos por este processo e destinados à alimentação humana (STACK & EPPLEY, 1992).

A moagem úmida, processo mais utilizado na obtenção de produtos destinados ao consumo humano, reduziu a concentração de micotoxinas (BENNETT & RICHARD, 1996). BENNETT et al. (1994) recuperaram 22% de FB₁ na água de processamento de milho, 35% no glúten, 35% nas fibras e 8% no germe, não se detectando a toxina no amido. A fermentação não degradou a fumonisina, detectando-se 85% da concentração inicial no produto destinado à alimentação animal (BENNETT & RICHARD, 1996).

O cozimento alcalino é um processo mexicano tradicional para obtenção de tortilhas e derivados, que vem sendo disseminado nos EUA e países diversos (SERNASALDIVAR et al., 1991). O processamento consiste no cozimento de milho com óxido de cálcio, seguido de maceração e obtenção de “nixtamal” básico para o preparo de alimento e

reduz aproximadamente 80% da fumonisina originalmente presente no milho (DOMBRINK-KURTZMAN et al., 2000; VOSS et al., 2001b).

A extrusão é um processo contínuo combinando calor, pressão e atrito mecânico para modificação estrutural do material, sendo amplamente empregado na indústria de “snack”, cereais matinais, entre outros (KATTA et al., 1999). A extrusão degrada componentes tóxicos, incluindo os inibidores de tripsina, e reduz a contaminação microbiológica, assim como a concentração de fumonisinas (CASTELO et al., 1998; KATTA et al., 1999).

Nos processamentos drásticos ocorre redução dos níveis de micotoxinas, porém não se discute sobre a toxicidade de produtos oriundos da degradação. BADRIA et al. (1995) demonstraram a formação de FB₁ hidrolisada, que mantém as mesmas características tóxicas da toxina.

A contaminação de milho e subprodutos por fumonisina é de ocorrência mundial, embora em menor grau nos países de clima temperado. A frequência de fumonisina em produtos comerciais indica a constante exposição dos consumidores, podendo associar-se a riscos de toxicose crônica (SHEPHARD et al., 1996).

3.9- Mecanismos Naturais de Defesa

A produção agrícola tem como fator limitante o desenvolvimento de doenças e pragas, responsáveis pela redução mundial entre 40 a 60% do total de alimentos produzidos nos últimos anos (PIMENTEL 1991; FAO, 1991; OERKE et al., 1994). As infecções por fungos, bactérias, vírus, nematóides e insetos diminuem a qualidade dos produtos agrícolas, exigindo controle fitossanitário com pesticidas e fungicidas, cujo elevado custo e crescente número de agentes sintéticos representam um problema sério ao ecossistema, seja meio ambiente, sociedade ou agropecuária (KRIEGER & SCHUTTERER apud GOMES & XAVIER-FILHO, 1994). No contexto, pesquisa sobre mecanismos naturais de defesa das plantas contra patógenos vem despertado interesse especial, sendo o seu domínio fundamental para a produtividade, com a vantagem de minimizar o envolvimento obrigatório de pesticidas na atual agricultura (GOMES & XAVIER-FILHO, 1994).

A sobrevivência das plantas requer resposta imediata a estímulos externos oriundos de predadores, ou adversidade ambiental, como temperatura e estiagem. A principal resposta consiste no desencadeamento de sinais internos, capazes de ativar a produção das substâncias de ataque ao patógeno (REINBOTHE et al., 1994; GRAHAM & GRAHAM, 1996; YANG et al., 1997; KELLER et al., 1999).

Durante o desenvolvimento vegetal, as estruturas vulneráveis associadas com o ciclo reprodutivo estão protegidas, exemplificando-se o tubérculo de batatas, órgão de armazenagem e capacidade regenerativa, que possui proteínas tóxicas e repelentes contra insetos e patógenos. As flores e sementes, proporcionando suporte nutricional/proteção ao embrião, representam outro estado vulnerável na passagem de geração, mas contêm diversas proteínas de defesa contra patógenos/herbívoros capazes de proteger os nutrientes endógenos, garantindo o desenvolvimento do novo indivíduo e perpetuação da espécie (GUTIÉRREZ et al., 1990).

As células de plantas superiores estão envoltas por parede celular, conferindo proteção perante o meio externo, seguida de apoplasto, uma matriz extracelular contínua com o xilema. O apoplasto desempenha papel estratégico na defesa, formando uma rede contínua na interface entre o corpo da planta e meio ambiente; nesta estrutura originam-se os sinais ativadores de respostas e acumulam-se os produtos de defesa (MARENTES et al., 1993).

Na relação planta-patógeno, a resistência resulta da incapacidade do parasita em reconhecer/infectar a planta, ou capacidade de ativação rápida e efetiva dos mecanismos de defesa, conduzindo à proteção. As diferentes respostas fisiológicas frente a um patógeno conferem resistência ou suscetibilidade, cuja especificidade seria explicada pelo conceito de interação gene-por-gene. I.e., a especificidade é determinada pela interação entre os produtos do gene de resistência dominante (*R*) e gene correspondente de avirulência (*Avr*) do patógeno, assim as relações incompatíveis requerem a interação de ambos produtos gênicos para iniciar uma resposta (KEEN, 1990; de WIT, 1992; HAMMOND-KOSACK & JONES, 1996; JACKSON & TAYLOR, 1996; Van der HOORN et al., 2002). Neste contexto, o modelo evocador-receptor é o mais aceito, destacando-se a importância do processo de reconhecimento entre o hospedeiro e patógeno. Postula-se que os produtos do gene de avirulência, ou metabólitos resultantes da atividade catalítica de uma proteína (evocador) são reconhecidos por moléculas alvo específicas nas plantas (receptores), codificados por genes de resistência.

Os estudos intensivos sobre interação planta-patógeno mostraram que uma vez reconhecido o patógeno, as plantas desencadeiam um arsenal de mecanismos visando proteção, descritos nos tópicos a seguir.

3.9.1- Fatores de virulência do patógeno

Os fitopatógenos expressam inúmeros fatores de virulência para aumentar a capacidade de colonização. Determinados mecanismos são gerais, representados pela produção de enzimas, toxinas e reguladores de crescimento vegetal, capazes de danificar/alterar a célula vegetal, proporcionando ambiente adequado para o desenvolvimento de patógenos (Figura 7); outros são altamente específicos, exemplificando-se interação com toxinas dirigidas a determinado hospedeiro (SALMOND, 1994; JACKSON & TAYLOR, 1996).

Para estabelecer a infecção, o patógeno deverá romper as barreiras físicas que protegem as células vegetais do ambiente externo, como cutícula e parede celular (JACKSON & TAYLOR, 1996). A cutícula consiste de ácido graxo hidroxilado, esterificado com compostos fenólicos (quitina) ou álcool primário (ceras); a parede celular contém polímeros de carboidratos (celulose, hemicelulose e pectina), proteínas (glicoproteínas ricas em hidroxiprolina ou extensinas, que constituem proteínas ricas em glicina e enzimas hidrolíticas) e compostos fenólicos, representados pela lignina e ésteres fenólicos (BOUDART et al., 1995). Estes compostos participam nas interações intermoleculares, incorporando compostos fenólicos (lignificação da parede celular), ou proteínas estruturais (glicoproteínas ricas em hidroxiprolina) na parede celular, sendo regulados por peroxidases, pH ou Ca^{2+} , desencadeando rearranjo estrutural e consequente diminuição da permeabilidade ao patógeno (SHOWALTER, 1993).

A penetração de bactérias e vírus nas plantas depende de danos, lesões ou aberturas naturais (estômatos) (JACKSON & TAYLOR, 1996). Os fungos dispõem de sistema de penetração específica através da cutícula, i.e., formação de apressório, além de secretar quitinases extracelulares, cruciais no estabelecimento da infecção (SCHAFER, 1994; HEATH, 1997). Todavia existem controvérsias, já que não se observou alterações na infectividade de patógenos deficientes em quitinases (ROGERS et al., 1994). No processo de

colonização, os fitopatógenos ainda devem romper a parede celular, secretando um arsenal de enzimas hidrolíticas, incluindo celulasas, pectinases, xilanases e proteases (SALMOND, 1994; WALTON, 1994; JACKSON & TAYLOR, 1996).

O estabelecimento final depende da inibição de defesa das plantas, cuja estratégia de ataque inclui danos devido a toxinas e supressores. O fator de virulência relacionado com toxinas fitopatogênicas inibem/inativam parte do sistema de defesa, enquanto que a capacidade de tolerar/degradar a toxina determina a resistência do hospedeiro (BLUMWALD et al., 1998). Os supressores, em contraste com as toxinas, não causam dano aparente nos tecidos infectados, mas causam ausência de resposta do hospedeiro. Os supressores constituídos de glicopeptídios, peptídios ou glucanas inibem funções fundamentais na membrana plasmática como, atividade de ATPases, suprimindo temporariamente a transmissão de sinais e consequente expressão gênica de defesa (HEATH, 1997).

3.9.2- Resposta de defesa nas plantas

As respostas de defesa dividem-se em três classes: (1) imediata ou primária, caracterizada pelo reconhecimento e geração de sinais iniciais visando primeira linha de defesa; (2) mecanismo de defesa local, cujos efeitos concentram-se diretamente sobre o patógeno e (3) resposta sistêmica induzida. A classificação baseia-se no padrão temporal e espacial de expressão oriundas de diferentes respostas em vários sistemas de defesa (Figura 7).

3.9.2.1- Resposta imediata ou primária

As células vegetais reconhecem um patógeno e transmitem a informação no seu interior assim como para a vizinhança, visando otimização da defesa. Estudos revelaram componentes de percepção e transmissão de sinais na planta. O avanço importante na área vem ocorrendo com o isolamento, purificação e determinação estrutural de evocadores

fúngicos e bacterianos, citando-se o lipopolissacarídeo de *Furkholderia cepacia* (COVENTRY & DUBERY, 2001). Receptores com alta afinidade às moléculas evocadoras foram identificados na membrana plasmática de soja, feijão, tomate e arroz (BASSE et al., 1993; NURNBERGER et al., 1994).

No modelo proposto para a transmissão intracelular de sinais, a iniciação de defesa se estabelece com a ligação do evocador ao receptor. A resposta ao evocador causa mudanças relevantes nas concentrações de íons H^+ , K^+ , Cl^- e Ca^{2+} (Figura 8) e formação de H_2O_2 (estado oxidativo) nos 5 min iniciais (NURNBERGER et al., 1994; HAHLBROCK et al., 1995; NURNBERGER & SCHEEL, 2001). A fosforilação Ca^{2+} dependente em determinadas proteínas inicia-se entre 5 e 30 min, induzindo síntese rápida de etileno e ativação transcricional de genes relacionados com a defesa (DIETRICH et al., 1990). A nível temporal, o estado oxidativo e fosforilação/defosforilação de proteínas parecem ser controlados pela ação de canais iônicos.

A resposta de hipersensibilidade consiste desta série de mudanças irreversíveis na membrana celular, com perda de eletrólitos, peroxidação de lipídios e entrecruzamento de proteínas, seguida de morte celular localizada. O processo constitui na primeira linha de defesa, com atuação direta de citotoxicidade resultante de oxigênio reativo. O oxigênio reativo também contribui na lise de células infectadas, além de impedir a invasão mediante entrecruzamento oxidativo de proteínas específicas, formando barreira química (DANGL et al., 1996; HAMMOND-KOSACK & JONES, 1996; JACKSON & TAYLOR, 1996).

3.9.2.2- Resposta local

A segunda linha de defesa consiste no acúmulo rápido de enzimas, proteínas estruturais e metabólitos, resultante da ativação transcricional mediada pelo reconhecimento do patógeno. A ativação é restringida à pequena área definida ao redor do ponto de penetração, estabelecendo uma resposta localizada (BOWLES, 1990; GEOFFROY et al., 1990; RYAN & JAGENDORF, 1995).

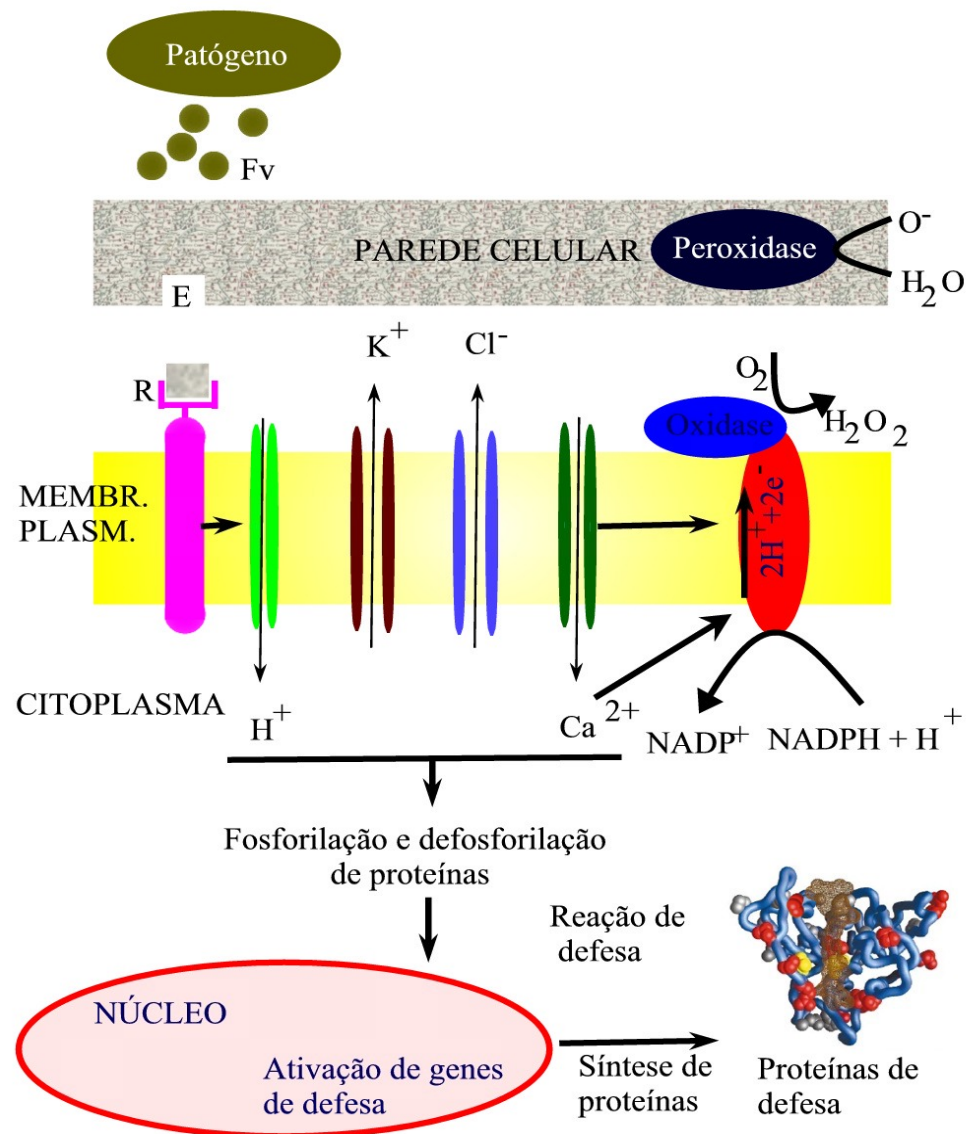


Figura 8: Principais componentes envolvidos no reconhecimento de patógenos, mecanismos de transmissão de sinais e ativação de genes envolvidos na defesa da planta. **E.** Evocador. **R.** receptor. **Fv.** Fator de virulência. Fonte: DANGL et al. (1996).

A reação típica na região é a síntese de enzimas envolvidas na biossíntese de compostos tóxicos contra patógenos, i.e., metabolismo de fenil propanóides, fenilalanina

amônio liase (PAL), 4-cumarato:CoA ligase (4CL), enzimas da síntese de fitoalexinas, além de metabólitos secundários (NICHOLSON & HAMMERSCHMIDT, 1992; FREYTAG et al., 1994). A Figura 9 sumariza os participantes de diferentes vias bioquímicas, transcripcionalmente ativadas. As ramificações destas vias originam uma diversidade de compostos, tais como pigmentos, antibióticos (fitoalexinas), protetores contra radiação ultravioleta, sinais moleculares envolvidos na interação planta-ambiente e componentes estruturais da planta (lignina, suberinas e outros constituintes da parede celular).

As proteínas pertencentes ao grupo de glicoproteínas ricas em hidroxiprolina (HRPG), proteínas ricas em glicina (GRP), ou relacionadas com patogênese intra e extracelulares (PR), assim como quitinases, β -1,3-glucanases, peroxidases, lipoxigenases, proteases, inibidores de protease/amilase, poligalacturonidase e proteínas antimicrobianas também são sintetizadas por este mecanismo (HAMMOND-KOSACK & JONES, 1996; JACKSON & TAYLOR, 1996; COVENTRY & DUBERY, 2001).

3.9.2.3- Resposta sistêmica

A infecção local em diversas espécies vegetais induz resposta de defesa em regiões não afetadas. Esta resposta é normalmente efetiva contra muitos patógenos, incluindo vírus, bactérias e fungos, permanecendo ativa durante semanas ou meses. O fenômeno, denominado de resistência induzida ou sistemicamente adquirida (RAS), está relacionado com a ativação generalizada de defesa através da transmissão de sinais originados no local de ataque (RYALS et al., 1996; PRITSCH et al., 2001).

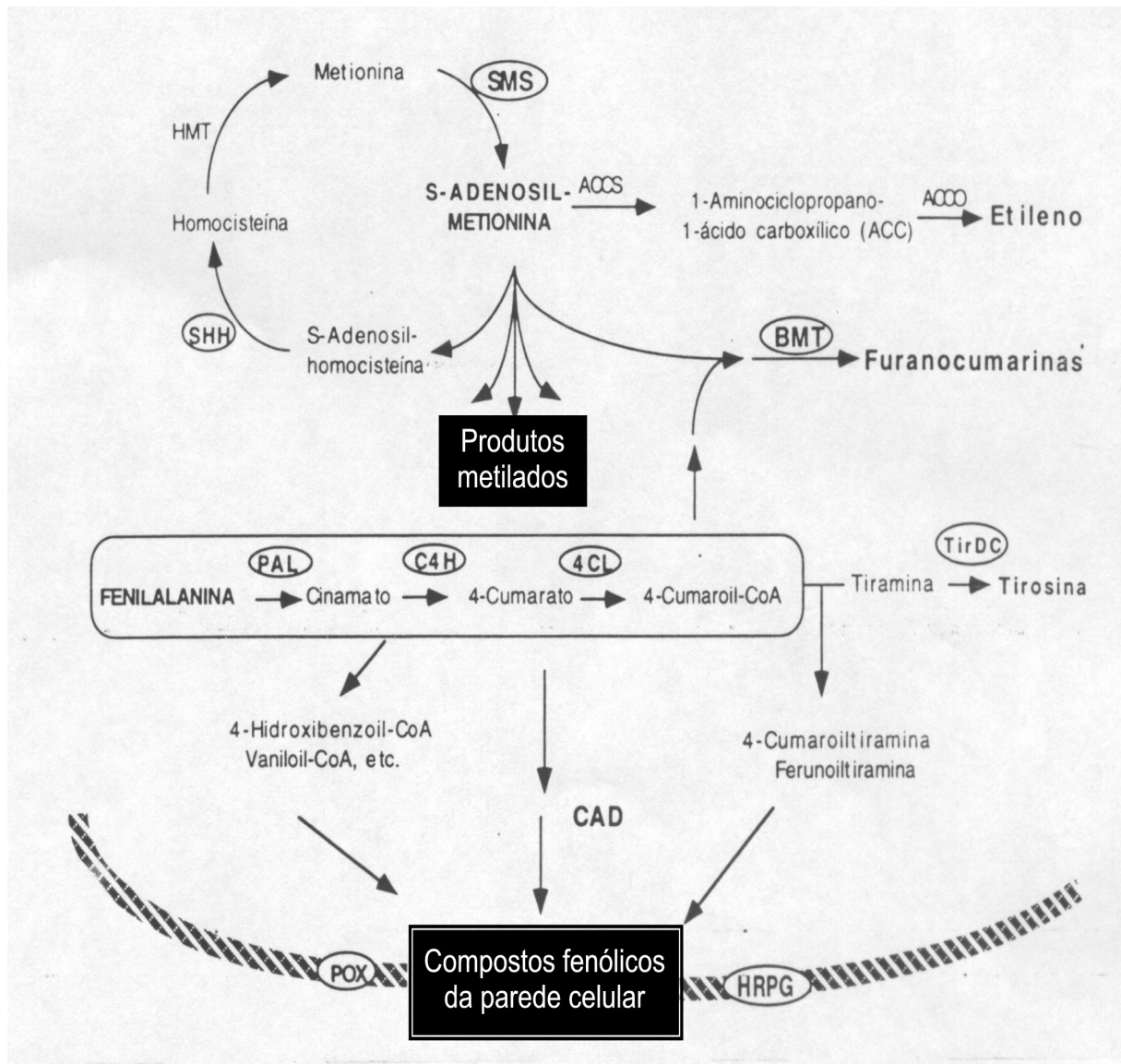


Figura 9: Biossíntese de metabólitos secundários envolvidos na defesa de plantas, a partir da via geral dos fenil propanóides e suas interações com outras vias biossintéticas. ○ . Enzimas, cujos genes são transcricionalmente induzidos. **4CL.** 4-cumarato:CoA ligase. **ACCO.** ACC oxidase. **ACCS.** ACC sintetase. **BMT.** S-adenosil-L-metionina:bergaptol-O-metil transferase. **C4H.** Cinamato-4-hidroxilase. **CAD.** Cinamil-álcool-desidrogenase. **HMT.** Homocisteína metil transferase. **HRPG.** Glicoproteínas ricas em hidroxiprolina. **POX.** Peroxidase. **TirDC.** Tirocina descarboxilase. **SHH.** S-adenosil-L-homocisteína hidrolase. **SMS.** S-adenosil-L-metionina sintetase. **PAL.** Fenilalanina amônio liase. Fonte: HAHLBROCK et al. (1995).

A RAS também pode ser ativada por dano mecânico causado pelos insetos, sendo demonstrado na expressão sistêmica dos inibidores de proteases em batata e tomate, justificando a hipótese de proteção através da inibição de enzimas digestivas de pragas (RYAN, 1992). No tabaco, demonstrou-se a correlação de RAS com produção de β -1,3-glucanases, quitinases e proteína PR tipo taumatina, que apresentam atividade antifúngica (WARD et al., 1991; VIGERS et al., 1992; STINTZI et al., 1993; COVENTRY & DUBERY, 2001).

Por outro lado, a expressão temporal e espacial dos mecanismos de defesa são importantes na aquisição de resistência. A indução e posterior expressão gênica de defesa é mediada por uma série de eventos moleculares sequenciais: (i) geração e reconhecimento de sinais extracelulares (evocadores), (ii) conversão em sinais intracelulares e transmissão e (iii) resposta aos sinais pelas células alvo (HAHLBROCK et al., 1995).

O ácido salicílico (AS) é um dos principais mediadores na cascata de transmissão de sinais, provavelmente envolvido nos processos desde floração, termogênese, a resistência contra doenças (ENYEDI et al., 1992). O aumento da concentração de AS ocorre no tabaco e arábido infectados com vírus, bactérias ou fungos, sugerindo que seja sinal endógeno na resposta de defesa (ENYEDI et al., 1992; YALPANI et al., 1993). O ácido jasmônico e o derivado volátil metiljasmonato são outros componentes endógenos, ativos na resposta sistêmica da planta. O metiljasmonato apresenta-se como forte indutor na síntese de inibidores de proteases em tomate, tabaco e alfafa (FARMER et al., 1992; RYAN, 1992; FARMER & RYAN, 1992). Outro composto capaz de induzir a síntese de inibidores de proteases em tomate é a sistemina, um pequeno peptídeo com 18 resíduos de aminoácidos transportado rapidamente pelo floema de regiões atacadas ou danificadas a tecidos intactos, gerando resposta sistêmica (RYAN, 1992; RYAN, 2000).

3.9.2.4- Proteínas de defesa

As proteínas de defesa dividem-se em três classes, conforme função desempenhada. A primeira classe agrupa produtos capazes de mudar diretamente as propriedades extracelulares da matriz, aumentando a defesa por reforçar, reparar ou alterar a parede celular. O grupo inclui proteínas estruturais constituídas de glicoproteínas ricas em

hidroxiprolina/glicina e enzimas envolvidas na construção/modificação de polímeros da parede celular (lignina, suberina, compostos fenólicos e calose) (GOMES & XAVIER-FILHO, 1994).

O segundo grupo contém proteínas com atividade antimicrobiana direta, exemplificando-se hidrolases pertencentes a quitinase e β -1,3-glucanase, catalisadores da síntese de antimicrobianos ou contra herbívoros (inibidores de protease e amilase), proteínas tóxicas (lectinas, tioninas ou inativadores de ribossomos), além de enzimas envolvidas na síntese de metabólitos secundários (taninos, quinonas e fitoalexinas com atividade antimicrobiana), conforme Figura 9 (BOWLES, 1990).

A terceira classe envolve proteínas com resposta de defesa relacionada com patogênese, ou PR (GOMES & XAVIER-FILHO, 1994).

Os fatores de resistência com atividade antimetabólica, pertencentes ao grupo de inibidores de protease e α -amilase proveniente de plantas e outros organismos tem sido avaliados contra insetos. O setor, com marcante evolução, introduziu-se na era de plantas transgênicas contendo expressão gênica, capazes de expressar mecanismos de defesa específicos a insetos (MARKWICK et al., 1996). Recentemente, iniciou-se o estudo dos inibidores de amilase como mecanismo de resistência contra fungos micotoxigênicos (FAKHOURY & WOLOSHUK, 2001).

3.10- Inibidor de α -amilase

O primeiro inibidor de α -amilase foi descrito no trigo sarraceno e cevada em 1933 e 1934, respectivamente (CHRZASZCZ & JANICKI, 1934). O próximo relato, ocorrido somente em 1943, determinou a natureza protéica e solubilidade dos inibidores de α -amilase de trigo, centeio e determinadas variedades de cevada (KNEEN & SANDSTED, 1943). Entretanto, a importância dos inibidores de α -amilase em cereais foi retomada somente em 1973. WHITAKER (1989) relatou inibidores de amilase em cevada, milho, milheto, ragi, setária, feijão, triticale, arroz, feijão alado, grão de bico, lágrima de Jó, amendoim e manga, cuja ocorrência se estende a tubérculos, sendo descrito em colocássia, cará, inhâme e tarô.

Os inibidores de α -amilase são divididos em seis classes (tipo lectina, knotina, cereal, Kunitz, γ -purotionina e thaumatina), podendo ser utilizados no controle de

patógenos em plantas. As classes de inibidores mostram notável variedade estrutural apresentando diferentes tipos de inibição, assim como especificidade variável contra diferentes fontes de α -amilase (FRANCO et al., 2002).

3.10.1- Inibidor de α -amilase no trigo

No trigo, os inibidores de α -amilase foram descritos pela primeira vez em 1933 e designados de “sistoamylase” (CHRZASZCZ & JANICKI, 1934). A continuidade a investigação prosseguiu-se com KNEEEN & SANDSTEDT (1945); SHAINKIN & BIRK (1970); CANTAGALLI et al. (1971); SAUNDERS & LANG (1973); SILANO et al. (1975); WARCHALEWSKI (1983); BUONOCORE et al. (1984); BUONOCORE & SILANO (1986); BELITZ & WEDER (1990); GUTIERREZ et al. (1990); FENG et al. (1991); FENG et al. (1996); MARKWICK et al. (1996).

Os inibidores de α -amilase do trigo foram inicialmente obtidos sob forma de um conjunto com seis albuminas, designados segundo mobilidade em gel de eletroforese em 0,19; 0,28; 0,32; 0,35; 0,39 e 0,48 (SILANO et al., 1973). BUONOCORE & SILANO (1986) agruparam estes inibidores em três famílias, com massa molecular aparente de 50, 26 e 13 kDa, respectivamente ativos contra amilase de aves, mamíferos e insetos, porém inativos contra α -amilase bacteriana, fúngica e de trigo (BELITZ & WEDER, 1990).

A biossíntese do inibidor de α -amilase inicia-se aproximadamente no oitavo dia após a fertilização do trigo, aumentando rapidamente até atingir atividade máxima na maturação dos grãos. A atividade depende da integridade estrutural da proteína, sendo inativada por agentes redutores (diidroteitol e 2- β -mercaptoetanol), enzimas proteolíticas e calor (BUONOCORE & SILANO, 1986). Quanto ao tratamento térmico, o binômio tempo-temperatura apresenta variação, sendo geralmente estável a 70°C. KNEEEN & SANDSTEDT (1945) observaram manutenção de atividade por 2 horas a 70°C, inativação parcial a 100°C e perda de atividade a 121°C por 30 min, caracterizando-se como proteína termoestável.

O inibidor atuou sobre α -amilase salivar humana (pH 6,4 a 8,5) e pancreática (5,8 a 7,0) (O'DONNELL & McGEENEY, 1976). O binômio tempo-pH da cinética de inibição indicou que o tempo necessário na complexação do inibidor de trigo com amilase variou de 30 a 120 min.

As amilases de insetos predadores naturais de trigo, representados por *Tenebrio molitor*, *Calandra granaria*, *C. oryzae*, *Tribolium confusum*, *Oryzaephilus surinamensis*, *Periplaneta americana* e *Callosobruchus maculatus*, foram inibidas por inibidores de α -amilase do trigo (SILANO et al., 1975; GATEHOUSE et al., 1986), evidenciando o seu papel como fator de resistência na pós-colheita (YETTER et al., 1979). APPLEBAUM (1967) confirmou a hipótese “in vivo” adicionando extratos protéicos de trigo na dieta sintética, cuja formulação afetou o desenvolvimento e aumentou a mortalidade de *T. molitor*, *Tribolium castaneum* e *Prodenia litura*.

3.10.2- Inibidor de α -amilase no feijão

Os inibidores de α -amilase em feijão (*Phaseolus vulgaris*), isolados pela primeira vez em 1945 por BOWMAN, são amplamente distribuídos entre suas variedades/cultivares (POWERS & WHITAKER, 1977; PICK & WOBER, 1978; FRELS & RUPNOW, 1984; WILCOX & WHITAKER, 1984; LAJOLO & FINARDI-FILHO, 1985; KOTARU et al., 1987; GIBBS & ALLI, 1998; ISHIMOTO et al., 1999; BERRE-ANTON et al., 2000; SILVA et al., 2001). Entretanto, o interesse somente retornou no final dos anos 60, quando JAFFÉ & LETTE (1968) detectaram amido não digerido nas fezes de ratos alimentados com dietas à base de feijão cru, seguido de estudos detalhados realizados por MARSHALL & LAUDA (1975).

Nesta leguminosa, os inibidores consistem de globulinas conjugadas com carboidratos, apresentando massa molecular >40 kDa (POWERS & WHITAKER, 1977; YIN et al., 1991). Os diferentes inibidores resistiram até 80°C, sendo detectado dois tipos de inibidores (I-1 e I-2), baseado em perfil eletroforético, composição de subunidades e estabilidade térmica, com algumas variedades apresentando apenas I-1 ou I-2 (IGUTI & LAJOLO, 1990).

Os inibidores de α -amilase de feijão inibem a α -amilase de *Tenebrio molitor*, *Tribolium castaneum*, *T. confusum*, *Anagasta kuehniella*, *Callosobruchus chinensi*, *C. maculatus* (POWERS & CULBERTSON, 1982; ISHIMOTO & KITAMURA, 1989). Todavia, os significados “in vivo” e “in vitro” apresentados pelos inibidores de α -amilase são de difícil determinação. I.e., a alimentação com dietas ricas em amido e inibidores de α -

amilase de feijão reduziu drasticamente a atividade enzimática e sobrevivência, sugerindo resistência contra insetos, embora se desconheça a contribuição específica de cada fator no mecanismo natural de defesa (POWERS & WHITAKER, 1977; POWERS & CULBERTSON, 1982). Em adição, o desenvolvimento de plantas transgênicas com introdução de inibidor de amilase do feijão (*Phaseolus vulgaris*) conferiu resistência a *Zabrotes subfasciatus* no feijão azuki e a *Bruchus pisorum* na ervilha (ISHIMOTO et al., 1996; MORTON et al., 2000).

Em relação às amilases bacteriana e fúngica, os estudos pioneiros não detectaram atividade dos inibidores de feijão contra α -amilase de *Bacillus subtilis*, *B. licheniforme*, *B. amyloliquefacius*, *Aspergillus oryzae* e α -amilase endógena (MARSHALL & LAUDA, 1975; POWERS & WHITAKER, 1977).

3.10.3- Inibidor de α -amilase no milho

Em milho, o estudo dos inibidores de α -amilase iniciou-se na década de 80, com o isolamento e purificação do primeiro inibidor por BLANCO-LABRA & ITURBE-CHIÑAS (1981). A proteína purificada, localizada no endosperma das sementes, foi caracterizada com massa molecular de 29,6 kDa, isento de carboidratos e apresentou-se estável a 96°C por 5 min em pH 7,0. Esta proteína apresentou atividade antifúngica, inibindo o crescimento de *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. niger*, *F. graminearum*, *F. moniliforme*, *Cercospora kikuchii*, *P. chrysogenum*, *R. Stolonifer* e *T. viride* (CHEN et al., 1999a; CHEN et al., 1999b).

Este inibidor atuou sobre α -amilase de *Tribolium castaneum*, *Sitophilus zeamais* e *Rhyzopertha dominica*, porém apresentou-se inativo contra α -amilase de *A. oryzae* (BLANCO-LABRA & ITURBE-CHIÑAS, 1981). Posteriormente, a mesma equipe isolou uma proteína com 12 kDa, que além de inibir a amilase de *T. castaneum* e *Callosobruchus maculatus*, atuou também sobre protease bovina e α -amilase de *Protephanus truncatus*, *A. niger* e *A. fumigatus* (BLANCO-LABRA et al., 1995).

Com capacidade de atuar sobre amilase de diferentes origens, estes inibidores possivelmente participam no mecanismo natural de defesa das plantas. A maioria

das pesquisas concentram-se nos inibidores de α -amilase de mamíferos e insetos predadores, sendo ainda incipiente os estudos em relação aos fungos e bactérias. Intensificação na investigação, aliada à descoberta de novas substâncias pertencentes à categoria, abririam perspectivas para a produção de plantas transgênicas resistentes, com o intuito de reduzir o uso indiscriminado de agrotóxicos.

Em suma, a investigação sobre ocorrência natural de novos inibidores de amilase seria de extrema importância para estudar modelos de interações proteína-proteína, controle de predadores (insetos, fungos e bactérias) ou reguladores do metabolismo de amido na planta (WHITAKER, 1989). O estudo sobre proteínas com características inibitórias contra α -amilase de predadores possibilitaria o desenvolvimento de plantas transgênicas, capazes de aumentar a produção agrícola, auxiliar no melhoramento da sanidade dos grãos, além de reduzir o uso indiscriminado de agrotóxicos sintéticos, que representam um perigo ao ecossistema.

4- MATERIAL E MÉTODOS

4.1- Milho

O monitoramento de inibidores de amilase (IA), microbiota fúngica e fumonisinas foi realizado em 37 híbridos de milho, sendo 21 pertencentes ao ciclo precoce e 16 ao ciclo super precoce, cultivados na Fazenda Experimental do Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR-Londrina), no período de março a setembro/1997 (safrinha de 1997). Os híbridos foram cultivados sob responsabilidade do pesquisador Antônio Carlos Gerage e envolvidos no Programa de Orientação ao Produtor do IAPAR. Cada híbrido foi plantado em quatro linhas de cinco metros lineares, espaçados de 0,9 m. Após desbaste, manteve-se quatro plantas por metro linear, considerando como área útil para a coleta de informações, as duas linhas centrais (9 m²). Após a colheita, os grãos foram secos à temperatura ambiente até atingir 14% de umidade e armazenados a -20°C.

O híbrido AG5011, selecionado por apresentar maior nível de IA e cultivado no IAPAR-Londrina na safra de 1999, foi utilizado na purificação e caracterização parcial dos IA. Após a colheita, os grãos foram secos à temperatura ambiente até atingir 14% de umidade e armazenados a -20°C.

4.2- Amilase

Linhagens de *F. verticillioides* 113F e *A. flavus* foram isoladas de ração envolvida em intoxicação animal e mantidas em ágar batata dextrose (BDA) a 4°C com ativação semestral. As amilases foram produzidas no meio de cultivo descrito por FIGUEIRA & HIROOKA (2000), inoculando os conídios fúngicos em 480 mL de meio composto por 2% de farinha de milho em sobrenadante de milho verde. Após 20 dias a 25°C, a fermentação foi interrompida e centrifugada a 5.000 x g (10 min, 4°C) e o sobrenadante utilizado como fonte de amilase.

As amilases salivar e pancreática humana foram adquiridas de Amersham Pharmacia Biotech, enquanto que β -amilase de cevada, α -amilase de cevada e α -amilase pancreática suína foram obtidas de Sigma Chemical Co. Amilases de insetos foram preparadas no laboratório conforme preconizado por BLANCO-LABRA et al. (1995). Os insetos foram desenvolvidos no insetário do Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV-Unidade Irapuato), sendo a fase larvária de *Prostephanus truncatus*, *Sitotroga cerealella*, *Sitophilus zeamais* cultivada em grãos de milho; *Tribolium castaneum* foi cultivado em farinha de trigo; *Callosobruchus maculatus* em ervilha; e *Zabrotes subfasciatus* e *Acanthoscelides obtectus* em feijão. Os cultivos foram mantidos em câmara incubadora a 28°C, com 65-75% de umidade relativa. Na extração de amilases, as larvas de cada inseto foram homogeneizadas com tampões na proporção 1:5 (p/v). Para amilase de *P. truncatus*, procedeu-se à extração com tampão succínico 0,04 M (pH 6,5) contendo 0,1 M de NaCl; a amilase de *S. zeamais*, *T. castaneum*, *Z. subfasciatus*, *C. maculatus*, *A. obtectus* e *S. cerealella* foi extraída com tampão succínico 0,2 M (pH 4,5). As suspensões foram centrifugadas a 10.000 x g (10 min, 4°C) e o sobrenadante utilizado como fonte de amilase.

Amilase de milho e arroz foram extraídas de sementes, após 5 e 3 dias de germinação, com CaCl₂ a 0,01 M e NaCl a 0,1 M, respectivamente.

4.3- Atividade Inibidora de Amilase

A partir deste item, dividiu-se os IA em dois grupos: o solúvel em tampão (designação dada ao IA extraído com tampão acetato de sódio 0,1 M pH 6,0) e o solúvel em etanol (referente ao IA extraído com etanol 95%).

Para o monitoramento de IA nos 37 híbridos de milho, a atividade amilásica foi determinada por método iodométrico (WILSON & INGLEDEW, 1982). Uma unidade amilásica (UA) foi arbitrariamente definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 0,1 mg de amido em 10 min de reação a 40°C, na presença de 5,0 mg de amido.

A atividade inibidora de amilase foi determinada, pré-incubando 0,25 mL de amilase de *F. verticillioides* contendo 15 UA com 0,25 mL de extrato de milho adequadamente diluído (30 min, 40°C), para obter 50% de inibição enzimática. A atividade amilásica residual foi determinada, adicionando 1,0 mL de solução de amido 0,5% mantida a

40°C e, transcorridos 10 min de reação, transferiu-se 0,2 mL desta mistura para um tubo contendo 5,0 mL da solução de iodo e absorvância medida a 540 nm. O branco consistiu de 5,0 mL da solução de iodo adicionado de 0,2 mL de água deionizada. O controle de amido consistiu de 5,0 mL da solução de iodo adicionado de 0,2 mL de uma mistura de amido em tampão $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-NaOH}$ 0,05M pH6,0 na proporção 2:1. Uma unidade inibidora de amilase (UIA) foi arbitrariamente definida como quantidade de IA necessária para inibir 1 UA nas condições de ensaio e expressa em UIA/g de milho em base seca (bs). Os resultados obtidos foram calculados conforme equações 1 e 2. A equação 1 foi utilizada para determinar atividade amilásica inicial sem a interação com IA, enquanto que na equação 2 determinou a atividade inibidora de amilase em unidades de inibição por mL de extrato contendo IA.

$$UA = \frac{7,5 \times \left[0,667 - \left(\frac{A \times 0,667}{B} \right) \right]}{0,1}$$

$$(1) UIA / ml = \left\{ UA - \left\{ \frac{7,5 \times \left[0,667 - \left(\frac{C \times 0,667}{D} \right) \right]}{0,1} \right\} \right\} \times \frac{1000}{\text{extrato de IA } (\mu\text{l})} \quad (2)$$

Onde: **UA** = atividade amilásica sem interação com o IA (controle da atividade amilásica); **A** = absorvância (DO) a 540 nm, correspondente ao controle de amilase; **B** = DO a 540 nm correspondente ao controle de amido; **C** = DO a 540 nm correspondente a interação entre amilase e IA; **D** = DO a 540 nm correspondente ao controle de amido da interação entre amilase e IA.

Durante a purificação e caracterização parcial dos IA, a atividade amilásica foi determinada por método iodométrico (WILSON & INGLEDEW, 1982), modificado para determinação em microplacas de 96 poços. A atividade inibidora de amilase foi determinada, pré-incubando o inibidor de amilase com 0,2 UA (volume final de 70 μL visando obter redução de 50% na atividade amilásica inicial) por 10 min a 25°C, para o inibidor extraído com solução tampão; 30 min a 25°C, para o inibidor extraído com etanol 95%. A seguir mediu-se a atividade amilásica residual.

Uma unidade inibidora de amilase (UIA) foi arbitrariamente definida como a quantidade de proteína necessária para inibir 1 UA, nas condições de ensaio. Uma UA foi

definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 0,1 mg de amido em 60 min a 25°C, na presença de 0,038 mg de amido. Os resultados obtidos foram calculados empregando as equações 3 e 4, sendo que a equação 3 foi utilizada na determinação da atividade amilásica inicial sem a interação com IA, enquanto que na equação 4 determinou a atividade inibidora de amilase em unidades de inibição por mL de extrato contendo IA.

$$UA = \frac{\left[0,038 - \left(\frac{A \times 0,038}{B} \right) \right]}{0,1} \quad (3)$$

$$UIA/ml = \left\{ UA - \left\{ \frac{\left[0,038 - \left(\frac{C \times 0,038}{D} \right) \right]}{0,1} \right\} \right\} \times \frac{1000}{\text{extrato de AI } (\mu\text{l})} \quad (4)$$

Onde: **UA** = atividade amilásica sem interação com o IA (controle da atividade amilásica); **A** = absorbância (DO) a 630 nm, correspondente ao controle de amilase; **B** = DO a 630 nm, correspondente ao controle de amido; **C** = DO a 630 nm, correspondente a interação entre amilase e IA; **D** = DO a 630 nm, correspondente ao controle de amido da interação entre amilase e IA.

4.4- Determinação de Proteína

- **Inibidor solúvel em tampão:** A concentração de proteína foi determinada por BRADFORD (1976), usando albumina sérica bovina como padrão.
- **Inibidor solúvel em etanol:** A concentração de proteína foi determinada pelo método descrito por SMITH et al. (1985), usando albumina sérica bovina como padrão.

4.5- Extração e Purificação dos Inibidores de Amilase

- **Inibidor solúvel em tampão:** Os grãos de milho foram inicialmente triturados até granulometria máxima de 48 mesh (moinho Janke & Kunkel, modado A10) e desengordurados por homogeneização da farinha com acetona (1:1 p/v) durante 15 min. Após decantação, a acetona foi descartada. O processo foi repetido por mais 3 vezes e a farinha desengordurada seca à temperatura ambiente e armazenada a -20°C .

Na extração de IA, a farinha de milho desengordurada foi homogeneizada durante 12 horas a 4°C com tampão acetato de sódio 0,1 M pH 6,0 (1:5 p/v). As proteínas solúveis foram obtidas por centrifugação a $30.000 \times g$ (20 min, 4°C) e submetidas a precipitação fracionada com sulfato de amônio entre 30-60% de saturação. O precipitado (P_{30-60}) foi coletado após centrifugação a $30.000 \times g$ (20 min, 4°C), solubilizado em tampão Tris-HCl 0,01 M pH 8,0 e concentrado por ultrafiltração com membrana de exclusão molecular de 30 kDa. Para a análise de IA nos 37 híbridos de milho, o P_{30-60} foi solubilizado em tampão $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-NaOH}$ 0,05 M pH 6,7 e dialisado contra o mesmo tampão. Os extratos foram centrifugados a $15.000 \times g$ (15 min, 4°C) e o sobrenadante armazenado a -20°C .

O extrato concentrado foi fracionado em coluna de filtração molecular contendo Sephadex G-75 (166 x 1,6 cm), equilibrada com solução de bicarbonato de amônio 0,01 M pH 8,2 e eluída sob fluxo de 15 mL/h, coletando-se 7 mL por fração. O perfil cromatográfico foi determinado, monitorando proteína a 280 nm e atividade inibidora de amilase. As frações ativas foram coletadas, liofilizadas, solubilizadas em tampão Tris-HCl 0,01 M pH 7,5 e fracionadas em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) usando coluna de Superose 12HR 10/30 (Pharmacia Fine Chemicals) equilibrada com o mesmo tampão. A eluição foi conduzida a fluxo de 0,4 mL/min e o pico ativo coletado, concentrado por ultrafiltração com membrana de exclusão molecular de 10 kDa. O extrato obtido foi utilizado na caracterização parcial do inibidor de amilase, assim como submetido ao último passo de purificação em CLAE usando coluna de troca iônica Vydac 300 VHP 575 (0,75 cm i.d. x 5,0 cm) equilibrada com tampão Tris-HCl 0,01 M pH 7,5. A separação procedeu-se em gradiente linear de NaCl no mesmo tampão, entre 0 a 0,5 M de NaCl em 120 min. A

separação foi monitorada a 220 nm e o pico ativo coletado e armazenado a -20°C , utilizado para determinar ponto isoelétrico e massa molecular aparente.

- **Inibidor solúvel em etanol:** Inicialmente padronizou-se a extração deste IA usando diferentes concentrações de etanol (0, 20, 40, 60, 80 e 95%), sendo que o etanol 95% demonstrou melhor resultado, conforme descrito posteriormente.

Na extração de IA, a farinha de milho com granulometria máxima de 48 mesh (moinho Janke & Kunkel, modelo A10) foi homogeneizada com etanol a 95% (1:5 p/v) durante 2 h à temperatura ambiente e o sobrenadante obtido a $30.000 \times g$ (20 min, 4°C), seco em concentrador à vácuo. O concentrado foi solubilizado em bicarbonato de amônio 0,01 M pH 8,2 contendo 1% de Triton X-100 e submetido à coluna Econo-Pac Q cartridge (1,0 x 5,0 cm, Bio Rad), equilibrado com a mesma solução e eluído com gradiente salino entre 0 a 0,25 M de NaCl em 90 min a um fluxo de 1 mL/min. Frações de 2 mL foram coletadas para determinar o perfil cromatográfico, sendo o pico ativo armazenado a -20°C .

4.6- Caracterização Parcial dos Inibidores de Amilase

4.6.1- Tempo de Pré-Incubação

- **Inibidor solúvel em tampão:** 1,5 μg de IA foi pré-incubado em tampão KH_2PO_4 -NaOH 0,05 M pH 6,7 por 0, 5, 10, 20 e 30 min a 25°C com 0,2 UA de *F. verticillioides*, determinando-se a atividade amilásica residual.
- **Inibidor solúvel em etanol:** 1,3 μg de IA foi pré-incubado em tampão KH_2PO_4 -NaOH 0,05 M pH 6,7 por 0, 5, 10, 15, 30, 45, 60 e 120 min a 25°C com 0,2 UA de *F. verticillioides*, determinando-se a atividade amilásica residual.

4.6.2- Estabilidade Térmica

- **Inibidor solúvel em tampão:** 1,5 µg de IA foi pré-incubado em tampão KH_2PO_4 -NaOH 0,05 M pH 6,7 por 30 min a 25, 40, 70 e 94°C, imediatamente refrigerado, adicionado de 0,2 UA de *F. verticillioides* e após incubação a 25°C por 10 min, determinou-se a atividade amilásica residual.
- **Inibidor solúvel em etanol:** 1,3 µg de IA foi pré-incubado em tampão KH_2PO_4 -NaOH 0,05 M pH 6,7 durante 0, 5, 10, 15, 30, 45 e 60 min a 50, 70 e 94°C, após tratamento térmico as amostras foram refrigeradas, adicionadas de 0,2 UA de *F. verticillioides* e após incubação a 25°C por 10 min, determinou-se a atividade amilásica residual.

4.6.3- Efeito de pH sobre a Atividade Inibidora de Amilase

- **Inibidor solúvel em tampão:** O efeito de pH sobre a atividade inibidora contra amilase de *F. verticillioides* foi analisada em pH 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0 e 9,0 empregando os tampões acetato de sódio 0,05 M (pH 4,0 e 5,0); fosfato de sódio 0,05 M (pH 6,0 e 7,0); Tris-HCl (pH 8,0 e 9,0). O IA (1,5 µg) e amilase (0,2 UA) foram pré-incubados por 30 min a 25°C em cada pH, determinando-se a atividade amilásica em cada pH correspondente.
- **Inibidor solúvel em etanol:** Na determinação do efeito do pH sobre a atividade inibidora de amilase contra amilase de *F. verticillioides*, determinou-se a atividade inibidora de amilase em diferentes pH (4,0; 5,0; 6,0; 6,5; 7,0; 8,0 e 9,0) usando os seguintes tampões: acetato de sódio 0,05 M (pH 4,0 e 5,0); fosfato de sódio 0,05 M (pH 6,0; 6,5 e 7,0); Tris-HCl (pH 8,0 e 9,0). O IA (1,3 µg) e amilase (0,2 UA) foram pré-incubados por 30 min a 25°C em cada pH, determinando-se a atividade amilásica em cada pH correspondente.

4.6.4- Estabilidade ao pH

- **Inibidor solúvel em etanol:** O efeito do pH na estabilidade do IA foi determinado, incubando 1,3 µg de IA nos mesmos tampões descritos no item 4.6.3, pH 4,0; 5,0; 6,0; 6,5; 7,0; 8,0 e 9,0, por 16 horas a 4°C. Após este período, o pH de cada tratamento foi ajustado a 6,7 e determinou-se a atividade amilásica residual de *F. verticillioides*.

4.6.5- Massa Molecular Aparente

- **Inibidor solúvel em tampão e etanol:** A massa molecular aparente de inibidores purificados foi determinada em SDS-PAGE empregando acrilamida a 4% no gel concentrador e 13% no gel separador (SCHAGGER & von JAGOW, 1987) e corados com prata (BLOMM et al., 1987).

A massa molecular aparente do IA solúvel em tampão foi confirmada, procedendo zimograma nas mesmas condições de corrida eletroforética. A atividade foi detectada, lavando inicialmente o gel com tampão $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-NaOH}$ 0,05 M pH 6,7 contendo 2,5% de Triton X-100 por 30 min à temperatura ambiente. A seguir, imergiu-se em tampão $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-NaOH}$ 0,05 M pH 6,7 contendo 620 UA de *F. verticillioides* por 120 min à temperatura ambiente, lavado com tampão $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-NaOH}$ 0,05 M pH 6,7 e incubado por 150 min, sobreposto numa malha de agarose contendo 0,5% de amido. A atividade inibidora de amilase foi detectada, corando o gel e a malha de agarose com solução de iodo a 0,5% em KI a 5%, para visualizar banda de coloração azul, correspondente ao IA.

4.6.6- Determinação de Ponto Isoelétrico

- **Inibidor solúvel em tampão:** O ponto isoelétrico do IA foi determinado em gel Phast Media IEF 3–9, com pH de separação entre 3,0 a 9,0 (Phast-System, Pharmacia),

conforme condições de corrida descritas pelo fabricante (Separation Technique File No. 100). A banda de proteína foi visualizada com coloração de prata e o pI determinado pelo software Quantity One 4.2.1 (Bio Rad).

- **Inibidor solúvel em etanol:** Determinou-se pI em Rotofor Cell (Bio Rad), empregando anfolinas com pH entre 3,0 a 10,0. A corrida foi realizada em 15 W constante por 4 horas a 4°C. As 20 frações originadas foram coletadas, determinando-se pH e atividade inibidora de amilase.

4.6.7- Especificidade

- **Inibidor solúvel em tampão:** A especificidade do IA foi determinada perante amilase de diferentes fontes: *F. verticillioides*, *A. flavus*, amilase salivar e pancreática humana, milho germinado, β -amilase de cevada, *S. zeamais*, *T. castaneum*, *Z. subfasciatus*, *A. obtectus*, *P. truncatus* e *S. cerealella*. O IA (1,5 μ g) com as amilases correspondentes (0,2 AU) foram incubados por 30 min à temperatura ambiente em fosfato de sódio 0,05 M pH 7,0 para amilase salivar/pancreática humana e *F. verticillioides*; fosfato de sódio 0,05 M pH 6,0 para amilase de *A. flavus*, *A. obtectus*, *Z. subfasciatus* e *T. castaneum*; tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,0 para amilase de milho germinado, β -amilase de cevada, *S. cerealella*, *S. zeamais* e *P. truncatus*. A seguir, determinou-se a atividade amilásica residual.
- **Inibidor solúvel em etanol:** A especificidade do IA foi determinada perante amilase de diferentes fontes: *F. verticillioides*, amilase salivar e pancreática humana, pancreática suína, amilase de milho, arroz e cevada, β -amilase de cevada, *S. zeamais*, *T. castaneum*, *Z. subfasciatus*, *A. obtectus*, *P. truncatus* e *S. cerealella*. O IA (1,3 μ g) com as amilases correspondentes (0,2 AU) foram incubados por 30 min à temperatura ambiente em fosfato de sódio 0,05 M pH 7,0 para amilase salivar/pancreática humana e *F. verticillioides*; fosfato de sódio 0,05 M pH 6,0 para amilase de *A. obtectus*, *Z. subfasciatus* e *T. castaneum*; tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,0 para amilase de

milho, β -amilase de cevada, *S. cerealella*, *S. zeamais* e *P. truncatus*. A seguir, determinou-se a atividade amilásica residual.

4.6.8- Determinação de carboidratos

- **Inibidor solúvel em etanol:** A presença de carboidratos no IA foi analisada em SDS-PAGE, empregando acrilamida a 4% no gel concentrador e 10% no gel separador, seguida de visualização com reativo de Schiff (SCHAGGER & von JAGOW, 1987).

4.6.9- Fator Diluição

- **Inibidor solúvel em etanol:** A presença de agregados moleculares foi analisada, procedendo-se diluição de IA no fator 1:2, 1:4, 1:8 e 1:10 (fator 1:x significa que x μ L corresponde a 1 μ L de solução padrão). A atividade específica de IA foi determinada na solução padrão e em cada diluição, mantendo a quantidade de IA (1,3 μ g) constante em cada ensaio.

4.6.10- Composição de Aminoácidos

- **Inibidor solúvel em etanol:** A composição de aminoácidos do IA purificado foi determinada em CLAE empregando coluna de fase reversa, hidrolisando 260 μ g de proteína com 200 μ L de HCl 6N e 1% de fenol destilado a 105°C em tubo selado, durante 24 h a vácuo. A proteína hidrolisada foi seca e derivatizada com fenil isotiocianato, seca novamente e solubilizada em tampão fosfato 0,05M pH 7,4 : metanol (8:2 v/v), sendo 16 μ L injetado na coluna C-18 Pico-Tag e os resultados obtidos integrados (integrador modelo 19-740, Waters Chromatography, Millipore

Corp.). A cisteína foi determinada segundo THANHAUSER et al. (1987) modificado por CHAN & WASSERMAN (1993).

4.6.11- Atividade Antifúngica

- **Inibidor solúvel em etanol:** A atividade antifúngica foi determinada, inoculando $1,6 \times 10^6$ conídios de *F. verticillioides* em 1 mL de meio de cultivo constituído de amido a 1% e triptona a 0,13%, contendo 0, 25, 50, 100 e 200 µg de IA/mL.

Após 12 e 24 horas de incubação determinou-se a porcentagem de germinação dos conídios e tamanho dos micélios. O resultado constituiu na contagem de 100 células para avaliação da porcentagem de germinação e 40 células para determinação do tamanho dos micélios, realizados em 3 repetições.

4.7- Análise Microbiológica

Um kg de milho foi homogeneizado e uma amostra de aproximadamente 50 g finamente triturada. Uma alíquota de 10 g de milho triturado foi homogeneizada em 90 mL de água peptonada estéril a 0,1% e submetida a diluições seriadas até o fator 10^{-6} . De cada diluição semeou-se 1,0 mL em BDA (pH 4,0) contendo 50 µg/mL de cloranfenicol e incubou-se a 25°C por 6 dias. A contagem total de bolores e leveduras, *Fusarium* spp. e outros gêneros, identificados conforme NELSON et al. (1983), SINGH et al. (1991) e SAMSON et al. (1995), foram expressos em unidades formadoras de colônia - ufc/g.

4.8- Determinação de fumonisina

Na determinação de fumonisina empregou-se CLAE (SHEPHARD et al., 1990) modificado por UENO et al. (1993). Uma quantidade de 200 g de milho foi triturada

até atingir granulometria de 30-100 “mesh”, homogeneizada e 10 g adicionada a 30 mL de metanol:água (3:1, v/v) mantida a 150 rpm por 30 min. A suspensão foi centrifugada a 4.500 x g por 10 min e submetida à limpeza (minicoluna de troca aniônica Sep Pak accell plus QMA, Waters Co., Ltd.), sendo as fumonisinas eluídas com 10 mL de ácido acético a 0,5% em metanol. O eluato foi seco (N₂ a 40°C) e o resíduo solubilizado em metanol:água (3:1, v/v), derivatizado com o-ftaldialdeído e analisado em CLAE sistema isocrático de fase reversa, empregando coluna C₁₈ – CLC-ODS (M) (4,6 x 250 mm, Shimadzu). Os comprimentos de onda de excitação e emissão foram 335 nm e 450 nm, respectivamente. A fase móvel consistiu de CH₃OH:NaH₂PO₄ 0,1 M (80:20, v/v) pH 3,3, ajustado para o fluxo de 1,0 mL/min. Os limites de detecção para FB₁ e FB₂ foram de 50 ng/g e 80 ng/g, respectivamente.

4.9- Determinação de umidade

A umidade foi determinada por método de infravermelho (OHAUS[®], modelo MB200), através da desidratação de 10 g de farinha de milho desengordurada até peso constante. A porcentagem de umidade foi utilizada para o cálculo do nível de IA em base seca.

4.10- Análise estatística

O nível de IA nos híbridos foram analisados e comparados em software SAS, versão 6.12 (SAS Institute, 1988). O teste de Tukey foi aplicado para detectar diferenças significativas entre os híbridos ($P < 0,05$), determinando-se também a correlação entre IA, *Fusarium* spp. e concentração de fumonisinas. Outra aplicação do teste de Tukey foi comparar o grupo de híbridos de ciclo precoce e super precoce em relação ao nível de IA, contagem total de bolores e leveduras, contagem de *Fusarium* spp., *Penicillium* spp., *Cladosporium* spp. e levedura, e concentração de fumonisinas.

5- RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados e discussões foram compilados sob forma de artigos científicos para publicação. Abaixo encontram-se listados os três artigos elaborados:

- **“Inibidor de amilase em grãos de milho com atividade *in vitro* contra amilase de *Fusarium verticillioides*”**
- **“Inibidor de amilase hidrofóbico de milho (*Zea mays*) ativo contra amilase de *Fusarium verticillioides*”**
- **“Correlação entre microbiota fúngica, fumonisina e nível de inibidores de amilase nos híbridos de milho de ciclo precoce e super precoce”**

O trabalho “Inibidor de amilase em grãos de milho com atividade *in vitro* contra amilase de *Fusarium verticillioides*” contém os resultados referentes à micologia, fumonisinas e comparação estatística de IA solúvel em tampão, isolado de 37 híbridos de milho. A pesquisa avançou para a purificação e caracterização parcial de IA no híbrido selecionado AG5011, devido ao maior nível de IA. A proteína purificada apresentou massa molecular aparente de 23,8 kDa, pI 5,4 e termoestabilidade com 52% de atividade mantida a 94°C por 30 min. Embora estatisticamente a correlação não seja significativa, o aumento do nível de IA evidenciou declínio na contagem de *F. verticillioides* e diminuição dos níveis de fumonisina, em paralelo ao amplo espectro de inibição, atuando sobre amilase de insetos de importância agrícola. O trabalho foi aceito na revista “Plant Disease” em 26/08/2002.

O artigo “Inibidor de amilase hidrofóbico de milho (*Zea mays*) ativo contra amilase de *Fusarium verticillioides*” discerne sobre a purificação de outro IA (solúvel em etanol), uma molécula bioativa com massa molecular aparente de 19,7 kDa, pI 3,6 e termoestável, submetida à caracterização parcial. A característica peculiar consistiu no alto conteúdo de aminoácidos hidrofóbicos com destaque à valina (41,2%), aliado ao amplo espectro de atividade inibitória contra amilase de *A. flavus* e insetos de importância agrícola. O IA inibiu a germinação dos conídios de *F. verticillioides*, porém apresentou-se inativo sobre o crescimento micelial. O trabalho foi aceito na revista “Phytopathology” em 31/12/2002.

Salienta-se que os dois trabalhos acima mencionados, contendo resultados promissores sobre defesa natural de plantas, abre novas perspectivas e aplicação

biotecnológica para o controle de fungos micotoxigênicos em grãos, ampliando o interesse atual sobre inibidores ainda concentrado no controle de insetos.

No trabalho intitulado “Correlação entre microbiota fúngica, fumonisina e nível de inibidores de amilase nos híbridos de milho de ciclo precoce e super precoce” encontram-se compilados os resultados detalhados referentes a comparação dos níveis de IA solúvel em tampão, microbiota fúngica e fumonisina em híbridos de milho agrupados em ciclo precoce e super precoce. O trabalho visou fornecer subsídios adicionais na escolha de melhor ciclo destinado ao plantio. Salienta-se que a decisão pelo híbrido depende ainda de fatores regionais, solo, disponibilidade de sementes, destino da produção e custo. Para a publicação, os resultados serão complementados com os dados de avaliações agronômicas fornecidos pelo pesquisador Antônio Carlos Gerage (IAPAR-Londrina), que efetivamente executou o plantio, cultivo e cuidado agrícola dos híbridos. Pretende-se encaminhar à revista científica de circulação nacional, em vista da praticidade dos resultados, aliado ao interesse de produtores/consultores nacionais.

Inibidor de Amilase em Grãos de Milho com Atividade *in vitro* Contra Amilase de *Fusarium verticillioides*

RESUMO

A triagem na detecção de inibidores de amilase (IA) contra amilase de *Fusarium verticillioides* (*Fusarium moniliforme*), o principal constituinte da micoflora do milho, foi realizada em 37 híbridos. O nível de IA variou de 5,5 a 16,0 unidades inibidoras de amilase (UIA/g) por grama de milho nos híbridos MASTER e AG5011, respectivamente. O híbrido com maior atividade inibidora de amilase foi utilizado na purificação da nova proteína por precipitação fracionada com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, cromatografia de filtração em gel (Sephadex G-75), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em coluna de Superose HR 10/30 e troca aniônica em CLAE, obtendo 20,7 vezes de purificação. A massa molecular aparente de 23,8 kDa foi determinada em SDS-PAGE sob condições redutoras com pI ácido de 5,4, diferindo de outros inibidores descritos em milho (14 e 22 kDa). O IA apresentou amplo espectro de atividade, inibindo amilase salivar e pancreática humana, de fungos como *F. verticillioides* e *A. flavus*, de insetos como *A. obtectus*, *Z. subfasciatus*, *T. castaneum* e *S. cerealella*. *Fusarium* spp. foi o principal contaminante do milho (81,1% das amostras) com contagem entre $1,5 \times 10^2$ a $2,4 \times 10^6$ ufc/g de milho, e fumonisina foi detectada em 21 híbridos com concentrações de 0,05 a 2,67 μg de FB/g de milho. No entanto, a correlação entre o nível de IA nos grãos de milho com a presença de *Fusarium* spp. e fumonisina nas condições experimentais avaliadas não foi significativa.

Palavras-chave: inibidor de amilase, *Fusarium verticillioides*, resistência de milho a fungos.

INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) constitui a base da alimentação humana em vários países, apresentando destacada importância econômica principalmente em países desenvolvidos (MUNKVOLD & DESJARDINS, 1997). No entanto, suas características nutricionais o expõe ao constante ataque de fungos e insetos predadores (WATSON & RAMSTAD, 1987).

Fusarium verticillioides, *F. proliferatum*, *F. oxysporum*, *F. graminearum*, *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *Cladosporium* spp. e *Penicillium* spp. são os principais fungos que constituem a micoflora do milho, sendo que *F. verticillioides* é o mais frequente (GONZÁLEZ et al., 1995; LOGRIECO et al., 1995; KEDERA et al., 1999). O principal efeito relacionado ao ataque fúngico no milho é a produção de metabólitos secundários, particularmente a fumonisina, zearalenona e aflatoxina, produzidos por *F. verticillioides*, *F. graminearum* e *A. flavus*, respectivamente (SCOTT, 1993; SCOTT & ZUMMO, 1994). A zearalenona é estrogênica causando infertilidade e problema reprodutivo nos suínos (KUIPER-GOODMAN et al., 1987). A aflatoxina é um potente teratogênico, mutagênico e hepatocarcinogênico (WONG et al., 1976; WANG et al., 2001), enquanto que a fumonisina tem sido relacionada com a atividade promotora de câncer, e responsável por doenças em animais (BULLERMAN & DRAUGHON, 1994; NORRED & VOSS, 1994). A co-ocorrência de fumonisina e aflatoxina B₁ (AFB₁) apresenta importante função na promoção de carcinogêneses (UENO, 2000), sendo que a análise de micotoxinas em amostras de milho proveniente de vários estados brasileiros, demonstrou positividade de 12,3% para AFB₁ (SABINO et al., 1989) e no Estado do Paraná (responsável pela produção de 25% da safra a nível nacional) houve alta ocorrência de *F. verticillioides* associada com a ocorrência natural de fumonisina (ONO et al., 2001). Tanto a contaminação fúngica como a de micotoxinas são desafios a serem minimizados e discutidos amplamente no mercado internacional de grãos.

Aumentando as defesas naturais das plantas poderia aumentar a produtividade agrícola, assim como a segurança alimentar devido a redução do uso de pesticidas e minimização da contaminação por micotoxinas nos grãos (GOMES & XAVIER-FILHO, 1994; HUANG et al., 1997; CHEN et al., 1999). Neste contexto, destacam-se os inibidores enzimáticos, com ênfase nos inibidores de amilase (IA), cujo estudo em milho iniciou-se a partir de 1980 com o isolamento de um IA ativo contra α -amilase de insetos (BLANCO-LABRA & ITURBE-CHIÑAS, 1981). BLANCO-LABRA et al. (1995)

caracterizaram uma proteína bifuncional com massa molecular aparente de 12 kDa, apresentando atividade contra α -amilase de insetos como *Tribolium castaneum* e *Callosobruchus maculatus*, assim como protease bovina e fúngica (*A. niger* e *A. fumigatus*). CHEN et al. (1999) detectaram a presença de um inibidor de tripsina em milho com atividade sobre a síntese de α -amilase de *A. flavus*, além de inibir a atividade enzimática e o crescimento do fungo. Esses resultados destacam o potencial da utilização dos mecanismos naturais de defesa das plantas, cuja importância do milho na cadeia alimentar associada com os sérios riscos das micotoxinas, tem apontado a necessidade do desenvolvimento de novos híbridos resistentes aos fungos (GATEHOUSE et al., 1992; GOMES & XAVIER-FILHO, 1994).

O objetivo do trabalho foi avaliar o nível de IA presente em milho com atividade *in vitro* contra amilase de *F. verticillioides*, assim como avaliar sua possível relação com a contaminação fúngica e concentração de fumonisina em 37 híbridos de milho cultivados na safrinha de 1997. O híbrido com maior atividade enzimática foi utilizado na purificação e caracterização parcial do IA contra amilase de *F. verticillioides*.

MATERIAL E MÉTODOS

Híbridos de milho: O monitoramento sobre inibidores de amilase (IA), microbiota fúngica e fumonisinas foi realizado em 37 híbridos de milho, sendo 21 pertencentes ao ciclo precoce e 16 ao ciclo super precoce, cultivados na Fazenda Experimental do Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR-Londrina), no período de março a setembro/1997 (safrinha de 1997). Os híbridos foram cultivados sob responsabilidade do pesquisador Antônio Carlos Gerage e envolvidos no Programa de Orientação ao Produtor do IAPAR. Cada híbrido foi plantado em quatro linhas de cinco metros lineares, espaçados de 0,9 m. Após desbaste, manteve-se quatro plantas por metro linear, considerando como área útil para a coleta de informações, as duas linhas centrais (9 m²). Após colheita, os grãos foram secos à temperatura ambiente até atingir 14% de umidade e armazenados a -20°C.

Amilase: Linhagens de *F. verticillioides* 113F e *A. flavus* foram isoladas de ração envolvida em intoxicação animal e mantidas em ágar batata dextrose (BDA) a 4°C com ativação semestral. As amilases foram produzidas no meio de cultivo descrito por FIGUEIRA &

HIROOKA (2000), inoculando os conídios fúngicos em 480 mL de meio composto por 2% de farinha de milho em sobrenadante de milho verde. Após 20 dias a 25°C, a fermentação foi interrompida e centrifugada a 5.000 x g (10 min, 4°C) e o sobrenadante utilizado como fonte de amilase.

As amilases salivar e pancreática humana foram adquiridas de Amersham Pharmacia Biotech, enquanto que a β -amilase de cevada foi obtida de Sigma Chemical Co. Amilases de insetos foram preparadas no laboratório conforme preconizado por BLANCO-LABRA et al. (1995). Os insetos foram desenvolvidos no insetário do Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV-Unidade Irapuato), sendo a fase larvária de *Prostephanus truncatus*, *Sitotroga cerealella*, *Sitophilus zeamais* cultivada em grãos de milho; *Tribolium castaneum* foi cultivado em farinha de trigo; *Zabrotes subfasciatus* e *Acanthoscelides obtectus* em feijão. Os cultivos foram mantidos em câmara incubadora a 28°C, com 65-75% de umidade relativa. Na extração de amilases, as larvas de cada inseto foram homogeneizadas com tampões na proporção 1:5 (p/v). Para amilase de *P. truncatus*, procedeu-se à extração com tampão succínico 0,04 M (pH 6,5) contendo 0,1 M de NaCl; a amilase de *S. zeamais*, *T. castaneum*, *Z. subfasciatus*, *A. obtectus* e *S. cerealella* foi extraída com tampão succínico 0,2 M (pH 4,5). As suspensões foram centrifugadas a 10.000 x g (10 min, 4°C) e o sobrenadante utilizado como fonte de amilase.

A amilase de milho foi extraída de sementes, após 5 dias de germinação, com CaCl₂ a 0,01 M.

Análise microbiológica: Um kg de milho foi homogeneizado e uma amostra representativa finamente triturada. Uma alíquota de 10 g de milho triturado foi homogeneizada em 90 mL de água peptonada estéril a 0,1% e submetida a diluições seriadas até o fator 10⁻⁶. De cada diluição semeou-se 1,0 mL em BDA (pH 4,0) contendo 50 µg/mL de cloranfenicol e incubou-se a 25°C por 6 dias. A contagem total de bolores e leveduras, *Fusarium* spp. e outros gêneros, identificados conforme NELSON et al. (1983), SINGH et al. (1991) e SAMSON et al. (1995), foram expressos em unidades formadoras de colônia - ufc/g.

Determinação de fumonisina: Na determinação de fumonisinas empregou-se CLAE (SHEPHARD et al., 1990) modificado por UENO et al. (1993). Uma quantidade de 200 g de milho foi triturada até atingir granulometria de 30-100 “mesh”, homogeneizada e 10 g adicionada a 30 mL de metanol:água (3:1, v/v) mantida a 150 rpm por 30 min. A suspensão

foi centrifugada a 4.500 x g por 10 min e submetida à limpeza (minicoluna de troca aniônica Sep Pak accell plus QMA, Waters Co., Ltd.), sendo as fumonisinas eluídas com 10 mL de ácido acético a 0,5% em metanol. O eluato foi seco (N_2 a 40°C) e o resíduo solubilizado em metanol:água (3:1, v/v), derivatizado com o-ftaldialdeído e analisado em CLAE sistema isocrático de fase reversa, empregando coluna C_{18} – CLC-ODS (M) (4,6 x 250 mm, Shimadzu). Os comprimentos de onda de excitação e emissão foram 335 nm e 450 nm, respectivamente. A fase móvel consistiu de $CH_3OH:NaH_2PO_4$ 0,1 M (80:20, v/v) pH 3,3, ajustado para o fluxo de 1,0 mL/min. Os limites de detecção para FB_1 e FB_2 foram de 50 ng/g e 80 ng/g, respectivamente.

Extração de inibidor de amilase: Os grãos de milho foram inicialmente triturados até granulometria máxima de 48 mesh (moinho Janke & Kunkel, modado A10) e desengordurados por homogeneização da farinha com acetona (1:1 p/v) durante 15 min. Após decantação, a acetona foi descartada. O processo foi repetido por mais 3 vezes e a farinha desengordurada seca à temperatura ambiente e armazenada a -20°C.

Na extração de IA, a farinha de milho desengordurada foi homogeneizada durante 12 horas a 4°C com tampão acetato de sódio 0,1 M pH 6,0 (1:5 p/v). As proteínas solúveis foram obtidas por centrifugação a 30.000 x g (20 min, 4°C) e submetidas a precipitação fracionada com sulfato de amônio entre 30-60% de saturação. O precipitado (P_{30-60}) foi coletado após centrifugação a 30.000 x g (20 min, 4°C), solubilizado em tampão KH_2PO_4-NaOH 0,05 M pH 6,7 e dialisado contra o mesmo tampão. Os extratos foram centrifugados a 15.000 x g (15 min, 4°C) e o sobrenadante armazenado a -20°C.

Atividade inibidora de amilase: Para o monitoramento de IA nos 37 híbridos de milho, a atividade amilásica foi determinada por método iodométrico (WILSON & INGLEDEW, 1982). Uma unidade amilásica (UA) foi arbitrariamente definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 0,1 mg de amido em 10 min de reação a 40°C, na presença de 5,0 mg de amido.

A atividade inibidora de amilase foi determinada, pré-incubando 0,25 mL de amilase de *F. verticillioides* contendo 15 UA com 0,25 mL de extrato de milho adequadamente diluído (30 min, 40°C), para obter 50% de inibição enzimática. A atividade amilásica residual foi determinada, adicionando 1,0 mL de solução de amido 0,5% mantida a 40°C, e transcorridos 10 min de reação, transferiu-se 0,2 mL desta mistura para um tubo

contendo 5,0 mL da solução de iodo e a absorbância foi medida a 540 nm. O branco consistiu de 5,0 mL da solução de iodo adicionado de 0,2 mL de água deionizada. O controle de amido consistiu de 5,0 mL da solução de iodo adicionado de 0,2 mL de uma mistura de amido em tampão $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-NaOH}$ 0,05M pH 6,0 na proporção 2:1. Uma unidade inibidora de amilase (UIA) foi arbitrariamente definida como a quantidade de IA necessária para inibir 1 UA nas condições de ensaio e expressa em UIA/g de milho em base seca (bs). Os resultados obtidos foram calculados conforme equações 1 e 2. A equação 1 foi utilizada para determinar atividade amilásica inicial sem a interação com IA, enquanto que na equação 2 determinou-se a atividade inibidora de amilase em unidades de inibição por mL de extrato contendo IA.

$$UA = \frac{7,5 \times \left[0,667 - \left(\frac{A \times 0,667}{B} \right) \right]}{0,1} \quad (1)$$

$$UIA / ml = \left\{ UA - \left\{ \frac{7,5 \times \left[0,667 - \left(\frac{C \times 0,667}{D} \right) \right]}{0,1} \right\} \right\} \times \frac{1000}{\text{extrato de AI } (\mu\text{l})} \quad (2)$$

Onde: **UA** = atividade amilásica sem interação com o IA (controle da atividade amilásica); **A** = absorbância (DO) a 540 nm, correspondente ao controle de amilase; **B** = DO a 540 nm correspondente ao controle de amido; **C** = DO a 540 nm correspondente a interação entre amilase e IA; **D** = DO a 540 nm correspondente ao controle de amido da interação entre amilase e IA.

Durante a purificação e caracterização parcial dos IA, a atividade amilásica foi determinada por método iodométrico (WILSON & INGLEDEW, 1982), modificado para determinação em microplacas de 96 poços. A atividade inibidora de amilase foi determinada, pré-incubando o inibidor de amilase com 0,2 UA (volume final de 70 μL visando obter redução de 50% na atividade amilásica inicial) por 10 min a 25°C, para o inibidor extraído com solução tampão; 30 min a 25°C, para o inibidor extraído com etanol 95%. A seguir mediu-se a atividade amilásica residual.

Uma unidade inibidora de amilase (UIA) foi arbitrariamente definida como a quantidade de proteína necessária para inibir 1 UA, nas condições de ensaio. Uma UA foi definido como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 0,1 mg de amido em 60 min a 25°C, na presença de 0,038 mg de amido. Os resultados obtidos foram calculados empregando as equações 3 e 4, sendo que a equação 3 foi utilizada na determinação da

atividade amilásica inicial sem a interação com IA, enquanto que na equação 4 determinou-se a atividade inibidora de amilase em unidades de inibição por mL de extrato contendo IA.

$$UA = \frac{\left[0,038 - \left(\frac{A \times 0,038}{B} \right) \right]}{0,1} \quad (3)$$

$$UIA / ml = \left\{ UA - \left\{ \frac{\left[0,038 - \left(\frac{C \times 0,038}{D} \right) \right]}{0,1} \right\} \right\} \times \frac{1000}{\text{extrato de IA } (\mu l)} \quad (4)$$

Onde: **UA** = atividade amilásica sem interação com o IA (controle da atividade amilásica); **A** = absorbância (DO) a 630 nm, correspondente ao controle de amilase; **B** = DO a 630 nm, correspondente ao controle de amido; **C** = DO a 630 nm, correspondente a interação entre amilase e IA; **D** = DO a 630 nm, correspondente ao controle de amido da interação entre amilase e IA.

Determinação de proteína: A concentração de proteína foi determinada por BRADFORD (1976), usando albumina sérica bovina como padrão.

Extração e purificação parcial do IA: O híbrido AG5011 foi selecionado como fonte de IA, devido sua alta atividade inibidora de amilase contra a enzima de *F. verticillioides*.

Na extração de IA, a farinha de milho desengordurada foi homogeneizada durante 12 horas a 4°C com tampão acetato de sódio 0,1 M pH 6,0 (1:5 p/v). As proteínas solúveis foram obtidas por centrifugação a 30.000 x g (20 min, 4°C) e submetidas a precipitação fracionada com sulfato de amônio entre 30-60% de saturação. O precipitado (P₃₀₋₆₀) foi coletado após centrifugação a 30.000 x g (20 min, 4°C), solubilizado em tampão Tris-HCl 0,01 M pH 8,0 e concentrado por ultrafiltração com membrana de exclusão molecular de 30 kDa.

O extrato concentrado foi fracionado em coluna de filtração molecular contendo Sephadex G-75 (166 x 1,6 cm), equilibrada com solução de bicarbonato de amônio 0,01 M pH 8,2 e eluída sob fluxo de 15 mL/h, coletando-se 7 mL por fração. O perfil cromatográfico foi determinado, monitorando proteína a 280 nm e atividade inibidora de amilase. As frações ativas foram coletadas, liofilizadas, solubilizadas em tampão Tris-HCl 0,01 M pH 7,5 e fracionadas em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) usando coluna de Superose 12HR 10/30 (Pharmacia Fine Chemicals) equilibrada com o mesmo tampão. A eluição foi conduzida a fluxo de 0,4 mL/min e o pico ativo coletado, concentrado por ultrafiltração com membrana de exclusão molecular de 10 kDa. O extrato obtido foi utilizado na caracterização parcial do inibidor de amilase, assim como submetido ao último passo de purificação em CLAE usando coluna de troca iônica Vydac 300 VHP 575 (0,75 cm i.d. x 5,0 cm) equilibrada com tampão Tris-HCl 0,01 M pH 7,5. A separação procedeu-se em gradiente linear de NaCl no mesmo tampão, entre 0 a 0,5 M de NaCl em 120 min. A separação foi monitorada a 220 nm e o pico ativo coletado e armazenado a -20°C, utilizado para determinar o ponto isoelétrico e a massa molecular aparente.

Tempo de pré-incubação: 1,5 µg de IA foi pré-incubado em tampão KH₂PO₄-NaOH 0,05 M pH 6,7 por 0, 5, 10, 20 e 30 min a 25°C com 0,2 UA de *F. verticillioides*, determinando-se a atividade amilásica residual.

Estabilidade térmica: 1,5 µg de IA foi pré-incubado em tampão KH₂PO₄-NaOH 0,05 M pH 6,7 por 30 min a 25, 40, 70 e 94°C, imediatamente refrigerado, adicionado de 0,2 UA de *F. verticillioides* e após incubação a 25°C por 10 min, determinou-se a atividade amilásica residual.

Efeito do pH sobre a atividade inibidora de amilase: O efeito do pH sobre a atividade inibidora contra amilase de *F. verticillioides* foi analisada em pH 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0 e 9,0 empregando os tampões acetato de sódio 0,05 M (pH 4,0 e 5,0); fosfato de sódio 0,05 M (pH 6,0 e 7,0); Tris-HCl (pH 8,0 e 9,0). O IA (1,5 µg) e amilase (0,2 UA) foram pré-incubados por 30 min a 25°C em cada pH, determinando-se a atividade amilásica em cada pH correspondente.

Determinação da massa molecular aparente: A massa molecular aparente de inibidores purificados foi determinada em SDS-PAGE empregando acrilamida a 4% no gel concentrador e 13% no gel separador (SCHAGGER & von JAGOW, 1987) e corados com prata (BLOMM et al., 1987).

A massa molecular aparente do IA solúvel em tampão foi confirmada, procedendo ao zimograma nas mesmas condições de corrida eletroforética. A atividade foi detectada, lavando inicialmente o gel com tampão $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-NaOH}$ 0,05 M pH 6,7 contendo 2,5% de Triton X-100 por 30 min à temperatura ambiente. A seguir, imergiu-se em tampão $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-NaOH}$ 0,05 M pH 6,7 contendo 620 UA de *F. verticillioides* por 120 min à temperatura ambiente, lavado com tampão $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-NaOH}$ 0,05 M pH 6,7 e incubado por 150 min, sobreposto numa malha de agarose contendo 0,5% de amido. A atividade inibidora de amilase foi detectada, corando o gel e a malha de agarose com solução de iodo a 0,5% em KI a 5%, para visualizar a banda de coloração azul, correspondente ao IA.

Determinação do ponto isoelétrico: O ponto isoelétrico do IA foi determinado em gel Phast Media IEF 3–9, com pH de separação entre 3,0 a 9,0 (Phast-System, Pharmacia), conforme condições de corrida descritas pelo fabricante (Separation Technique File No. 100). A banda de proteína foi visualizada com coloração de prata e o pI determinado pelo software Quantity One 4.2.1 (Bio Rad).

Especificidade: A especificidade do IA foi determinada perante amilase de diferentes fontes: *F. verticillioides*, *A. flavus*, amilase salivar e pancreática humana, milho germinado, β -amilase de cevada, *S. zeamais*, *T. castaneum*, *Z. subfasciatus*, *A. obtectus*, *P. truncatus* e *S. cerealella*. O IA (1,5 μg) com as amilases correspondentes (0,2 AU) foram incubados por 30 min à temperatura ambiente em fosfato de sódio 0,05 M pH 7,0 para amilase salivar/pancreática humana e *F. verticillioides*; fosfato de sódio 0,05 M pH 6,0 para amilase de *A. flavus*, *A. obtectus*, *Z. subfasciatus* e *T. castaneum*; tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,0 para amilase de milho germinado, β -amilase de cevada, *S. cerealella*, *S. zeamais* e *P. truncatus*. A seguir, determinou-se a atividade amilásica residual.

Determinação de umidade: A umidade foi determinada por método de infravermelho (OHAUS[®], modelo MB200), através da desidratação de 10 g de farinha de milho desengordurada até peso constante. A porcentagem de umidade foi utilizada para o cálculo do

nível de IA em base seca.

Análise estatística: Os níveis de IA nos híbridos foram analisados e comparados em software SAS, versão 6.12 (SAS Institute, 1988). O teste de Tukey foi aplicado para detectar diferenças significativas entre os híbridos ($P < 0,05$), determinando-se também a correlação entre AI, *Fusarium* spp. e concentração de fumonisina.

RESULTADOS

A atividade inibidora de amilase contra a enzima de *F. verticillioides* foi detectada nos 37 híbridos de milho (Tabela 1). A análise de variância dos níveis de IA demonstrou diferença significativa entre os híbridos ($P < 0,05$), com variação de 5,5 a 16,0 UIA/g de milho nos híbridos MASTER e AG5011, respectivamente, com coeficiente de variação de 6,5% e diferença mínima significativa de 1,2 (Tabela 1).

O híbrido AG5011 foi utilizado na purificação e caracterização parcial do IA, por apresentar maior atividade. Os resultados sobre a purificação parcial do IA encontram-se resumidos na Tabela 2. Após precipitação fracionada com sulfato de amônio entre 30-60% de saturação e ultrafiltração, o concentrado foi submetido a filtração em Sephadex G-75. As frações ativas foram concentradas (Figura 1A), resultando em um aumento de 1,9 vezes na atividade específica (Tabela 2). Após cromatografia em Superose 12 HR 10/30 (CLAE) a atividade específica aumentou 6,9 vezes e o pico ativo (Figura 1B) foi concentrado e aplicado em coluna de troca iônica Vydac 300 VHP 575, resultando em um aumento adicional de 20,7 vezes na atividade específica (Tabela 1). O pico ativo (Figura 1C) foi utilizado para determinação da massa molecular aparente e do ponto isoelétrico.

A massa molecular aparente determinada por cromatografia em Superose 12 HR 10/30 foi de 80 kDa (dados não apresentados). No entanto, quando determinada por SDS-PAGE em condições redutoras e confirmada por zimograma, a massa molecular aparente foi de 23,8 kDa (Figuras 2A e 2C). Cujo ponto isoelétrico, determinado em Phast System (Pharmacia) apresentou-se ácido, com pI de 5,4 (Figura 2B).

A máxima atividade inibidora de amilase requereu tempo de pré-incubação mínima de 10 min entre a amilase e o inibidor (dados não apresentados), sendo que o IA apresentou considerável estabilidade térmica (Tabela 3), retendo 52% da atividade após

tratamento a 94°C por 30 min. O efeito do pH sobre a atividade inibidora determinado contra amilase de *F. verticillioides* apresentou máxima atividade em pH 7,0 (Figura 3).

O IA apresentou amplo espectro de inibição, inibindo amilase de *F. verticillioides* e *A. flavus*, além de inibir amilase de insetos de importância econômica como *A. obtectus*, *Z. subfasciatus*, *T. castaneum* e *S. cerealella*, no entanto, não inibiu amilase de *S. zeamais* e *P. truncatus*. As amilases salivar e pancreática humana foram inibidas, porém não ocorreu inibição sobre amilase de milho e β -amilase de cevada (Tabela 4).

A Tabela 5 mostra a micoflora e a concentração de fumonisina nos híbridos de milho. A contagem total de bolores e leveduras variou de $1,2 \times 10^3$ a $2,4 \times 10^6$ ufc/g. *Fusarium* spp. (81,1% das amostras) foi o maior contaminante (contagem entre $1,5 \times 10^2$ a $2,4 \times 10^6$ ufc/g), seguido por *Penicillium* spp. detectado em 54,1% das amostras (contagem entre $1,0 \times 10^2$ a $4,0 \times 10^5$ ufc/g). *Aspergillus* spp. ocorreu em 5,4% das amostras (contagem entre $5,0 \times 10^2$ a $5,0 \times 10^4$ ufc/g), *Cladosporium* spp. em 32,4% (contagem entre $5,0 \times 10^2$ a $5,0 \times 10^5$ ufc/g) e leveduras em 78,4% das amostras (contagem entre $4,0 \times 10^2$ a $5,6 \times 10^5$ ufc/g).

Fumonisinias (FB₁ + FB₂) foram detectadas em 21 amostras estudadas (56,8%), com concentrações de 0,05 a 2,67 μ g de FB/g de milho (Tabela 5). Nos híbridos AS32, XL360 e DINA766 (Tabela 5) não foi detectado *Fusarium* spp., porém apresentaram-se contaminados por fumonisina. No entanto, estas amostras apresentaram alta contagem de leveduras (Tabela 5) que poderia interferir no crescimento de *Fusarium* spp. (PETERSON et al., 1998; CAMILO et al., 2000).

A correlação entre as fumonisinias e o IA foi determinada com os dados de contagem de *Fusarium* spp., concentração de fumonisina e nível de IA (Figura 4), sendo que os 37 híbridos de milho foram agrupados em 6 classes segundo o nível de IA. Verificou-se a tendência na diminuição de contagem de *Fusarium* spp. ($r = -0,48$) e concentração de fumonisina ($r = -0,37$) com o aumento do nível de IA, entretanto, a análise estatística não foi significativa indicando que não há correlação entre os parâmetros estudados.

DISCUSSÃO

Os inibidores de amilase são bastante estudados como mecanismo de resistência a insetos, entretanto há pouca informação como mecanismo de defesa contra fungos. Recentemente, FAKHOURY & WOLOSHUK (2001) estudaram um IA com 38 kDa

de *Lablab purpureus* com atividade contra amilase e crescimento de *A. flavus*.

O novo IA estudado apresenta-se diferente aos de 12 e 14 kDa previamente descritos devido a diferença de massa molecular aparente e especificidade (BLANCO-LABRA et al., 1995; CHEN et al., 1999), e o pI o difere do IA com 22 kDa, já que este possui pI básico enquanto que a nova proteína tem pI de 5,4 (HUYNH et al., 1992; GÓMEZ-LEVYA & BLANCO-LABRA, 2001). Em adição, GÓMEZ-LEVYA & BLANCO-LABRA (2001), demonstraram recentemente que a proteína com 22 kDa altamente pura não possui atividade inibidora de amilase. O novo inibidor apresenta amplo espectro de inibição, com potencial uso no controle de pragas agrícolas.

GONZÁLEZ et al. (1995), em avaliação semelhante na Argentina também detectaram a predominância de *Fusarium* spp., tanto em frequência como em densidade relativa, seguida de *Penicillium* spp., *Alternaria* spp., *Aspergillus* spp., *Cladosporium* spp., *Nigrospora* spp. e *Trichoderma* spp. Fusaria foi o mais predominante na micoflora interna, enquanto que *Penicillium* spp. foi o mais predominante na microbiota externa do milho. Outros levantamentos realizados no Brasil (HIROOKA et al., 1996), Estados Unidos da América (MUNKVOLD & DESJARDINS, 1997), Honduras (JULIAN et al., 1995), Comunidade Européia (DOKO et al., 1995) e Itália (LOGRIECO et al., 1995) analisaram a importância do *F. verticillioides* como importante patógeno primário a nível de campo e armazenagem do milho.

Na tabela 5 observa-se que a concentração de fumonisina nos híbridos avaliados foi menor que os níveis encontrados em vários levantamentos (MURPHY et al., 1993; DOKO et al., 1995; LOGRIECO et al., 1995; MUNKVOLD & DESJARDINS, 1997), incluindo análises previamente realizadas por nosso grupo (HIROOKA et al., 1996; ONO et al., 2001), entretanto os resultados obtidos são semelhantes aos de MUNKVOLD & MCKEAN (1994) e SHEPHARD et al. (1996). Uma possível explicação para os baixos níveis de fumonisina seria as condições controladas com cuidados agrônômicos adequados, assim como a secagem imediata dos grãos após a colheita.

No entanto, como demonstrado por FAKHOURY & WOLOSHUK (2001) há evidências para sugerir que os inibidores de amilase poderiam contribuir na resistência a fungos patogênicos. O novo IA, cujos resultados de laboratório têm demonstrado atividade contra amilase de *F. verticillioides* não mostrou correlação a nível de campo com a contaminação por *Fusarium* spp. e fumonisina. Os efeitos “*in vivo*” poderiam ser influenciados pelas condições utilizadas, contaminação por leveduras ou a proteína poderia

ser degradada pela atividade de enzimas proteolíticas, no entanto a especificidade da proteína com atividade sobre enzimas de insetos e fungos de importância agrícola, abre novas perspectivas para sua aplicação.

Tabela 1: Nível de inibidor de amilase contra amilase de *F. verticillioides* nos 37 híbridos de milho.

Híbrido	Nível de IA (UIA/g)	Híbrido	Nível de IA (UIA/g)
AG5011	15,97±0,42 ^a	DINA766	9,76±0,42 ^{ghij}
ZEN8490	15,54±1,03 ^a	EXCELER	9,75±0,71 ^{ghij}
XL360	14,07±0,16 ^{ab}	AG3010	9,71±0,69 ^{ghij}
XL220	14,05±0,48 ^{ab}	DENSUS	9,71±0,82 ^{ghij}
FT9006	13,93±0,22 ^{abc}	AS32	9,69±0,23 ^{ghij}
XL Exp9663	13,82±0,75 ^{abc}	BR205	9,67±0,30 ^{ghijk}
AGX9682	13,24±1,80 ^{bcd}	AGX9632	9,54±0,99 ^{ghijk}
XL221	12,91±0,71 ^{bcd}	AS3466	9,46±0,52 ^{hijk}
DINA556	12,51±0,43 ^{bcdef}	AG122	9,45±0,81 ^{hijk}
C435	12,42±0,98 ^{bcdef}	P3071	9,31±0,64 ^{ijk}
FT9043	11,75±0,72 ^{cdefg}	ZEN8202	9,29±0,42 ^{ijk}
C625	11,65±0,51 ^{cdefgh}	DINA1000	9,16±0,16 ^{ijkl}
ZEN8392	11,26±0,47 ^{defghi}	BR3123	8,54±0,70 ^{ijklm}
C701	10,82±0,87 ^{efghi}	BR206	8,38±0,75 ^{ijklm}
C333	10,57±0,68 ^{fghij}	P3027	7,46±0,67 ^{klmn}
P3041	10,56±0,15 ^{fghij}	XL345	6,98±1,47 ^{lmn}
DINA769	10,43±0,85 ^{fghij}	ZEN8501	6,70±0,53 ^{mn}
C901	10,33±1,02 ^{fghij}	MASTER	5,48±0,36 ⁿ
SG150	10,10±0,80 ^{ghij}		

a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l, m, n: diferença significativa determinado por teste de Tukey $P < 0,05$).

UIA/g: unidade inibidora de amilase em milho (bs, média ± desvio padrão; n = 3).

Coefficiente de variação: 6,49%

Diferença mínima significativa: 1,20

Tabela 2: Etapas da purificação do inibidor de amilase.

Procedimento	Atividade Específica (UIA/mg de proteína)	Rendimento (%)	Purificação (vezes)
Extrato bruto	5,5	100,0	1,0
Precipitação fracionada com sulfato de amônio	8,7	57,6	1,6
Filtração em gel (G-75)	10,3	17,4	1,9
Filtração em gel-CLAE	38,0	17,4	6,9
Troca iônica-CLAE	113,4	3,6	20,7

Tabela 3: Termoestabilidade do IA após tratamento térmico de 30 min.

Temperatura (°C)	% Inibição comparado com resultados obtidos a 25°C
25	100,0±7,5 ^a
40	112,2±9,2 ^a
70	69,8±5,1 ^b
94	52,0±2,9 ^c

a, b, c: diferença significativa determinada pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Inibição (%): valor relativo comparado com resultados do tratamento a 25°C (média ± desvio padrão; n = 3).

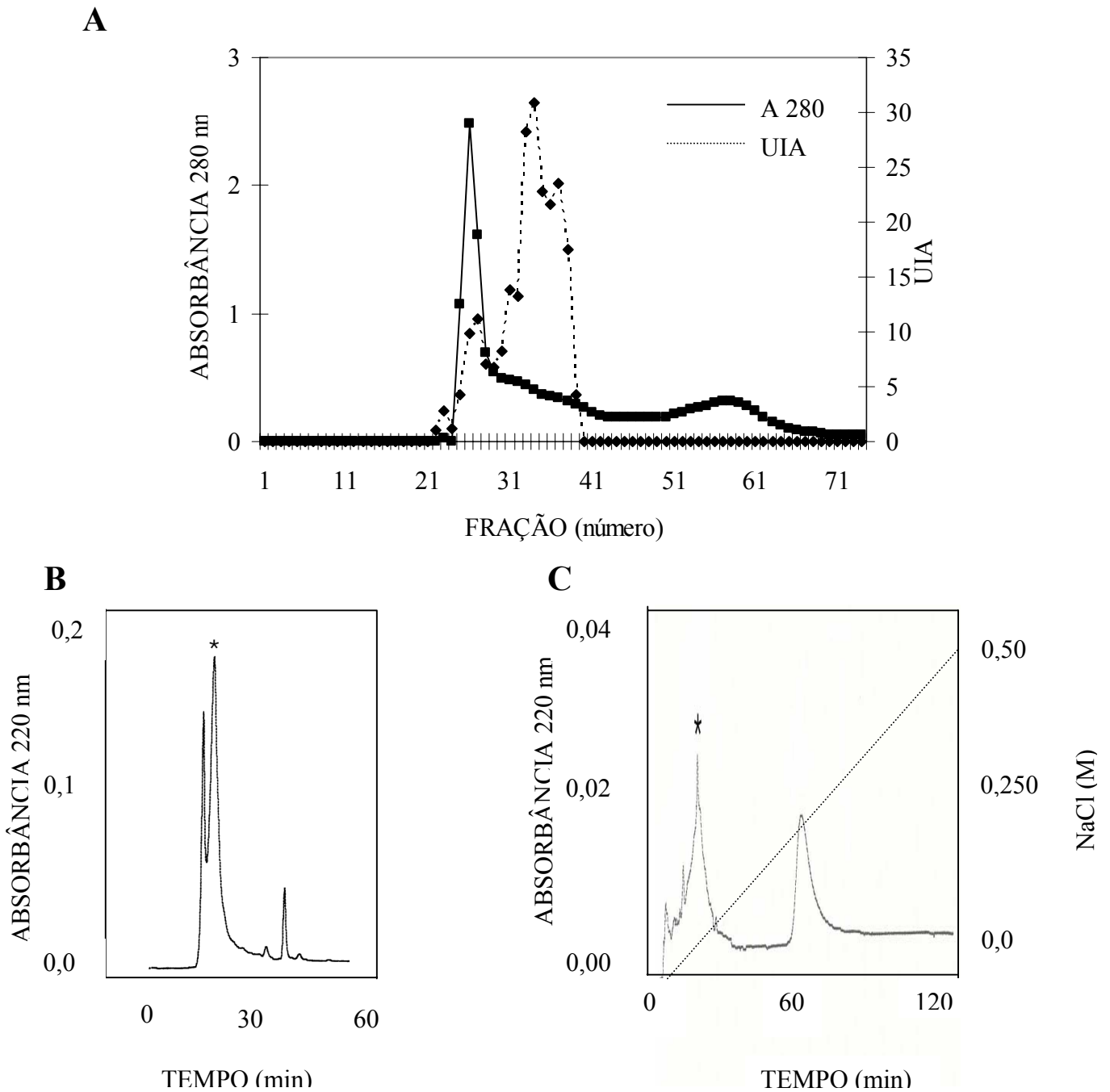
Coefficiente de variação: 7,97%.

Tabela 4: Atividade inibidora de amilase determinada contra amilase de diferentes fontes.

Fonte de Amilase	Atividade Específica (UIA/mg de proteína)
Salivar humana	27,7±7,5
Pancreática humana	14,3±4,6
<i>F. verticillioides</i>	28,8±7,2
<i>A. flavus</i>	68,2±1,7
<i>A. obtectus</i>	51,3±7,5
<i>Z. subfasciatus</i>	57,6±2,6
<i>T. castaneum</i>	21,8±2,3
<i>S. cerealella</i>	22,7±0,9
<i>S. zeamais</i>	-
<i>P. truncatus</i>	-
Milho germinado	-
β-amilase de cevada	-

UIA/mg de proteína: média ± desvio padrão; n = 3.

-: não detectado.



* Pico ativo.

Figura 1: **A.** Cromatografia em Sephadex G-75 (166 x 1,6 cm) a partir da amostra P₃₀₋₆₀. **B.** CLAE-Superose 12 HR 10/30 a partir do pico ativo da cromatografia em Sephadex G-75. **C.** CLAE-coluna de troca iônica Vydac 300 VHP 575 a partir do pico ativo de cromatografia em Superose.

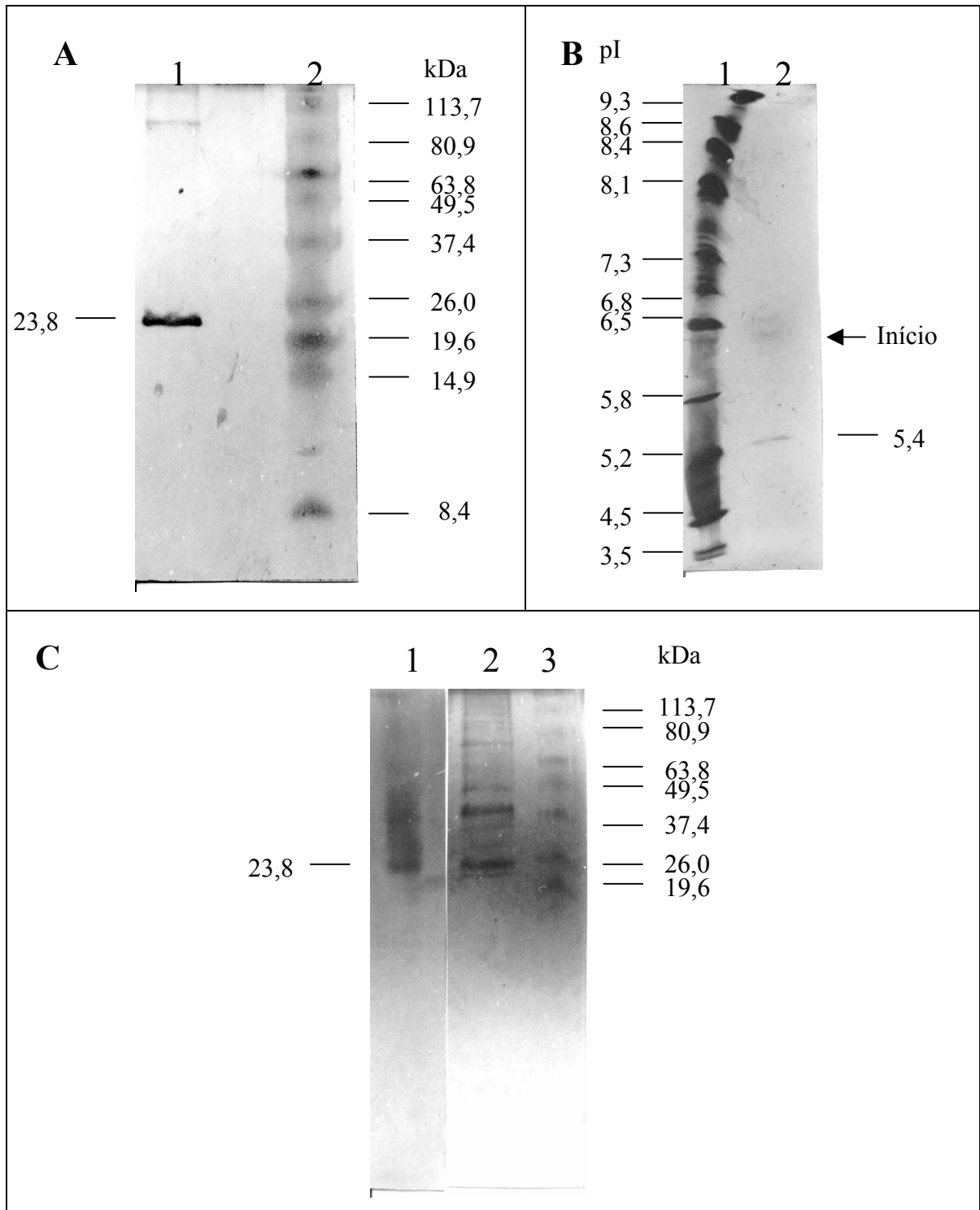


Figura 2: Inibidor de amilase. **A.** SDS-PAGE do pico ativo da cromatografia em CLAE-troca iônica, coluna Vydac 300 VHP 575. Linha 1: IA. Linha 2: Marcadores de massa molecular. **B.** pI do pico ativo da cromatografia em CLAE-troca iônica, coluna Vydac 300 VHP 575. Linha 1: Marcadores de pI. Linha 2: IA. **C.** Zimograma do IA em SDS-PAGE. Linha 1: Atividade do IA proveniente do pico ativo de cromatografia em Sephadex G-75. Linha 2: Proteína do pico ativo de cromatografia em Sephadex G-75. Linha 3: Marcadores de massa molecular.

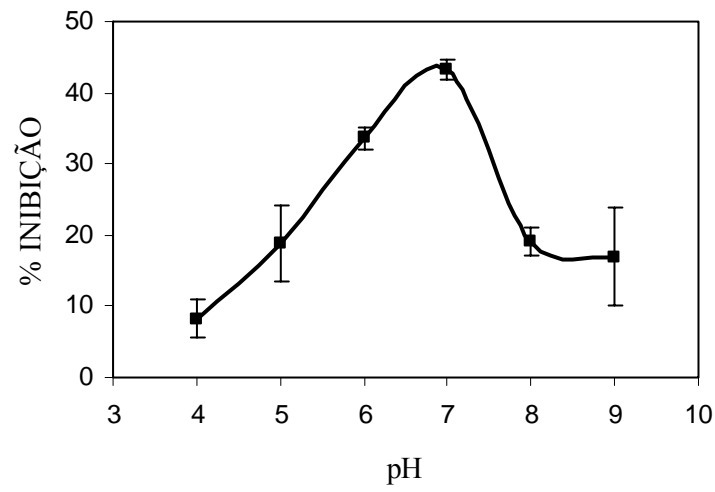


Figura 3: Efeito do pH na interação entre amilase de *F. verticillioides* e o IA.

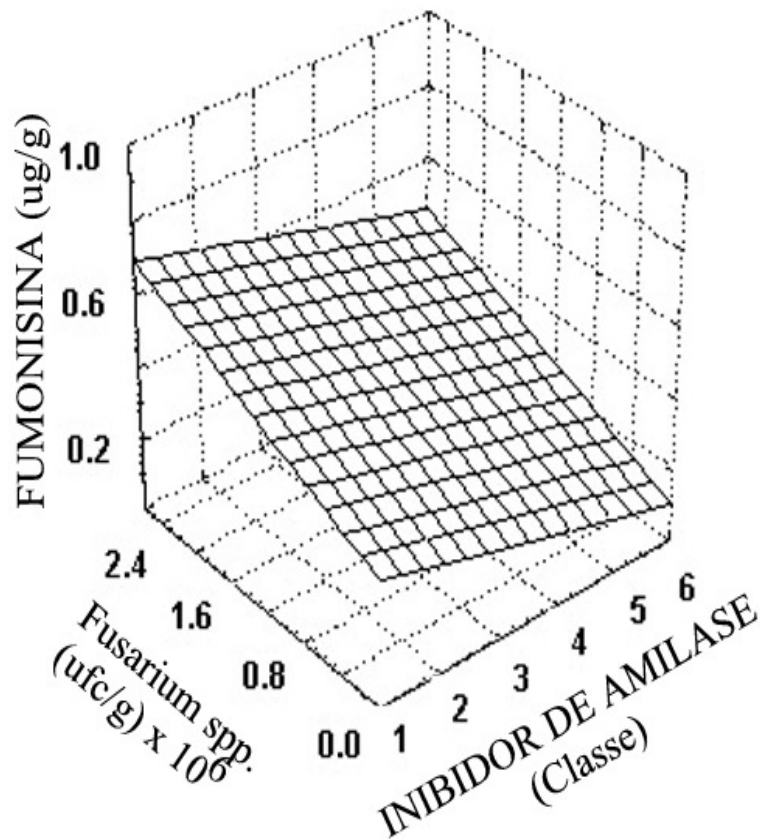


Figura 4: Efeito do inibidor de amilase sobre a contagem de *Fusarium* spp. e nível de fumonisina.

AGRADECIMENTOS

O trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento e Pesquisa-CNPq (Brasil), e Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Guanajuato-Concyteg-México (projeto 00-03). Os autores gostariam de agradecer, ainda, ao CNPq pela bolsa de doutorado a Edson L. Z. Figueira (Processo 144787/1998-9) e pela Fundação de Coordenação e Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior–CAPES (Brasil) pela bolsa doutorado sanduíche a Edson L. Z. Figueira (Processo BEX0119/01-6).

Inibidor de Amilase Hidrofóbico de Milho (*Zea mays*) Ativo Contra Amilase de *Fusarium verticillioides*

RESUMO

Um inibidor de amilase (IA) hidrofóbico, apresentando massa molecular de 19,7 kDa, foi purificado de milho procedendo à extração com etanol a 95%, seguida de cromatografia de troca iônica. O IA ativo contra *Fusarium verticillioides* apresentou ponto isoelétrico de 3,6, estabilidade em ampla variação de pH e temperatura, mantendo 47,6% da atividade após tratamento a 94°C por 60 min. O IA purificado apresentou alto conteúdo de valina, leucina, glicina, alanina e glutamina/ácido glutâmico, com destaque especial ao teor de valina (41,2%). O inibidor não apresentou carboidrato na estrutura molecular e requereu 30 min de pré-incubação com amilase de *F. verticillioides*, para estabilizar o complexo enzima-inibidor. O pH ótimo de interação foi 6,5 e caracterizou-se com amplo espectro de ação, incluindo desde atividade sobre amilase salivar humana, pancreática de porco, *F. verticillioides*, a insetos de interesse agrônômico (*Acanthoscelides obtectus*, *Zabrotes subfasciatus*, *Sitophilus zeamais* e *Prostephanus truncatus*). A nova proteína hidrofóbica demonstrou potencial de utilidade como marcadores moleculares de resistência fúngica, uma vez que também inibe a germinação de conídios de *F. verticillioides*, constituindo em alternativa promissora para minimizar a produção de fumonisina em milho.

INTRODUÇÃO

Fusarium verticillioides é um fitopatógeno fúngico predominante no milho, responsável pela produção de metabólitos secundários pertencentes ao grupo de fumonisinas (GONZÁLES et al., 1995; KEDERA et al., 1999). Inúmeros trabalhos relataram a ocorrência de fumonisina no milho e produtos derivados, ração, além de associação da espécie fúngica com doenças de raiz, caule e grãos em todos os estágios do desenvolvimento vegetal (SHEPHARD et al., 1996).

A fumonisina apresenta distribuição mundial em milho, inviabilizando a praticidade econômica da degradação ou eliminação pós-colheita. O fato mostra que as estratégias de controle devem ser direcionadas à minimização de contaminação nos estágios pré e pós-colheita, com ênfase à utilização de híbridos resistentes ou plantas geneticamente

modificadas visando expressão de proteínas antifúngicas. Outra alternativa paralela seria a identificação de compostos de ocorrência natural em plantas, capazes de inibir a síntese de fumonisina (MUNKVOLD & DESJARDINS, 1997).

A ocorrência natural de inibidores de amilase tem sido relatada em vegetais, sendo o primeiro inibidor descrito no trigo sarraceno e cevada em 1933 e 1934, respectivamente (CHRZAZSCS & JANICKI, 1934). O estudo dos inibidores de amilase em milho iniciou-se em 1981 com detecção de uma proteína ativa contra α -amilase de inseto, mas inativa contra amilase de *Aspergillus oryzae* (BLANCO-LABRA & ITURBE-CHIÑAS, 1981). Posteriormente, MAHONEY et al. (1984) e BLANCO-LABRA et al. (1995) caracterizaram um inibidor bifuncional de 12 kDa contra amilase de insetos (*Tribolium castaneum* e *Callosobruchus maculatus*), assim como protease bovina e fúngica (*Aspergillus niger* e *Aspergillus fumigatus*). Estes fatos despertaram o interesse subsequente direcionando inibidores como parte de resistência natural de milho no controle de patógenos específicos. FIGUEIRA et al. (in press) descreveram uma proteína em milho ativo contra amilase de *F. verticillioides* “*in vitro*”, embora as avaliações a nível de campo não confirmassem a atuação como fator determinante de resistência contra a mesma espécie fúngica.

Outrossim, os inibidores de amilase são amplamente estudados entre os prováveis mecanismos de defesa natural contra o ataque de *Sitophilus oryzae*, *Tenebrio molitor*, *Tribolium confusum* e *Callosobruchus maculatus* (GATEHOUSE et al., 1986; XAVIER-FILHO et al., 1989; BLANCO-LABRA et al., 1995), com os maiores avanços atingidos com a sua expressão em diferentes plantas visando aumento de resistência a insetos específicos (ISHIMOTO et al., 1996; MORTON et al., 2000).

O trabalho descreve a purificação/caracterização parcial de uma nova proteína hidrofóbica, inibidora de amilase com 19,7 kDa de milho (*Zea mays* L.), capaz de inibir além da germinação dos conídios de *F. verticillioides*, a amilase dos insetos de interesse agrônomo.

MATERIAL E MÉTODOS

Milho: O híbrido AG5011, cultivado no Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR-Londrina) durante a safra de 1999 foi fornecido pelo pesquisador Antônio Carlos Gerage e, utilizado na extração de inibidores de amilase (IA). Após colheita os grãos foram secos a temperatura ambiente até atingir 14% de umidade e armazenados a -20°C.

Amilase: Linhagem de *F. verticillioides* 113F foi isolada de ração envolvida em intoxicação animal e mantida em ágar batata dextrose (BDA) a 4°C com ativação semestral. A amilase foi produzida no meio de cultivo descrito por FIGUEIRA & HIROOKA (2000), inoculando os conídios fúngicos em 480 mL de meio composto por 2% de farinha de milho em sobrenadante de milho verde. Após 20 dias a 25°C, a fermentação foi interrompida e centrifugada a 5.000 x g (10 min, 4°C) e o sobrenadante utilizado como fonte de amilase.

As amilases salivar e pancreática humana foram adquiridas de Amersham Pharmacia Biotech, enquanto que β -amilase de cevada, α -amilase de cevada e α -amilase pancreática suína foram obtidas de Sigma Chemical Co. Amilases de insetos foram preparadas no laboratório conforme preconizado por BLANCO-LABRA et al. (1995). Os insetos foram desenvolvidos no insetário do Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV-Unidade Irapuato), sendo a fase larvária de *Prostephanus truncatus*, *Sitotroga cerealella*, *Sitophilus zeamais* cultivada em grãos de milho; *Tribolium castaneum* foi cultivado em farinha de trigo; *Callosobruchus maculatus* em ervilha; e *Zabrotes subfasciatus* e *Acanthoscelides obtectus* em feijão. Os cultivos foram mantidos em câmara incubadora a 28°C, com 65-75% de umidade relativa. Na extração de amilases, as larvas de cada inseto foram homogeneizadas com tampões na proporção 1:5 (p/v). Para amilase de *P. truncatus*, procedeu-se à extração com tampão succínico 0,04 M (pH 6,5) contendo 0,1 M de NaCl; a amilase de *S. zeamais*, *T. castaneum*, *Z. subfasciatus*, *C. maculatus*, *A. obtectus* e *S. cerealella* foi extraída com tampão succínico 0,2 M (pH 4,5). As suspensões foram centrifugadas a 10.000 x g (10 min, 4°C) e o sobrenadante utilizado como fonte de amilase.

As amilases de milho e arroz foram extraídas de sementes, após 5 e 3 dias de germinação, com CaCl₂ a 0,01 M e NaCl a 0,1 M, respectivamente.

Atividade inibidora de amilase: Durante a purificação e caracterização parcial dos IA, a atividade amilásica foi determinada por método iodométrico (WILSON & INGLEDEW, 1982), modificado para determinação em microplacas de 96 poços. A atividade inibidora de amilase foi determinada, pré-incubando o inibidor de amilase com 0,2 UA (volume final de 70 μ L visando obter redução de 50% na atividade amilásica inicial) por 10 min a 25°C, para o inibidor extraído com solução tampão; 30 min a 25°C, para o inibidor extraído com etanol 95%. A seguir mediu-se a atividade amilásica residual.

Uma unidade inibidora de amilase (UIA) foi arbitrariamente definida como a quantidade de proteína necessária para inibir 1 UA, nas condições de ensaio. Uma UA foi definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 0,1 mg de amido em 60 min

a 25°C, na presença de 0,038 mg de amido. Os resultados obtidos foram calculados empregando as equações 1 e 2, sendo que a equação 1 foi utilizada na determinação da atividade amilásica inicial sem a interação com IA, enquanto que na equação 2 determinou-se a atividade inibidora de amilase em unidades de inibição por mL de extrato contendo IA.

$$UA = \frac{\left[0,038 - \left(\frac{A \times 0,038}{B} \right) \right]}{0,1} \quad (1)$$

$$UIA / ml = \left\{ UA - \left\{ \frac{\left[0,038 - \left(\frac{C \times 0,038}{D} \right) \right]}{0,1} \right\} \right\} \times \frac{1000}{\text{extrato de AI } (\mu l)} \quad (2)$$

Onde: **UA** = atividade amilásica sem interação com o IA (controle da atividade amilásica); **A** = absorvância (DO) a 630 nm, correspondente ao controle de amilase; **B** = DO a 630 nm, correspondente ao controle de amido; **C** = DO a 630 nm, correspondente a interação entre amilase e IA; **D** = DO a 630 nm, correspondente ao controle de amido da interação entre amilase e IA.

Extração do inibidor de amilase: Inicialmente padronizou-se a extração deste IA usando diferentes concentrações de etanol (0, 20, 40, 60, 80 e 95%), sendo que o etanol 95% demonstrou melhor resultado, conforme descrito posteriormente. Na extração de IA, a farinha de milho com granulometria máxima de 48 mesh (moinho Janke & Kunkel, modelo A10) foi homogeneizada em cada concentração de etanol (1:5 p/v) durante 2 h à temperatura ambiente e o sobrenadante obtido a 30.000 x g (20 min, 4°C), determinando-se a atividade inibidora de amilase.

Purificação do inibidor de amilase: Na extração de IA, a farinha de milho com granulometria máxima de 48 mesh (moinho Janke & Kunkel, modelo A10) foi homogeneizada com etanol a 95% (1:5 p/v) durante 2 h à temperatura ambiente e o sobrenadante obtido a 30.000 x g (20 min, 4°C), seco em “speed vaccum”. O concentrado foi solubilizado em bicarbonato de amônio 0,01 M pH 8,2 contendo 1% de Triton X-100 e submetido à coluna Econo-Pac Q cartridge (1,0 x 5,0 cm, Bio Rad), equilibrado com a mesma solução e eluído com gradiente salino entre 0 a 0,25 M de NaCl em 90 min a um fluxo de 1

mL/min. Frações de 2 mL foram coletadas para determinar o perfil cromatográfico, sendo o pico ativo armazenado a -20°C .

Tempo de pré-incubação: 1,3 μg de IA foi pré-incubado em tampão $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-NaOH}$ 0,05 M pH 6,7 por 0, 5, 10, 15, 30, 45, 60 e 120 min a 25°C com 0,2 UA de *F. verticillioides*, determinando-se a atividade amilásica residual.

Estabilidade térmica: 1,3 μg de IA foi pré-incubado em tampão $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-NaOH}$ 0,05 M pH 6,7 durante 0, 5, 10, 15, 30, 45 e 60 min a 50 , 70 e 94°C , após tratamento térmico as amostras foram refrigeradas, adicionadas de 0,2 UA de *F. verticillioides* e após incubação a 25°C por 10 min, determinou-se a atividade amilásica residual.

Efeito do pH sobre a atividade inibidora de amilase: Na determinação do efeito do pH sobre a atividade inibidora de amilase contra amilase de *F. verticillioides*, determinou-se a atividade inibidora de amilase em diferentes pH (4,0; 5,0; 6,0; 6,5; 7,0; 8,0 e 9,0) usando os seguintes tampões: acetato de sódio 0,05 M (pH 4,0 e 5,0); fosfato de sódio 0,05 M (pH 6,0; 6,5 e 7,0); Tris-HCl (pH 8,0 e 9,0). O IA (1,3 μg) e amilase (0,2 UA) foram pré-incubados por 30 min a 25°C em cada pH, determinando-se a atividade amilásica em cada pH correspondente.

Estabilidade ao pH: O efeito do pH na estabilidade do IA foi determinado, incubando 1,3 μg de IA nos mesmos tampões descritos no item acima, pH 4,0; 5,0; 6,0; 6,5; 7,0; 8,0 e 9,0, por 16 horas a 4°C . Após este período, o pH de cada tratamento foi ajustado a 6,7 e determinou-se a atividade amilásica residual de *F. verticillioides*.

Determinação da massa molecular aparente: A massa molecular aparente de inibidores purificados foi determinada em SDS-PAGE empregando acrilamida a 4% no gel concentrador e 13% no gel separador (SCHAGGER & von JAGOW, 1987) e corados com prata (BLOMM et al., 1987).

Determinação do ponto isoelétrico: Determinou-se pI em Rotofor Cell (Bio Rad), empregando anfolinas com pH entre 3,0 a 10,0. A corrida foi realizada em 15 W constante por 4 horas a 4°C . As 20 frações originadas foram coletadas, determinando-se pH e atividade

inibidora de amilase.

Especificidade: A especificidade do IA foi determinada perante amilase de diferentes fontes: *F. verticillioides*, amilase salivar e pancreática humana, pancreática suína, amilase de milho, arroz e cevada, β -amilase de cevada, *S. zeamais*, *T. castaneum*, *Z. subfasciatus*, *A. obtectus*, *P. truncatus* e *S. cerealella*. O IA (1,3 μ g) com as amilases correspondentes (0,2 AU) foram incubados por 30 min à temperatura ambiente em fosfato de sódio 0,05 M pH 7,0 para amilase salivar/pancreática humana e *F. verticillioides*; fosfato de sódio 0,05 M pH 6,0 para amilase de *A. obtectus*, *Z. subfasciatus* e *T. castaneum*; tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,0 para amilase de milho, β -amilase de cevada, *S. cerealella*, *S. zeamais* e *P. truncatus*. A seguir, determinou-se a atividade amilásica residual.

Determinação de carboidratos: A presença de carboidratos no IA foi analisada em SDS-PAGE, empregando acrilamida a 4% no gel concentrador e 10% no gel separador, seguida de visualização com reativo de Schiff (SCHAGGER & von JAGOW, 1987).

Fator diluição: A presença de agregados moleculares foi analisada, procedendo-se diluição de IA no fator 1:2, 1:4, 1:8 e 1:10 (fator 1:x significa que x μ L corresponde a 1 μ L de solução padrão). A atividade específica de IA foi determinada na solução padrão e em cada diluição, mantendo a quantidade de IA (1,3 μ g) constante em cada ensaio.

Análise de aminoácidos: A composição de aminoácidos do IA purificado foi determinada em CLAE empregando coluna de fase reversa, hidrolisando 260 μ g de proteína com 200 μ L de HCl 6N e 1% de fenol destilado a 105°C em tubo selado, durante 24 h a vácuo. A proteína hidrolisada foi seca e derivatizada com fenil isotiocianato, seca novamente e solubilizada em tampão fosfato 0,05M pH 7,4 : metanol (8:2 v/v), sendo 16 μ L injetado na coluna C-18 Pico-Tag e os resultados obtidos integrados (integrador modelo 19-740, Waters Chromatography, Millipore Corp.). A cisteína foi determinada segundo THANHAUSER et al. (1987) modificado por CHAN & WASSERMAN (1993).

Atividade antifúngica: A atividade antifúngica foi determinada, inoculando $1,6 \times 10^6$ conídios de *F. verticillioides* em 1 mL de meio de cultivo constituído de amido a 1% e triptona a 0,13%, contendo 0, 25, 50, 100 e 200 μ g de IA/mL.

Após 12 e 24 horas de incubação determinou-se a porcentagem de germinação dos conídios e tamanho dos micélios. O resultado constituiu na contagem de 100 células para avaliação da porcentagem de germinação e 40 células para determinação do tamanho dos micélios, realizados em 3 repetições.

Proteína: A concentração de proteína foi determinada pelo método descrito por SMITH et al. (1985), usando albumina sérica bovina como padrão.

RESULTADOS

O aumento gradual da concentração de etanol até 95%, durante a extração, resultou no aumento marcante de atividade total e seletividade na obtenção do IA, conforme visualizado por SDS-PAGE em condições redutoras (Figura 1).

A Tabela 1 mostra os resultados da purificação parcial de IA, onde iniciando com 100 g de milho triturado com etanol 95% (extrato bruto) obteve-se aproximadamente 0,58 g de proteína, após eliminação do etanol em “speed vacuum”. O concentrado, solubilizado em bicarbonato de amônio 0,01 M pH 8,2 contendo 1% de Triton X-100, recuperou 74,7% de atividade inibidora inicial. O mesmo extrato protéico, aplicado na coluna cromatográfica de troca iônica e submetido a gradiente linear de NaCl, obteve o IA eluído em único pico (Figura 2), com rendimento final de 56,4% da atividade original e especificidade ampliada no fator de 14 vezes (Tabela 1).

As frações ativas, provenientes de cromatografia de troca iônica, foram concentradas por ultrafiltração em membrana de exclusão molecular de 10 kDa e determinou-se a massa molecular aparente por SDS-PAGE em condições redutoras. A Figura 3 mostra uma banda protéica única de 19,7 kDa, isenta de carboidratos, já que a coloração específica para as glicoproteínas, analisada em gel de poliácridamida, apresentou-se negativa (dados não apresentados).

A determinação de ponto isoelétrico em Rotofor Cell com gradiente de pH entre 3,0 e 10,0 indicou caráter ácido da proteína, com pI de 3,6. Analisando a possibilidade da formação de agregados moleculares empregando o método de fator de diluição, não se detectaram diferenças na atividade específica em cada diluição, indicando a não ocorrência da formação de agregados moleculares.

Os resultados da composição de aminoácidos, apresentados na Tabela 2, mostram que a proteína é altamente hidrofóbica, com 63,6 mol % de aminoácidos hidrofóbicos, composto por alto conteúdo de valina (41,2 mol %), seguido por leucina (9,4 mol %), alanina, fenilalanina e isoleucina. Sob o ponto de vista de valor nutricional, o IA isolado continha baixo nível de determinados aminoácidos essenciais (lisina, treonina, cisteína + metionina e isoleucina); em contrapartida apresentou alto nível de valina, leucina e fenilalanina + tirosina.

O IA purificado requereu tempo de pré-incubação de 30 min para a formação/estabilização do complexo enzima-inibidor. Conforme indicado na Tabela 3, o IA apresentou alta estabilidade térmica, mantendo aproximadamente 50% da atividade original após tratamento a 94°C por 30 min. A atividade máxima de IA ocorreu em pH 6,5 (Figura 4), diminuindo drasticamente nos valores de pH extremos, sendo a estabilidade máxima obtida em pH neutro (Figura 5).

O IA apresentou amplo espectro de ação, inibindo desde amilase de *F. verticillioides* a amilase de insetos de interesse agrônômico, representados por *A. obtectus*, *Z. subfasciatus*, *S. zeamais* e *P. truncatus*, porém foi ineficaz perante amilase de *T. castaneum* e *S. cerealella*. Soma-se ainda o efeito sobre amilases salivar humana e pancreática suína, enquanto que a amilase pancreática humana não foi inibida. Em termos de especificidade a plantas, o IA purificado não inibiu as amilases de arroz e β -amilase de cevada, ocorrendo o contrário com a amilase de milho e cevada (Tabela 4).

Salienta-se, entre as características relevantes do novo inibidor purificado, a inibição da germinação dos conídios de *F. verticillioides* perante incubação com 10, 25, 50, 100 e 200 μg de IA /mL, sendo que o tratamento com 200 μg de IA/mL por 24 horas reduziu a germinação dos propágulos em 90% (Figura 6).

DISCUSSÃO

O trabalho descreve a purificação e caracterização de um IA solúvel em etanol a 95%, extraído de grãos de milho. O IA purificado diferiu de inibidores previamente estudados, enfatizando-se a elevada hidrofobicidade, justificando a solubilidade em etanol. A maioria dos inibidores de amilase estudados consistiu de proteínas solúveis em água (inibidores tipo albumina), ou proteínas do tipo globulinas, extraídos em solução de NaCl ou ácidos diluídos. Outrossim, os poucos inibidores de amilase extraídos em solução alcoólica

(principalmente 70-80%), restringem às proteínas de reserva de cereais, incluindo inibidores de protease e de amilase (RICHARDSON, 1991).

Baseado no procedimento de extração, o novo IA seria classificado como uma prolamina, sendo que no milho denomina-se zeína, vindo a constituir a proteína de reserva mais importante no milho (OSBORNE, 1924). Geralmente, a categoria é constituída de proteínas pobres em aminoácidos básicos a exemplo do IA, sendo as zeínas deficientes em aminoácidos essenciais (triptofano, lisina e treonina), mas ricas em valina, leucina e fenilalanina + tirosina.

Embora o IA purificado não seja uma glicoproteína, apresentou pI similar a diversos tipos de IA isolados de feijão, com exceção de feijão tepari (HO et al., 1994; BLANCO-LABRA et al., 1996). O pH ótimo de interação com a amilase de *F. verticillioides* foi 6,5, observando uma redução brusca na atividade com o aumento ou diminuição de pH.

O IA apresentou amplo espectro de ação, inibindo fortemente a amilase de *F. verticillioides*, além de atuar sobre amilase de insetos de interesse agrônômico. Em adição, o IA descrito inibiu a germinação dos conídios de *F. verticillioides in vitro*. Este fato é relevante, já que se trata de atividade inibitória acoplando o efeito sobre amilase fúngica/germinação de conídios de um dos patógenos mais importantes no milho, cuja repercussão estende à saúde humana e animal. Por outro lado, o inibidor não afetou a amilase pancreática humana, assim como apresentou baixa atividade contra amilase de milho, produzida durante germinação. Conseqüentemente, o IA purificado aponta-se entre composto de uso promissor a ser incluído como marcador molecular, na busca de híbridos resistentes a *F. verticillioides*.

O IA proveniente de feijão comum já tem sido utilizado com sucesso em ervilha (*Pisum sativum*) e em feijão azuki, resultando em plantas resistentes ao ataque de *Bruchus pisorum*. Salienta-se que no feijão azuki também aumentou a resistência contra *C. chinensis*, *C. maculatus* e *C. analis* (ISHIMOTO et al., 1996; MORTON et al., 2000). Estes dados justificam a consideração quanto ao potencial do novo IA purificado, visando expressão em plantas para aumentar a resistência contra patógenos específicos e insetos.

Em suma, o IA purificado apresentou propriedades intrínsecas “*in vitro*”, que poderia ser de interesse relevante, particularmente para o uso no controle de *F. verticillioides* e, conseqüentemente reduzindo a produção de fumonisina. O amplo espectro de ação, estendido também contra amilase de insetos, abre perspectiva para a possível participação desta proteína na defesa dos grãos contra o ataque de insetos de importância agrícola. No

entanto, ainda existem inúmeras questões a serem respondidas: (i) qual a função do IA “*in vivo*” como parte do mecanismo de defesa das plantas? (ii) onde estaria localizado na planta madura após secagem dos grãos? (iii) a participação “*in vivo*” de IA na defesa da planta apresenta caráter constitutivo, i.e., continuamente produzida independentemente do estágio do desenvolvimento vegetal? (iv) o fungo ou inseto poderia desenvolver resistência? Todas essas questões devem ser respondidas, caso a proteína seja considerada como base para o desenvolvimento de programas visando aumento de resistência contra fungos ou insetos específicos de milho.

Tabela 1: Etapas de purificação do inibidor de amilase.

Procedimento	Atividade Específica (UIA/mg de proteína)	Rendimento (%)	Purificação (vezes)
Extrato bruto em etanol a 95%	8,9	100,0	1,0
Extração em bicarbonato de amônio 0,01 M contendo 1% de Triton X-100	41,8	74,8	4,7
Cromatografia de troca iônica (Econo-Pac Q cartridge)	123,8	56,2	13,9

Tabela 2: Composição de aminoácidos do inibidor de amilase.

Aminoácido	Mol %		Aminoácido	Mol %	
	IA	FAO/WHO ^a		IA	FAO/WHO ^a
Asx	1,4		Val	41,2	4,2
Glx	7,0		Met	1,7	
Ser	3,4		Cys	1,0	
Gly	7,1		Met+Cys	2,7	3,0
His	2,1		Ile	2,3	3,5
Arg	0,7		Leu	9,3	6,2
Thr	2,6	3,9	Phe	3,7	
Ala	7,1		Phe+Tyr	5,3	4,0
Pro	7,1		Lys	0,7	4,3
Tyr	1,6		Trp	-	0,5

-: Não determinado.

^a: Cálculo da FAO/WHO (1973).

Tabela 3: Termoestabilidade do inibidor de amilase após tratamento térmico de 15, 30 e 60 min nas temperaturas indicadas. Os dados apresentados são valores relativos comparados com resultados da proteína sem tratamento térmico (média \pm desvio padrão).

Tempo (min)	Temperatura (°C)		
	50	70	94
15	86,7 \pm 1,4	104,6 \pm 6,9	107,2 \pm 2,9
30	90,3 \pm 3,9	103,0 \pm 1,6	135,8 \pm 4,3
60	92,7 \pm 3,0	89,6 \pm 9,0	47,6 \pm 4,6

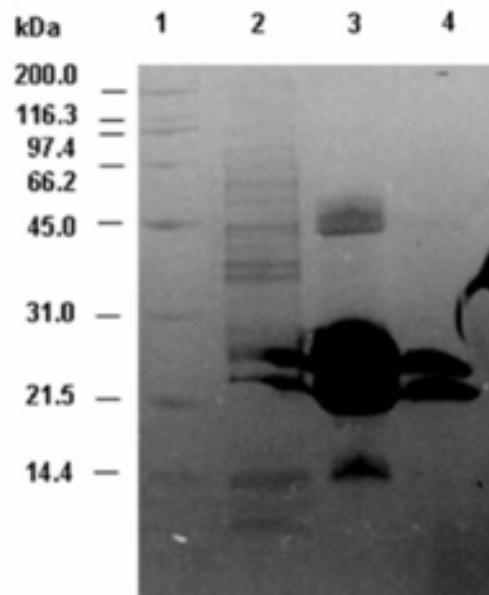
Tabela 4: Atividade inibidora de amilase determinada contra amilase de diferentes fontes.

Fonte de Amilase	Atividade Específica (UIA/mg de proteína)
Salivar humana	24,4±1,2
Pancreática humana	-
Pancreática suína	126,4±2,5
<i>F. verticillioides</i>	36,9±7,0
<i>A. obtectus</i>	132,6±1,2
<i>Z. subfasciatus</i>	62,1±0,4
<i>T. castaneum</i>	-
<i>S. cerealella</i>	-
<i>S. zeamais</i>	93,1±1,3
<i>P. truncatus</i>	58,8±1,6
Milho germinado	11,9±1,6
Arroz germinado	-
α -Amilase de cevada	109,7±1,8
β -Amilase de cevada	-

UIA/mg de proteína: média \pm desvio padrão; n = 3.

-: não detectado.

A



B

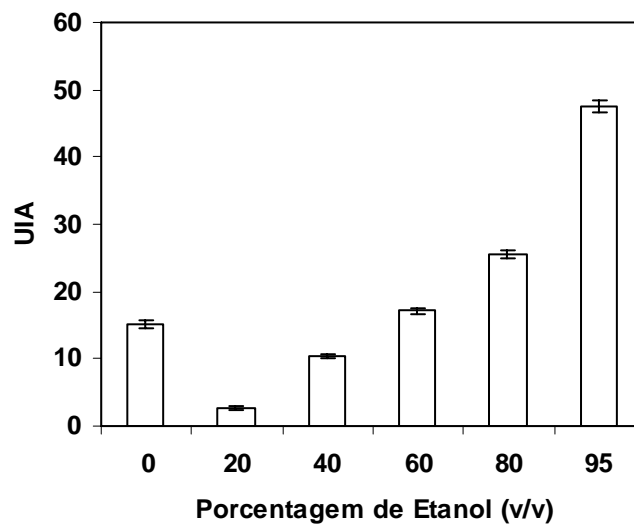


Figura 1: Extração do inibidor de amilase com diferentes concentrações de etanol. **A.** SDS-PAGE dos extratos contendo o inibidor de amilase obtidos com diferentes concentrações de etanol. Linha 1. Marcadores de massa molecular. Linha 2. Água. Linha 3. Etanol a 60%. Linha 4. Etanol a 95%. **B.** Atividade inibidora de amilase obtida com diferentes concentrações de etanol durante extração (média \pm desvio padrão).

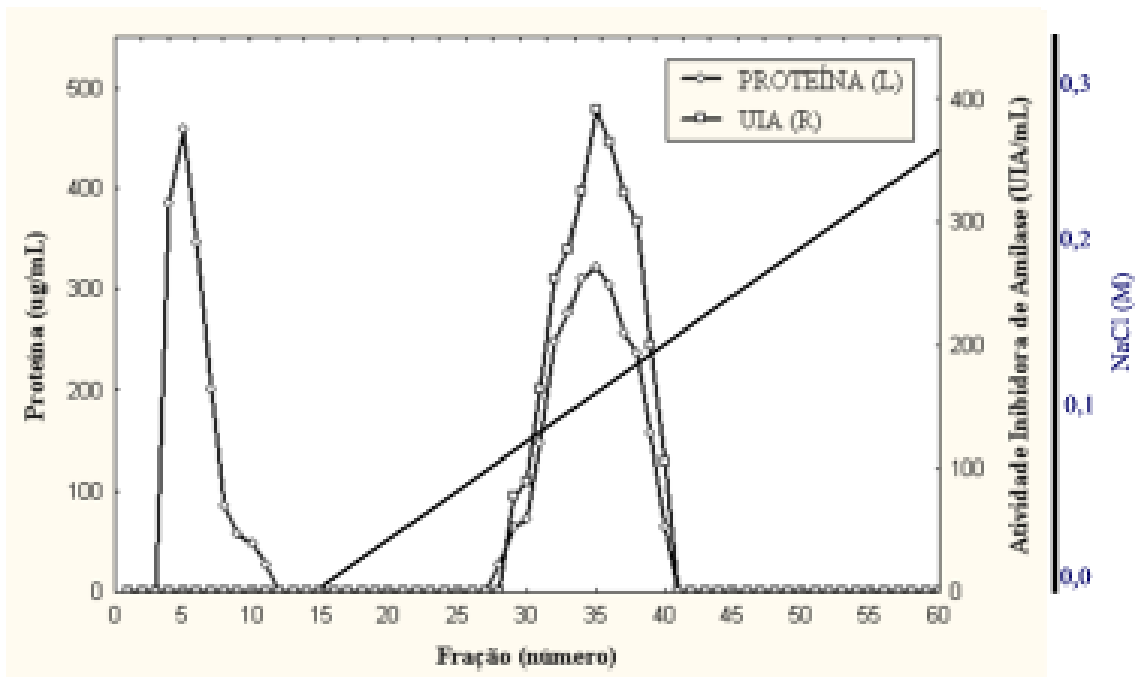


Figura 2: Cromatografia de troca iônica em Econo-Pac® cartridge (1.0 x 5.0 cm) do extrato solubilizado em bicarbonato de amônio 0,01 M contendo 1% de Triton X-100. O IA foi eluído em gradiente linear entre 0 a 0,25 M de NaCl em bicarbonato de amônio 0,01 M, contendo 1% Triton X-100 em 90 min, sob fluxo de 1 mL/min.

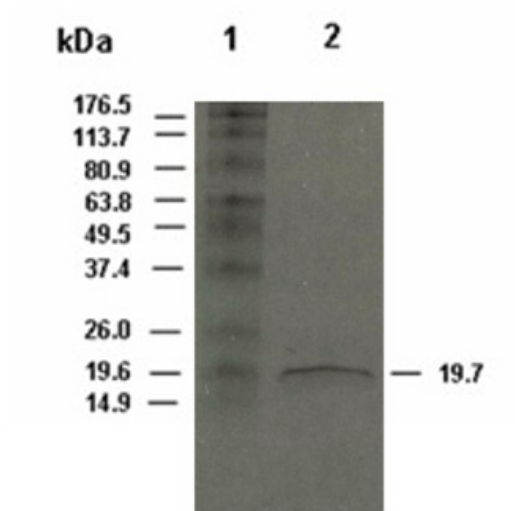


Figura 3: SDS-PAGE do pico ativo da cromatografia de troca iônica em Econo-Pac® Q cartridge. Linha 1: Marcadores de massa molecular. Linha 2: Inibidor de amilase.

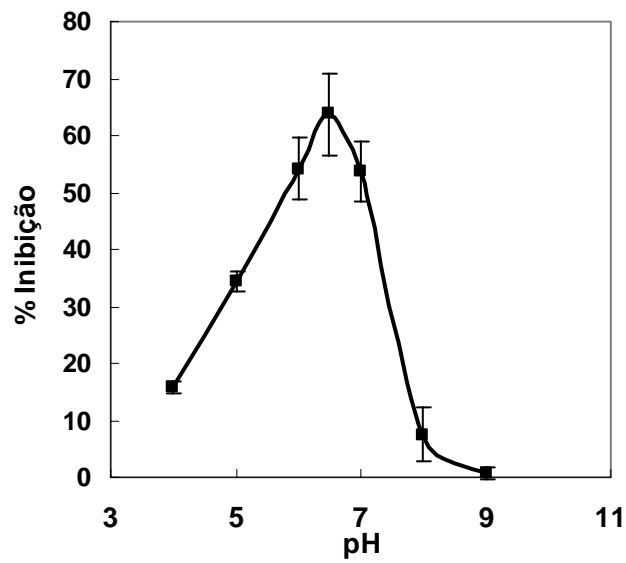


Figura 4: Efeito do pH sobre a atividade inibidora de amilase. Utilizou-se (1,3 μ g) de inibidor de amilase purificado e (0,2 UA) de *F. verticillioides* (média \pm desvio padrão).

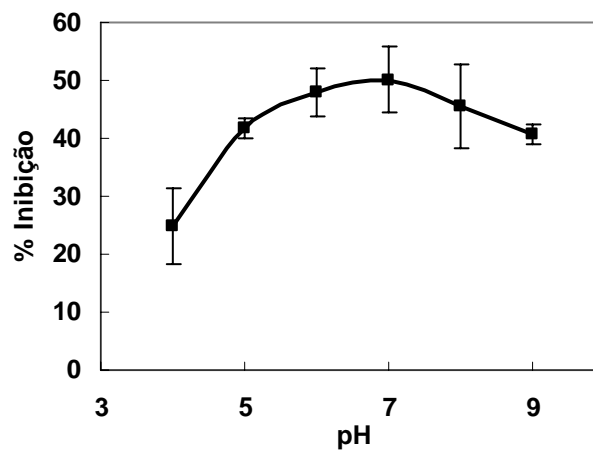


Figura 5: Efeito do pH sobre a estabilidade do inibidor de amilase. Utilizou-se quantidades constantes de inibidor (1,3 μ g) e amilase de *F. verticillioides* (0,2 UA). O inibidor foi incubado durante 16 h em cada pH e a atividade foi determinada em pH 6,7 (média \pm desvio padrão).

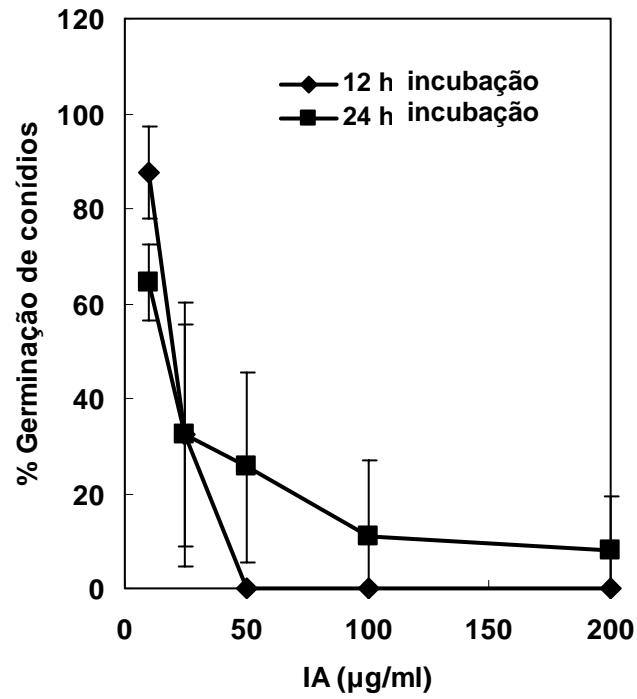


Figura 6: Germinação de conídios avaliando diferentes concentrações de inibidor de amilase a 25°C. Cada avaliação continha $1,6 \times 10^6$ conídios em meio de cultivo constituído por 1% de amido e 0,13% de triptona (média \pm desvio padrão).

AGRADECIMENTOS

O trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento e Pesquisa-CNPq (Brasil), Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Guanajuato-CONCYTEG (México) e Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología-CONACYT (México). Os autores agradecem ao CNPq pela bolsa de doutorado de Edson L. Z. Figueira (Processo 144787/1998-9) e pela bolsa de produtividade a Elisa Y. Hirooka; a Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES (Brasil), pela bolsa doutorado sanduíche a Edson L. Z. Figueira (Processo BEX0119/01-6).

Correlação entre Microbiota Fúngica, Fumonisina e Nível de Inibidores de Amilase nos Híbridos de Milho de Ciclo Precoce e Super Precoce

RESUMO

Os híbridos de milho classificados no grupo de ciclo precoce e super precoce, segundo tempo de floração, apresenta vantagem por acelerar a colheita, além de expor a planta a menor período de adversidade climática ou fitopatogênicos. No entanto, ainda não existe informação sobre comparação entre os dois grupos quanto aos aspectos fitossanitários, assim como presença de compostos provavelmente envolvidos no mecanismo de defesa natural. No trabalho comparou-se a microbiota fúngica, concentração de fumonisina e nível de inibidores de amilase (IA) contra amilase de *F. verticillioides* entre os 21 híbridos do grupo precoce e 16 de ciclo super precoce, cultivados na fazenda experimental do Instituto Agronômico do Paraná-IAPAR. A atividade inibidora de amilase nos híbridos de milho variou de 5,48 a 16,00 UIA/g (ciclo precoce) e 9,29 a 15,54 UIA/g (ciclo super precoce). A contagem total de bolores e leveduras variou de $1,2 \times 10^3$ a $2,6 \times 10^6$ ufc/g (ciclo precoce) e $4,5 \times 10^3$ a $1,5 \times 10^6$ ufc/g (ciclo super precoce), sendo *Fusarium* spp. detectado em 76,2% dos híbridos de ciclo precoce com contagem de $1,5 \times 10^2$ a $2,4 \times 10^6$ ufc/g, enquanto que no ciclo super precoce detectou-se em 87,5%, com contagem de $8,0 \times 10^2$ a $9,5 \times 10^5$ ufc/g. A fumonisina foi detectada em 11 (52,4%) híbridos precoce na concentração de 0,08 a 2,67 µg/g e em 10 (62,5%) híbridos super precoce, nas concentrações de 0,05 a 1,54 µg/g. Não houve diferença significativa entre o nível de IA, concentração de fumonisina, contagem total de bolores e leveduras, *Fusarium* spp., *Penicillium* spp., *Cladosporium* spp. e leveduras entre o grupo dos híbridos de ciclo precoce e super precoce ($P < 0,05$). Considerando a diferença não significativa entre os grupos sob aspecto fitossanitário, sugere-se que maior ênfase deva ser dada às características inerentes do híbrido conforme interesse particular dos produtores, durante a escolha do ciclo a ser cultivado.

INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) desempenha papel de destaque na cadeia alimentar, devido às características nutricionais aliadas a importância econômica, sendo utilizado como ingrediente universal na alimentação humana ou animal (MUNKVOLD & DESJARDINS, 1997). No entanto, as características nutricionais o expõe ao ataque de fungos e insetos predadores (WATSON & RAMSTAD, 1987).

Fusarium verticillioides, *F. proliferatum*, *F. oxysporum*, *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *Cladosporium* spp. e *Penicillium* spp. compõem a micoflora predominante no milho, com ênfase em *F. verticillioides* pela maior frequência na microbiota interna (GONZÁLEZ et al., 1995; LOGRIECO et al., 1995; KEDERA et al., 1999).

O principal problema relacionado ao ataque fúngico no milho consiste na produção de metabólitos secundários pertencentes ao grupo de fumonisina e aflatoxina, produzidas predominantemente por *F. verticillioides* e *A. flavus*, respectivamente (SCOTT & ZUMMO, 1994; AZIZ et al., 2000). Aflatoxina apresenta efeito teratogênico e hepatocarcinogênico (WANG et al., 2001), enquanto que fumonisina com atividade promotora de câncer, é responsável por inúmeros distúrbios em animais (BULLERMAN & DRAUGHON, 1994; NORRED & VOSS, 1994). A contaminação fúngica e a presença de micotoxinas são fatores que devem ser minimizados, visando evitar problemas fitossanitários no comércio internacional.

Os mecanismos naturais de defesa da planta podem aumentar a produtividade e a qualidade na agricultura, reduzindo o uso descontrolado de pesticidas, assim como a contaminação por micotoxinas (GOMES & XAVIER-FILHO, 1994; CHEN et al., 1999b). No contexto, iniciou-se o estudo dos inibidores enzimáticos enfatizando os inibidores de amilase em milho a partir dos anos 80, descrevendo-se uma proteína com atividade sobre amilase de insetos (BLANCO-LABRA & ITURBE-CHIÑAS, 1981). BLANCO-LABRA et al. (1995) caracterizaram uma proteína bifuncional com massa molecular aparente de 12 kDa ativas contra amilase de *Tribolium castaneum* e *Callosobruchus maculatus*, com atividade também sobre protease bovina e fúngica (*A. niger* e *A. fumigatus*). Recentemente, CHEN et al. (1999b) descreveram um inibidor de tripsina com atividade sobre a síntese de amilase, demonstrando o potencial promissor do emprego de mecanismos de defesa natural de plantas no controle de pragas.

O trabalho propõe a avaliação comparativa dos parâmetros referentes a níveis de inibidor de amilase, contaminação fúngica e concentração de fumonisinas em 37 híbridos de milho provenientes da safrinha/1997, sendo 21 pertencentes ao ciclo precoce e 16 ao ciclo super precoce.

MATERIAL E MÉTODOS

Híbridos de milho: O monitoramento sobre IA, microbiota fúngica e fumonisinas foi realizado em 37 híbridos de milho, sendo 21 pertencentes ao ciclo precoce e 16 ao ciclo super precoce, cultivados na Fazenda Experimental do Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR-Londrina), no período de março a setembro/1997 (safrinha de 1997), cujo as condições climatológicas são visualizadas na Figura 1. Cada híbrido foi plantado em quatro linhas de cinco metros lineares, espaçados de 0,9 m. Após desbaste, manteve-se quatro plantas por metro linear, considerando como área útil para a coleta de informações, as duas linhas centrais (9 m²). Após colheita, os grãos foram secos à temperatura ambiente até atingir 14% de umidade e armazenados a -20°C.

Extração de inibidores de amilase: Os grãos de milho foram inicialmente triturados até granulometria máxima de 48 mesh (moinho Janke & Kunkel, modado A10) e desengordurados por homogeneização da farinha com acetona (1:1 p/v) durante 15 min. Após decantação, a acetona foi descartada. O processo foi repetido por mais 3 vezes e a farinha desengordurada seca à temperatura ambiente e armazenada a -20°C.

Na extração de IA, a farinha de milho desengordurada foi homogeneizada durante 12 horas a 4°C com tampão acetato de sódio 0,1 M pH 6,0 (1:5 p/v). As proteínas solúveis foram obtidas por centrifugação a 30.000 x g (20 min, 4°C) e submetidas a precipitação fracionada com sulfato de amônio entre 30-60% de saturação. O precipitado (P₃₀₋₆₀) foi coletado após centrifugação a 30.000 x g (20 min, 4°C), solubilizado em tampão KH₂PO₄-NaOH 0,05 M pH 6,7 e dialisado contra o mesmo tampão. Os extratos foram centrifugados a 15.000 x g (15 min, 4°C) e o sobrenadante armazenado a -20°C.

Amilase fúngica: *F. verticillioides* 113F foi isolado de ração envolvida em intoxicação animal e mantido em ágar batata dextrose (BDA) a 4°C com ativação semestral. A amilase foi produzida no meio de cultivo descrito por FIGUEIRA & HIROOKA (2000), inoculando os

conídios fúngicos em 480 mL de meio composto por 2% de farinha de milho em sobrenadante de milho verde. Após 20 dias a 25°C, a fermentação foi interrompida e centrifugada a 5.000 x g (10 min, 4°C) e o sobrenadante utilizado como fonte de amilase.

Determinação da atividade inibidora de amilase: Para o monitoramento de IA nos 37 híbridos de milho, a atividade amilásica foi determinada por método iodométrico (WILSON & INGLEDEW, 1982). Uma unidade amilásica (UA) foi arbitrariamente definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 0,1 mg de amido em 10 min de reação a 40°C, na presença de 5,0 mg de amido.

A atividade inibidora de amilase foi determinada, pré-incubando 0,25 mL de amilase de *F. verticillioides* contendo 15 UA com 0,25 mL de extrato de milho adequadamente diluído (30 min, 40°C), para obter 50% de inibição enzimática. A atividade amilásica residual foi determinada, adicionando 1,0 mL de solução de amido 0,5% mantida a 40°C e transcorridos 10 min de reação, transferiu-se 0,2 mL desta mistura para um tubo contendo 5,0 mL da solução de iodo e a absorbância foi medida a 540 nm. O branco consistiu de 5,0 mL da solução de iodo adicionado de 0,2 mL de água deionizada. O controle de amido consistiu de 5,0 mL da solução de iodo adicionado de 0,2 mL de uma mistura de amido em tampão $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-NaOH}$ 0,05M pH6,0 na proporção 2:1. Uma unidade inibidora de amilase (UIA) foi arbitrariamente definida como a quantidade de IA necessária para inibir 1 UA nas condições de ensaio e expressa em UIA/g de milho em base seca (bs). Os resultados obtidos foram calculados conforme equações 1 e 2. A equação 1 foi utilizada para determinar atividade amilásica inicial sem a interação com IA, enquanto que na equação 2 determinou a atividade inibidora de amilase em unidades de inibição por mL de extrato contendo IA.

$$UA = \frac{7,5 \times \left[0,667 - \left(\frac{A \times 0,667}{B} \right) \right]}{0,1} \quad (1)$$

$$UIA / ml = \left\{ UA - \left[\frac{7,5 \times \left[0,667 - \left(\frac{C \times 0,667}{D} \right) \right]}{0,1} \right] \right\} \times \frac{1000}{\text{extrato de AI } (\mu\text{l})} \quad (2)$$

Onde: UA = atividade amilásica sem interação com o IA (controle da atividade amilásica); A = absorbância (DO) a 540 nm, correspondente ao controle de amilase;

B = DO a 540 nm correspondente ao controle de amido; **C** = DO a 540 nm correspondente a interação entre amilase e IA; **D** = DO a 540 nm correspondente ao controle de amido da interação entre amilase e IA.

Análise microbiológica: Um kg de milho foi homogeneizado e uma amostra representativa finamente triturada. Uma alíquota de 10 g de milho triturado foi homogeneizada em 90 mL de água peptonada estéril a 0,1% e submetida a diluições seriadas até o fator 10^{-6} . De cada diluição semeou-se 1,0 mL em BDA (pH 4,0) contendo 50 µg/mL de cloranfenicol e incubou-se a 25°C por 6 dias. A contagem total de bolores e leveduras, *Fusarium* spp. e outros gêneros, identificados conforme NELSON et al. (1983), SINGH et al. (1991) e SAMSON et al. (1995), foram expressos em unidades formadoras de colônia - ufc/g.

Determinação de fumonisina: Na determinação de fumonisinas empregou-se CLAE (SHEPHARD et al., 1990) modificado por UENO et al. (1993). Uma quantidade de 200 g de milho foi triturada até atingir granulometria de 30-100 “mesh”, homogeneizada e 10 g adicionada a 30 mL de metanol:água (3:1, v/v) mantida a 150 rpm por 30 min. A suspensão foi centrifugada a 4.500 x g por 10 min e submetida à limpeza (minicoluna de troca aniônica Sep Pak accell plus QMA, Waters Co., Ltd.), sendo as fumonisinas eluída com 10 mL de ácido acético a 0,5% em metanol. O eluato foi seco (N_2 a 40°C) e o resíduo solubilizado em metanol:água (3:1, v/v), derivatizado com o-ftaldialdeído e analisado em CLAE sistema isocrático de fase reversa, empregando coluna C_{18} – CLC-ODS (M) (4,6 x 250 mm, Shimadzu). Os comprimentos de onda de excitação e emissão foram 335 nm e 450 nm, respectivamente. A fase móvel consistiu de $CH_3OH:NaH_2PO_4$ 0,1 M (80:20, v/v) pH 3,3, ajustado para o fluxo de 1,0 mL/min. Os limites de detecção para FB_1 e FB_2 foram de 50 ng/g e 80 ng/g, respectivamente.

Análise estatística: O nível de IA, contagem total de bolores e leveduras, contagem de *Fusarium* spp., *Penicillium* spp., *Cladosporium* spp. e levedura, e concentração de fumonisinas nos dois grupos de híbridos (ciclo precoce e super precoce) foram analisados e comparados em software SAS, versão 6.12 (SAS Institute, 1988). O teste de Tukey foi aplicado para detectar diferenças significativas entre os grupos ($P < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os híbridos de milho classificam-se em ciclo precoce e super precoce, baseados no tempo necessário para o florescimento pós-emergência da planta (GERAGE & GOMES, 1997). As características de precocidade asseguram a colheita de safrinha no período de inverno e estiagem, plantada em março e colhida em setembro.

A atividade do IA contra amilase de *F. verticillioides* foi detectada em todos os 37 híbridos de milho (Tabela 1), com nível de inibição variando de 5,48 a 16,00 UIA/g de milho no ciclo precoce (MASTER e AG5011, respectivamente) e 9,29 a 15,54 UIA/g de milho no ciclo super precoce (ZEN8202 e ZEN8490, respectivamente). Todavia, não ocorreu diferença significativa no nível de IA entre o dois tipos de ciclo ($P = 0,08$, Figura 2), i.e., o teste de Tukey indicou que a diferença das médias do nível de IA 10,01 (ciclo precoce) e 11,48 UIA/g de milho (ciclo super precoce) não foi significativa.

As Tabelas 2 e 3 (ciclo precoce e super precoce, respectivamente) apresentam os resultados sobre a contagem fúngica, micoflora e concentração de fumonisinas, complementadas com a Figura 3 mostrando frequência de gêneros fúngicos detectadas nos híbridos de milho. Os principais integrantes da micoflora do milho constituiu-se dos gêneros *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Cladosporium*, contendo também leveduras e fungos não esporulados.

Nos híbridos de ciclo precoce, com a contagem total de bolores e leveduras variando de $1,2 \times 10^3$ a $2,4 \times 10^6$ ufc/g, ocorreu predominância de *Fusarium* spp. (76,2%), com as contagens de $1,0 \times 10^3$ e $2,4 \times 10^6$ ufc/g obtidas nos híbridos C435 e AS3466, respectivamente. *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp., *Cladosporium* spp., leveduras e fungos não esporulados ocorreram em 47,6% (contagem entre $1,0 \times 10^2$ a $5,0 \times 10^4$ ufc/g), 9,5% ($5,0 \times 10^2$ a $5,0 \times 10^4$ ufc/g), 38,1% ($5,0 \times 10^2$ a $3,0 \times 10^4$ ufc/g), 71,4% ($4,0 \times 10^2$ a $5,6 \times 10^5$ ufc/g) e 23,8% ($4,0 \times 10^2$ a $5,6 \times 10^5$ ufc/g) dos híbridos, respectivamente (Tabela 2, Figura 3). Enquanto que nos híbridos de ciclo super precoce a contagem total de bolores e leveduras com $4,5 \times 10^3$ a $1,6 \times 10^6$ ufc/g predominou *Fusarium* spp. com 87,5% (contagem entre $8,0 \times 10^2$ a $9,5 \times 10^5$ ufc/g), seguida de leveduras com 87,5% ($3,5 \times 10^3$ a $3,5 \times 10^5$ ufc/g) e *Penicillium* spp. com 62,5% ($3,0 \times 10^2$ a $4,5 \times 10^5$ ufc/g). Entretanto, a ocorrência de *Cladosporium* spp. e fungos não esporulados diminuiu em relação aos híbridos de ciclo precoce, com 25,0 % ($5,0 \times 10^2$ a $5,0 \times 10^5$ ufc/g) e 12,5% ($1,5 \times 10^4$ a $1,2 \times 10^6$ ufc/g), respectivamente.

A concentração máxima de fumonisina atingiu 2,67 µg/g (híbrido BR205), sendo que nos híbridos de ciclo precoce os níveis situaram-se entre 0,08 a 2,67 µg/g com positividade de 52,4% (Tabela 2), em relação a 0,05 a 1,54 µg/g nos híbridos de ciclo super precoce com positividade de 62,5% (Tabela 3).

Estudo semelhante realizado na Argentina com 178 amostras de milho também indicou a predominância do gênero *Fusarium*, seja na frequência ou densidade relativa, seguido por *Penicillium* spp. e outros gêneros, representados por *Alternaria* spp., *Aspergillus* spp., *Cladosporium* spp., *Nigrospora* spp. e *Trichoderma* spp. Por outro lado, *Fusarium* spp. apresentou-se como o maior constituinte da microbiota interna do milho, enquanto que *Penicillium* predominou na microbiota externa (GONZÁLEZ et al., 1995).

A concentração de fumonisina (0,05 a 2,67 µg/g, tabelas 2 e 3) foi inferior aos valores detectados no milho e produtos derivados nos outros países (MURPHY et al., 1993; DOKO et al., 1995; LOGRIECO et al., 1995; MUNKVOLD & DESJARDINS, 1997). Ênfase especial deve ser dada aos valores inferiores descritos na Tabela 2 e 3, quando comparados aos resultados prévios obtidos por HIROOKA et al. (1996) e ONO et al. (2001). Salienta-se que o milho estudado foi imediatamente seco após colheita. O fato implicaria na redução drástica da concentração final de fumonisina, diferindo de produção comercial, cuja demora na secagem devido ao congestionamento nos secadores favoreceria o desenvolvimento fúngico e conseqüente produção de micotoxinas. WARFIELD & GILCHRIST (1999) detectaram a maior produção de fumonisina nos estágios finais de maturação dos grãos. A “American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians” recomenda concentração máxima de 5 µg de FB₁/g em alimentação destinada a equinos (MUNKVOLD & DESJARDINS, 1997).

Os híbridos AS32, XL360 (Tabela 2) e DINA766 (Tabela 3) foram positivos para fumonisina, porém não se constatou presença do gênero *Fusarium*. Provavelmente a própria interação entre os constituintes da microbiota injuriou os conídios, dificultando a recuperação. A alta contagem de leveduras pode ser apontada como responsável pela observação, já que são capazes de interferir no crescimento de *Fusarium* spp. (PETERSON et al., 1998; JANISIESEWICZ et al., 1994; CAMILO et al., 2000).

A análise estatística não detectou diferença significativa entre o grupo dos híbridos precoce e super precoce, referente a fatores envolvidos na qualidade fitossanitária ($P > 0,05$), i.e., nível de fumonisina, contagem total de bolores e leveduras ($P = 0,74$), contagem de *Fusarium* spp. ($P = 0,81$), contagem de *Penicillium* spp. ($P = 0,052$), contagem de

Cladosporium spp. ($P = 0,35$) e contagem de leveduras ($P = 0,98$), conforme apresentado na Figuras 4A, 3B, 3C, 3D, 3E e 3F, respectivamente. *Aspergillus* spp. foi detectado em apenas dois híbridos pertencentes ao ciclo precoce, indicando baixa competitividade no estágio inicial de pós-colheita.

O estudo comparativo indicou que não houve diferença entre os dois grupos de ciclo avaliados, sob aspecto fitossanitário. Portanto, o produtor poderia direcionar a preocupação centrada nos fatores intrínsecos inerentes de cada híbrido comercialmente disponível, atendendo às necessidades particulares, salientando-se a vantagem de híbridos do ciclo super precoce, que poderia permitir rapidez na colheita e conseqüentemente, o melhor preço.

Tabela 1: Nível de inibidor de amilase contra amilase de *F. verticillioides* nos híbridos de milho de ciclo precoce e super precoce.

Ciclo Precoce		Ciclo Super Precoce	
Híbrido	Nível de Inibição (UIA/g)	Híbrido	Nível de Inibição (UIA/g)
AG 5011	16,00±0,42	ZEN 8490	15,54±1,03
XL 360	14,07±0,16	XL 220	14,05±0,48
FT 9006	13,93±0,22	XL EXP 9663	13,82±0,75
DINA 556	12,51±0,43	AGX 9682	13,24±1,80
C 435	12,42±0,98	XL 221	12,91±0,71
C 333	10,57±0,68	FT 9043	11,75±0,72
P 3041	10,56±0,15	C 625	11,65±0,51
SG 150	10,10±0,80	ZEN 8392	11,26±0,47
EXCELER	9,75±0,71	C 701	10,82±0,87
AS 32	9,69±0,23	DINA 769	10,43±0,85
BR 205	9,67±0,30	C 901	10,33±1,02
AS 3466	9,46±0,52	DINA 766	9,76±0,42
AG 122	9,45±0,81	AG 3010	9,71±0,69
P 3071	9,31±0,64	AGX 9632	9,54±0,99
DINA 1000	9,16±0,16	DENSUS	9,51±0,82
BR 3123	8,54±0,70	ZEN 8202	9,29±0,42
BR 206	8,38±0,75		
P 3027	7,46±0,67		
XL 345	6,98±1,47		
ZEN 8501	6,70±0,53		
MASTER	5,48±0,36		

UIA/g: unidade inibidora de amilase por g de milho em bs.

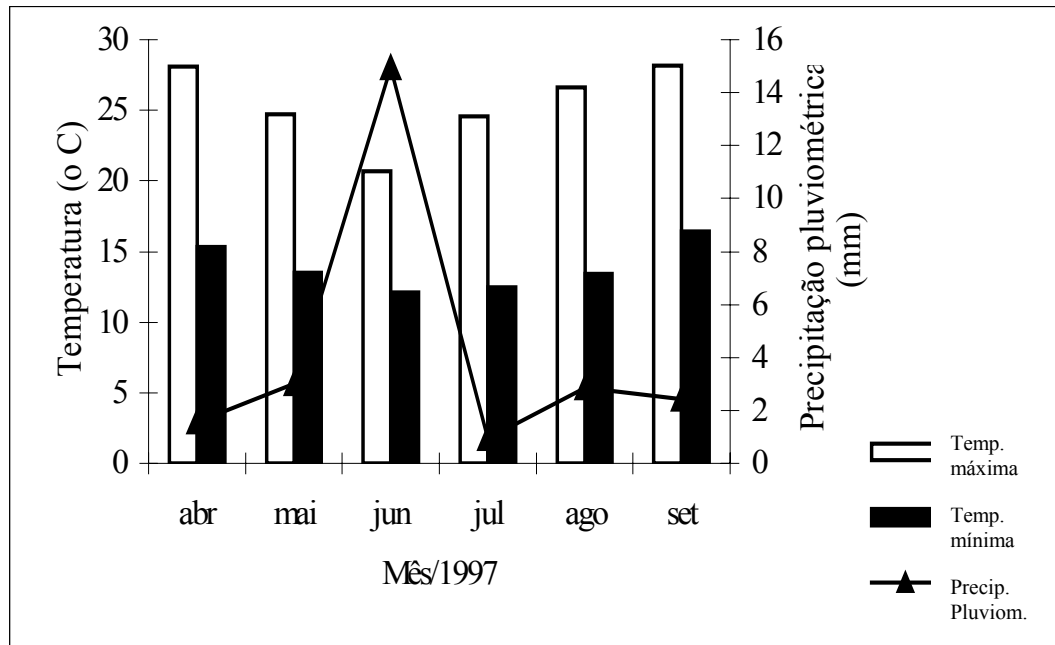


Figura 1: Condições climáticas durante o cultivo e colheita dos híbridos de milho avaliados.

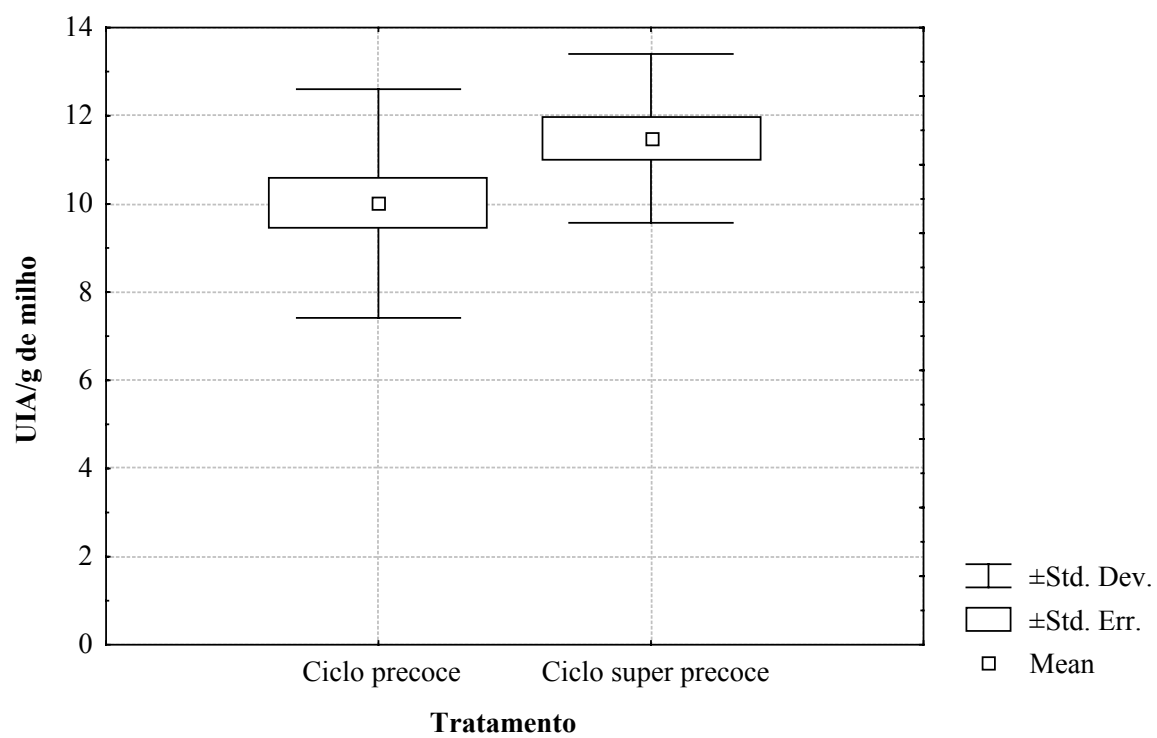


Figura 2: Comparação do nível de inibidor de amilase entre os grupos de híbridos de ciclo precoce e de ciclo super precoce.

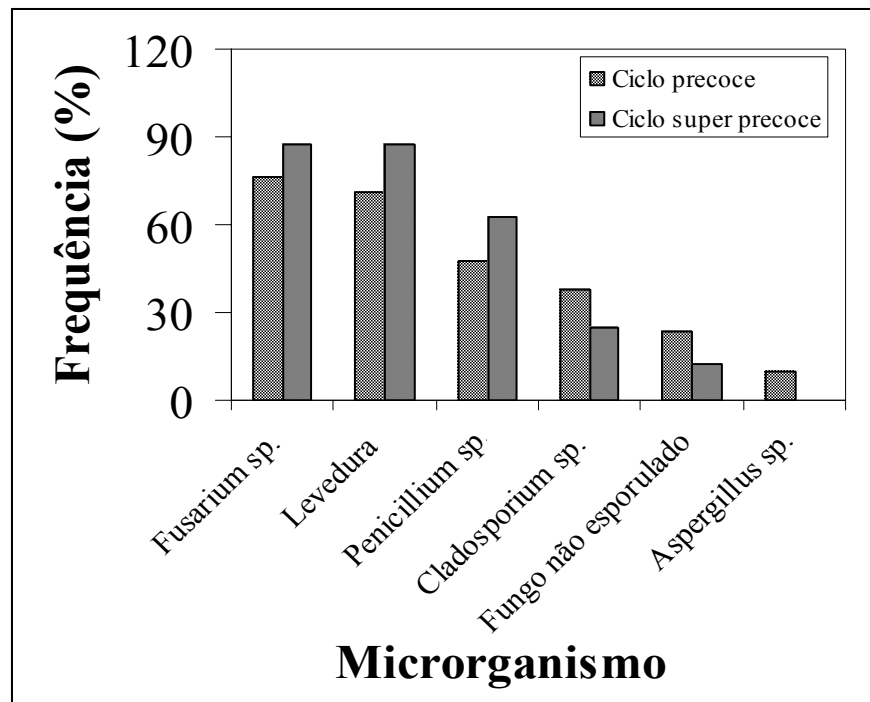


Figura 3: Frequência dos microrganismos presentes na microflora dos híbridos de ciclo precoce e super precoce.

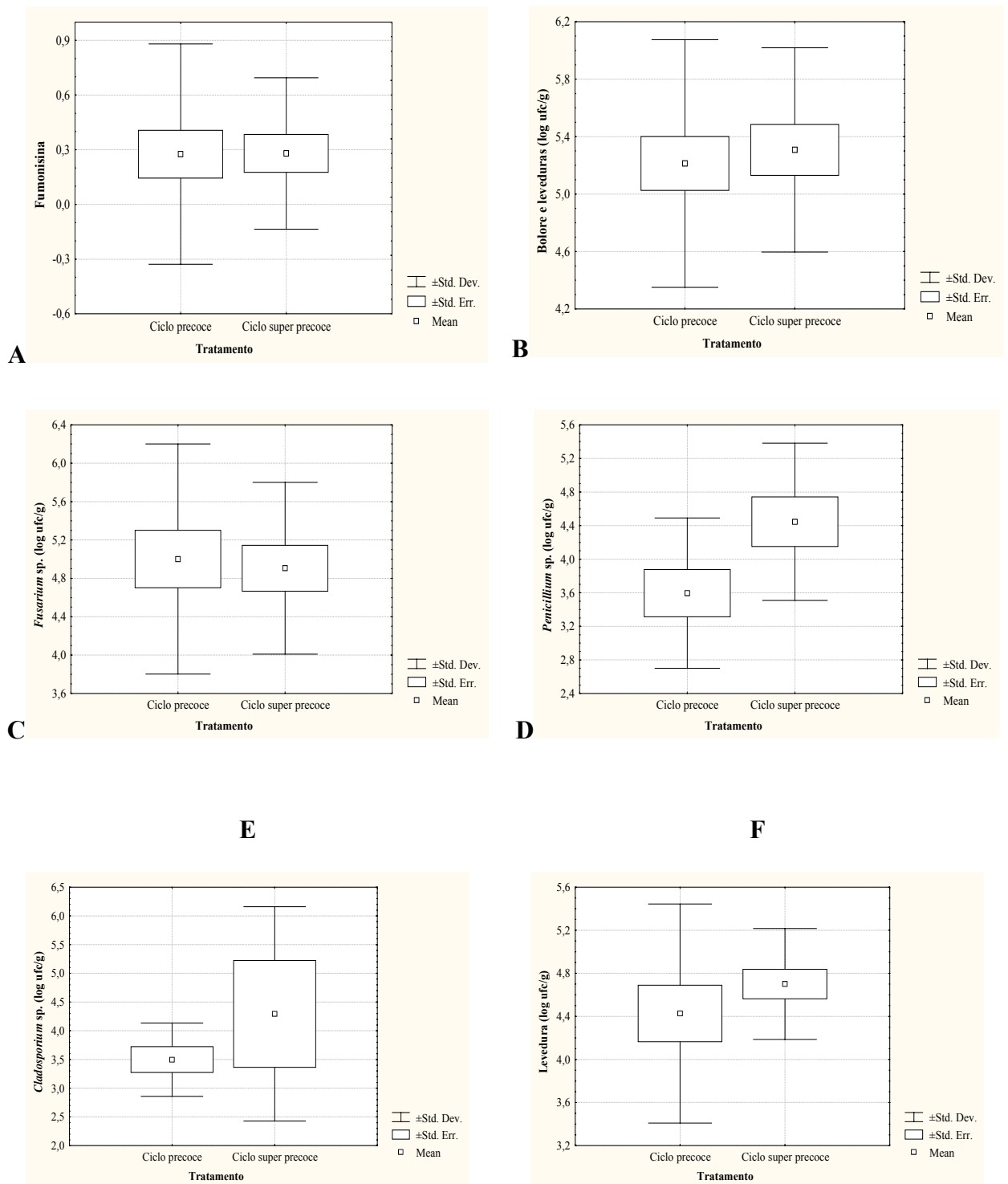


Figura 4: Comparação dos parâmetros fitossanitários entre os grupos de híbridos de ciclo precoce e super precoce. **A.** Fumonisina. **B.** Bolores e leveduras. **C.** *Fusarium* spp. **D.** *Penicillium* spp. **E.** *Cladosporium* spp. **F.** Leveduras.

AGRADECIMENTOS

O trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento e Pesquisa-CNPq. Os autores agradecem ao CNPq pela bolsa de doutorado de Edson L. Z. Figueira (Processo 144787/1998-9) e pela bolsa de produtividade a Elisa Y. Hirooka; a Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES (Brasil), pela bolsa doutorado sanduíche a Edson L. Z. Figueira (Processo BEX0119/01-6).

CONCLUSÃO

O IA foi detectado nos 37 híbridos de milho pertencentes ao ciclo precoce e super precoce, sendo que o elegido (AG5011) apresentou maior atividade contra amilase de *F. verticillioides*. O híbrido AG5011 permitiu a purificação de duas novas proteínas bioativas, sendo uma obtida por extração com tampão acetato de sódio (massa molecular aparente de 23,8 kDa e pI 5,4) e a outra com etanol (19,7 kDa e pI 3,6). Embora o aumento do nível de IA (23,8 kDa) resultasse na diminuição da contagem de *Fusarium* spp. e nível de fumonisina, não se detectou correlação entre estes parâmetros ($P > 0,05$), sugerindo a existência de outros fatores de defesa, além de IA estudado. A atividade destes inibidores não se restringiu apenas a fungos micotoxigênicos relevantes no milho, mas também inibiram enzimas de insetos de interesse agrônômico, gerando novas perspectivas no estudo destas proteínas contra resistência a predadores/fitopatógenos. I.e., desenvolvimento de plantas biotecnologicamente melhoradas.

REFERÊNCIAS

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

ACOMPANHAMENTO DA SITUAÇÃO AGROPECUÁRIA NO PARANÁ, Curitiba, v.23, n.2, p.14, fev. 1997.

APPLEBAUM, S.W.; KONIJIN, A.M. Factors affecting the development of *Tribolium castaneum* (Herbst) on wheat. **Journal of Stored Products Research**, v.2, p.323-329, 1967.

AZIZ, N.H.; SHAHIN, A.A.; ABOU-ZEID, A.A.; EL-ZEANY, E S.A. Correlação de crescimento e produção de aflatoxina por flavus de *Aspergillus* com alguns metais essenciais em gama irradiado milho esmagado. **Nahrung**, v.44, p.354-359, 2000.

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

BACON, C.W.; PORTER, J.K.; NORRED, W.P. Toxic interaction of fumonisin B₁ and fusaric acid measured by injection into fertile chicken eggs. **Mycopathologia**, v.129, p.29-35, 1995.

BADRIA, F.A.; ABBAS, H.K.; SHIER, W.T. Chemical transformation of hydrolyzed fumonisin B₁ to hydrolyzed fumonisin B₂. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.43, n.8, p.1989-1992, 1995.

BASSE, C.W.; FATH, A.; BOLLER, T. High affinity binding of a glycopeptide elicitor to tomato cell and microsomal membranes and displacement by specific glycan suppressors. **Journal of Biological Chemistry**, v.269, p.14724-14731, 1993.

BEADLE, G.W. The ancestry of corn. **Scientific American**, v.242, p.112-119, 1980.

BELITZ, H.D.; WEDER, J.K.P. Protein inhibitors of hydrolases in plant foodstuffs. **Food Reviews International**, v.6, n.2, p.151-211, 1990.

BENNETT, G.A.; RICHARD, J.L. Influence of processing on *Fusarium* mycotoxins in contaminated grains. **Food Technology**, p.235-238, 1996.

BENNETT, G.A.; RICHARD, J.L.; PLATTNER, R.D. et al. Distribution of fumonisins in food and feed products prepared from contaminated corn. In: JACKSON, L.S.; DE VRIES, J.W.; BULLERMAN, L.B. eds. **Fumonisin in food**. New York, Plenum Press, p. 317-322, 1994.

BERRE-ANTON, V.; NAHOUM, V.; PAYAN, F.; ROUGÉ, P. Molecular basis for the specific for the binding of different α -amylase inhibitors from *Phaseolus vulgaris* seeds to the active site of α -amylase. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.38, p.657-665, 2000.

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

BHAT, R.V.; SHETTY, P.H.; AMRUTH, R.P.; SUDERSHAN, R.V. A foodborne disease outbreak due to the consumption of fumonisin contaminated sorghum and maize. **Journal of Toxicology Clinical Toxicology**, v.35, p.249-255, 1997.

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

BLANCO-LABRA, A.; CHAGOLLA-LOPEZ, A.; MARTÍNEZ-GALLARDO, N.; VALDES-RODRIGUEZ, S. Further characterization of the 12 kDa protease/alpha-amylase inhibitor present in maize seeds. **Journal of Food Biochemistry**, v.19, p.27-41, 1995.

BLANCO-LABRA, A.; ITURBE-CHIÑAS, F.A. Purification and characterization of an α -amylase inhibitor from maize (*Zea mays*). **Journal of Food Biochemistry**, v.5, p.1-17, 1981.

BLANCO-LABRA, A.; SANDOVAL-CARDOSO, L.; MENDIOLA-OLAYA, E.; VALDÉS-RODRÍGUEZ, S.; LÓPEZ, M.G. Purification and characterization of a glycoprotein α -amylase inhibitor from tepary bean seeds (*Phaseolus acutifolius* A. Gray). **Journal of Plant Physiology**, v.149, p.650-656, 1996.

BLOOM, H.; BEIER, H.; GROSS, H.S. Improved silver staining of the plant protein, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v.8, p.93-99, 1987.

BLUMWALD, E.; AHARON, G.S.; LAM, B.C.H. Early signal transduction pathways in plant-pathogen interactions. **Plant Science**, v.3, n.9, p.342-346, 1998.

BONDY, G.S.; SUZUKI, C.A.M.; MUELLER, R.W.; FERNIE, S.M.; ARMSTRONG, C.L.; HIERLIHY, S.L.; SAVARD, M.E.; BARKER, M.G. Gavage administration of the fungal toxin fumonisin B₁ to female Sprague-Dawley rats. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v.53, p.135-151, 1998.

BOUDART, G.; DECHAMP-GUILLAUME, G.; LAFITTE, C.; RICART, G.; BARTHE, J.P.; MAZAU, D.; ESQUERRE-TUGAYE, M.T. Elicitors and suppressors of hydroxyproline rich glycoprotein accumulation are solubilized from plant cell walls by endopolygalacturonase. **European Journal of Biochemistry**, v.232, p.449-457, 1995.

BOWLES, D.J. Defense-related proteins in higher plants. **Annual Review of Biochemistry**, v.59, p.873-907, 1990.

BOWMAN, D. E. Amylase inhibitor of navy beans. **Science**, v.102, p.358-359, 1945.

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

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

BRYDEN, W.L.; LOVE, R.J.; BURGESS, L.W. Feeding grain contaminated with *Fusarium graminearum* and *Fusarium moniliforme* to pigs and chickens. **Australian Veterinary Journal**, v.64, p.225-226, 1987.

BUIM, M.R.; BRACARENSE, A.P.F.R.L.; GUIMARÃES, I.G.; KAWAMURA, O.; UENO, Y.; HIROOKA, E.Y. Immunohistochemistry of fumonisin in poultry using avidin-biotin-peroxidase system. **Natural Toxins**, v.7, p.279-282, 1999.

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

BULLERMAN, L.B.; DRAUGHON, F.A. *Fusarium moniliforme* and fumonisin symposium - introduction. **Journal of Food Protection**, v.57, p.513, 1994.

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

BUONOCORE, V.; GIARDINA, P.; PARLAMENT, R.; POERIO, E.; SILANO, V. Characterization of chicken pancreas alpha-amylase isozymes and interaction with protein inhibitor from wheat kernel. **Journal of Science and Food Agriculture**, v.35, p.225-232, 1984.

BUONOCORE, V.; SILANO, V. Biochemical, nutritional and toxicological aspects of alpha-amylase inhibitors from plant food. **In Experimental Medicine and Biology**, v.199, 1986.

CAMILO, S.B.; ONO, C.J.; UENO, Y.; HIROOKA, E.Y. Anti-*Fusarium moniliforme* activity and fumonisin biodegradation by corn and silage microflora. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.43, p.159-164, 2000.

CANTAGALLI, P.; DIGIORGIO, G.; MORISI, G.; POCCHIARI, F.; SILANO, V. Purification and properties of three albumins from *Triticum aestivum* seeds. **Journal of Science and Food Agriculture**, v.22, p.256-259, 1971.

CASTELLÁ, G.; BRAGULAT, M.R.; CABAÑES, F.J. Surveillance of fumonisins in maize-based feeds and cereals from Spain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.47, p.4707-4710, 1999.

CASTELO, M.M.; KATTA, S.K.; SUMNER, S.S.; HANNA, M.A.; BULLERMAN, L.B. Extrusion cooking reduces recoverability of fumonisin B₁ from extruded corn grits. **Journal of Food Science**, v.63, n.4, p.696-698, 1998.

CHAMBERLAIN, W.J.; BACON, C.W.; NORRED, W.P.; VOSS, K.A. Levels of fumonisin B₁ in corn naturally contaminated with aflatoxins. **Food and Chemical Toxicology**, v.31, n.12, p.995-998, 1993.

CHAN, K.Y.; WASSERMAN, B.P. Direct colorimetric assay of free thiol groups and disulfite bonds in suspension of solubilized and particulated cereal proteins. **Cereal Chemistry**, v.78, p.22-26, 1993.

CHEN, Z.Y.; BROWN, R.L.; LAX, A.R.; CLEVELAND, T.E.; RUSSIN, J.S. Inhibition of plant-pathogenic fungi by a corn trypsin inhibitor overexpressed in *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, n.3, p.1320-1324, 1999a.

CHEN, Z.Y.; BROWN, R.L.; RUSSIN, J.S.; LAX, A.R.; CLEVELAND, T.E. A corn trypsin inhibitor with antifungal activity inhibits *Aspergillus flavus* α -amylase. **Phytopathology**, v.89, n.10, 1999b.

CHRISTENSEN, C.M.; KAUFMANN, H.H. Microflora. In: CHRISTENSEN, C.M. **Storage of cereal grains and their products**. Minnesota, American Association of Cereal Chemists, 1974, p. 158-192.

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

CHRZASZCZ, T.; JANICKI, J. The inactivation of animal amylase by plant paralyzers and the presence of inactivating substances in solutions of animal amylase. **Biochemical Journal**, v.28, p.296-304, 1934.

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

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, jul/2001.

COVENTRY, H.S.; DUBERY, I.A. Lipopolysaccharides from *Burkholderia cepacia* contribute to an enhanced defensive capacity and the induction of pathogenesis-related proteins in *Nicotiana tabacum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.58, p.149-158, 2001.

DANGL, J.L.; DIETRICH, R.A.; RICHBERG, M.H. Death don't have on mercy: cell death programs in plant-microbe interactions. **Plant Cell**, v.8, p.1793-1807, 1996.

de WIT, P.J.G.M. Molecular characterization of gene-for-gene systems in plant-fungus interactions and the application of avirulence genes in control of plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v.30, p.391-418, 1992.

DEPARTAMENTO DE AGRICULTURA DOS EUA, out/2001.

DESJARDINS, A.E.; MANANDHAR, G.; PLATTNER, R.D.; MARAGOS, C.M.; SHRESTHA, K.; McCORMICK, S.P. Occurrence of *Fusarium* species and mycotoxins in Nepalese maize and wheat and the effect of traditional processing methods on mycotoxin levels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, p.1377-1383, 2000.

DESJARDINS, A.E.; PLATTNER, R.D.; NELSEN, T.C.; LESLIE, J.F. Genetic analysis of fumonisin production and virulence of *Gibberella fujikuroi* mating population A (*Fusarium moniliforme*) on maize (*Zea mays*) seedlings. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, p.79-86, 1995.

DIETRICH, A.; MAYER, J.E.; HAHLBROCK, K. Fungal elicitor triggers rapid, transient and specific protein phosphorylation in parsley cell suspension cultures. **Journal of Biological Chemistry**, v.265, p.6360-6338, 1990.

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

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

DOMBRINK-KURTZMAN, M.A.; DVORAK, T.J.; BARRON, M.E.; ROONEY, L.W. Effect of nixtamalization (alkaline cooking) on fumonisin-contaminated corn for production of masa and tortillas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, p.5781-5786, 2000.

DOWSWELL, C.R.; PALIWAL, R.L.; CANTRELL, R.P. **Maize in the third world**. Oxford, Westview Press, Inc., 1996, p. 1-34.

ENYEDI, A.J.; YALPANI, N.; SILVERMAN, P.; RASKIN, I. Signal molecules in systemic plant resistance to pathogens and pestes. **Cell**, v.70, p.879-886, 1992.

EYRE-WALKER, A.; GAUT, R.L.; HILTON, H.; FELDMAN, D.L.; GAUT, B.S. Investigation of the bottleneck leading to the domestication of maize. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, p.4441-4446, 1998.

FAKHOURY, A.M.; WOLOSHUK, C.P. Inhibition of growth of *Aspergillus flavus* and fungal α -amylases by a lectin-like protein from *Lablab purpureus*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.14, p.955-961, 2001.

FANCELLI, A.L. Tecnologia da produção. In: FANCELLI, A.L.; ALMEIDA LIMA, U. **Milho – produção, processamento e transformação industrial**. São Paulo: Secretaria da Indústria e Comércio, Ciência e Tecnologia, 1983. p. 1-68 (série 5).

FAO (1991). FAO yearbook, production. Vol. 45. FAO Statistics Series n.104, Rome; Food and Agriculture Organization of the United Nations, p. 61-184.

FAO/WHO (2001). Summary and conclusions. In 56th Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Geneva, 6-15 February 2001.

FARMER, E.; JOHNSON, R.; RYAN, C.A. Regulation of expression of proteinase inhibitor genes by methyl jasmonate and jasmonic acid. **Plant Physiology**, v.98, p.995-1002, 1992.

FARMER, E.; RYAN, C.A. Octadecanoid precursors of jasmonic acid activated the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. **Plant Cell**, v.4, p.129-134, 1992.

FENG, G.H.; CHEN, M.; KRAMER, K.J.; REECK, G. Reverse-phase high-performance liquid chromatographic separation of wheat proteinaceous inhibitors of insect and mammalian alpha-amylases. **Cereal Chemistry**, v.68, n.1, p.95-99, 1991.

FENG, G.H.; RICHARDSON, M.; CHEN, M.S.; KRAMER, K.J.; MORGAN, T.D.; REECK, G.R. Alpha-amylase inhibitors from wheat: amino acid sequences and patterns of inhibition of insect and human alpha-amylases. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.26, n.5, p.419-426, 1996.

FIGUEIRA, E.L.Z.; BLANCO-LABRA, A.; GERAGE, A.C.; ONO, E.Y.S.; MENDIOLA-OLAYA, E.; UENO, Y.; HIROOKA, E.Y. (accepted in Plant Disease, August 26, 2002). New amylase inhibitor present in corn seeds active *in vitro* against amylase from *Fusarium verticillioides*.

FIGUEIRA, E.L.Z.; HIROOKA, E.Y. Culture medium for amylase production by toxigenic fungi. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.43, p.461-467, 2000.

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

FRANCO, O.L.; RIGDEN, D.J.; MELO, F.R.; SÁ, M.F.G. Plant α -amylase inhibitors and their interaction with insect α -amylase. Structure, function and potential for crop protection. **European Journal of Biochemistry**, v.269, p.397-412, 2002.

FRELS, J.M.; RUPNOW, J.H. Purification and partial characterization of two alpha-amylase inhibitors from black bean. **Journal of Food Biochemistry**, v.8, p.281-301, 1984.

FREYTAG, S.; ARABATZIS, N.; HAHLBROCK, K.; SCMELZER, E. Reversible cytoplasmic rearrangements precede wall apposition, hypersensitive cell death and defense related gene activation in potato/*Phytophthora infestans* interactions. **Planta**, v.194, p.123-135, 1994.

GALINAT, W.C. Evolution of corn. **Advances in Agronomy**, v.47, p.203-229, 1992.

GATEHOUSE, A.; FENTON, K.A.; JEPSON, I.; PAVEY, D.J. The effects of alpha-amylase inhibitors on insect storage pests: inhibition of alpha-amylase in vitro and effects on development in vivo. **Journal of Science Food Agriculture**, v.37, p.727-734, 1986.

GATEHOUSE, A.M.R.; HILDER, V.A.; GATEHOUSE, J.A. Control of insect pests by plant genetic engineering. **Proceeding Royal Society of Edinburgh**, v.99B (3/4), p.51-60, 1992.

GELDERBLOM, W.C.A.; CAWOOD, M.E.; SNYMAN, S.D.; MARASAS, W.F.O. Fumonisin B₁ dosimetry in relation to cancer initiation in rat liver. **Carcinogenesis**, v.105, p.209-214, 1994.

GELDERBLOM, W.C.A.; CAWOOD, M.E.; SNYMAN, S.D.; VLEGGGAAR, R.; MARASAS, W.F.O. Structure activity relationship of fumonisins in short-term carcinogenesis and citotoxicity assays. **Food and Chemical Toxicology**, v.31, p.407-414, 1993.

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

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

GEOFFROY, P.; LEGRAND, M.; FRITIG, B. Isolation and characterization of a proteinaceous inhibitor of microbial proteinases induced during the hypersensitive reaction of tobacco to tobacco mosaic virus. **Molecular Plant Microbe Interaction**, v.3, n.5, p.327-333, 1990.

GERAGE, A.C.; GOMES, J. **Avaliação estadual de cultivares de milho “safrinha” – 1997**. Informe da Pesquisa – IAPAR, Ano XVII, n.125. 1997. 19p.

GIBBS, B.F.; ALLI, I. Characterization of a purified α -amylase inhibitor from white kidney beans (*Phaseolus vulgaris*). **Food Research International**, v.31, n.3, p.217-225, 1998.

GOMES, V.M.; XAVIER-FILHO, J. Biochemical defenses of plants. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v.37, n.2, p.371-383, 1994.

GOMEZ-LEYVA, J.F. **Aislamiento y caracterización de las proteínas PR-5 de 22 kDa presentes en semillas de maíz**. Irapuato, 1997. Disertación (Maestría en Ciencias) – Depto.de Biotecnología y Bioquímica. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN.

GÓMEZ-LEYVA, J.F.; BLANCO-LABRA, A. Bifunctional α -amylase/trypsin inhibitor activity previously ascribed to the 22 kDa TL protein, resided in a contaminant protein of 14 kDa. **Journal of Plant Physiology**, v.158, p.177-183, 2001.

GONZÁLEZ, H.H.L.; RESNIK, S.L.; BOCA, R.T.; MARASAS, W.F.O. Mycoflora of Argentinian corn harvested in the main production area in 1990. **Mycopathologia**, v.130, p.29-36, 1995.

GRAHAM, T.L.; GRAHAM, M.Y. Signaling in soybean phenylpropanoid responses. **Plant Physiology**, v.110, p.1123-1133, 1996.

GROVES, F.D.; ZHANG, L.; CHANG, Y.S.; ROSS, P.F.; CASPER, H.; NORRED, W.P.; YOU, W.C.; FRAUMENI JR, J.F. Fusarium mycotoxins in corn and corn products in a high-risk area for gastric cancer in Shandong Province, China. **Journal of AOAC International**, v.82, n.3, p.657-662, 1999.

GUTIÉRREZ, C.; SANCHEZ-MONGE, R.; GOMEZ, L.; RUIZ-TAPIADOR, M.; CASTAÑERA, P.; SALCEDO, G. α -amylase activities of agricultural insect pests are specifically affected by different inhibitor preparations from wheat and barley endosperms. **Plant Science**, v.72, p.37-44, 1990.

HAHLBROCK, K.; SCHEEL, D.; LOGEMANN, E.; NURNBERGER, T.; PARNISKE, M.; REINOLD, S.; SACKS, W.R.; SCHMELZER, E. Oligopeptide elicitor-mediated defense gene activation in culture parsley cells. **Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America**, v.92, p.4150-4157, 1995.

HAMMOND-KOSACK, K.E.; JONES, J.D.G. Resistance gene-dependent plant defense response. **Plant Cell**, v.8, p.1773-1791, 1996.

HASCHEK, W.M.; GUMPRECHT, L.A.; SMITH, G.; TUMGLESON, M.E.; CONSTABLE, P.D. Fumonisin toxicosis in swine: An overview of porcine pulmonary edema and current perspectives. **Environmental Health Perspectives**, v.109, supplement 2, p.251-257, 2001.

HASCHEK, W.M.; MOTELIN, G.; NESS, D.K.; HARLIN, K.S.; HALL, W.F.; VESONDER, R.; PETERSON, R.E.; BEASLEY, V.R. Characterization of fumonisin toxicity in orally and intravenously dosed swine. **Mycopathologia**, v.117, p.83-96, 1992.

HEATH, M.C. Signalling between pathogenic rust fungi and resistant or susceptible host plants. **Annals of Botany**, v.80, p.713-720, 1997.

HILL, R.A.; WILSON, D.M.; McMILLIAN, W.W. Ecology of the *Aspergillus flavus* group and aflatoxin formation in maize and groundnut. In: LACEY, J. **Trichothecenes and other mycotoxins**. Chichester, John Wiley Sons, 1985, p.79-95.

HILTON, H.; GAUT, B.S. Speciation of domestication in maize and its wild relatives: Evidence from the globulin-1 gene. **Genetics**, v.150, p.863-872, 1998.

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

HO, M.F.; YIN, X.; FILHO, F.F.; LAJOLO, F.; WHITAKER, J.R. **Naturally occurring α -amylase inhibitors: structure/function relationships**. Blackie Academic & Professional, London. In: Protein Structure Function Relationships in Foods. R.Y. YADA; R.L. JACKMAN; J.L. SMITH, eds. 1994. Chapter 5

HUANG, Z.; WHITE, D.G.; PAYNE, G.A. Corn seed proteins inhibitory to *Aspergillus flavus* and aflatoxin biosynthesis. **Phytopathology**, v.87, p.622-627, 1997.

HUYNH, Q.K.; BORGMEYER, J.R.; ZOBEL, J.F. Isolation and characterization of a 22 kDa protein with antifungal properties from maize seeds. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.182, p.1-15, 1992.

IGUTI, A.M.; LAJOLO, F.M. Isolation and purification of alpha-amylase inhibitors from beans (*Phaseolus vulgaris*). **Presented at VI Congress Pan-American Assn. of Biochemical Societies**, São Paulo, Brazil, 1990.

IPCS – International Programme on Chemical Safety. Fumonisin B₁. **Environmental Health Criteria 219**, World Health Organization, Finland, 2000. 150p.

ISHIMOTO, M.; KITAMURA, K. Growth inhibitory effects alpha-amylase inhibitor from the kidney bean, *Phaseolus vulgaris* (L.) on three species of bruchids (Coleoptera: Bruchidae). **Applied Entomology Zoology**, v.24, n.3, p.281-286, 1989.

ISHIMOTO, M.; SATO, T.; CHRISPEELS, M.J.; KITAMURA, K. Bruchid resistance of transgenic azuki bean expressing seed α -amylase inhibitor of common bean. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.79, p.309-315, 1996.

ISHIMOTO, M.; YAMADA, T.; KAGA, A. Insecticidal activity of an α -amylase inhibitor-like protein resembling a putative precursor of α -amylase inhibitor in the common bean, *Phaseolus vulgaris* L. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1432, p.104-112, 1999.

JACKSON, A.O.; TAYLOR, C.B. Plant-microbe interactions: life and death at the interface. **Plant Cell**, v.8, p.1651-1668, 1996.

JAFFÉ, W.G.; LETTE, L.V. Heat-labile growth-inhibiting factors in bean (*Phaseolus vulgaris*). **Journal of Nutrition**, v.94, p.203-210, 1968.

JANARDHANA, G.R.; RAVEESHA, K.A.; SHETTY, H.S. Mycotoxin contamination of maize grains grown in Karnataka (India). **Food and Chemical Toxicology**, v.37, p.863-868, 1999.

JANISIEWICZ, W.J.; PETERSON, D.L.; BORS, R. Control of storage decay of apples with *Sporobolomyces roseus*. **Plant Disease**, v.78, p.466-470, 1994.

JESCHKE, N.; NELSON, P.E.; MARASAS, W.F.O. Toxicity to ducklings of *Fusarium moniliforme* isolated from corn intended for use in poultry feed. **Poultry Science**, v.66, p.1619-1623, 1987.

JINDAL, N.; MAHIPAL, S.K.; ROTTINGHAUS, G.E. Occurrence of fumonisin B₁ in maize and poultry feeds in Haryana, India. **Mycopathologia**, v.148, p.37-40, 1999.

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

KATO, Y.T.A. Cytological studies of maize (*Zea mays*) and teosinte (*Zea mexicana*) in relation to their origin and evolution. **Mass Agric. Exp. Stn. Bull.** No. 635, Amherst, Mass. 1976.

KATTA, S.K.; JACKSON, L.S.; SUMNER, S.S.; HANNA, M.A.; BULLERMAN, L.B. Effect of temperature and screw speed on stability of fumonisin B₁ in extrusion-cooked corn grits. **Cereal Chemistry**, v.76, n.1, 1999.

KEDERA, C.J.; PLATTNER, R.D.; DESJARDINS, A.E. Incidence of *Fusarium* spp. and levels of fumonisin B₁ in maize in Western Kenya. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, n.1, p.41-44, 1999.

KEEN, N.T. Gene-for-gene complementary in plant-pathogen interactions. **Annual Review of Genetics**, v.24, p.2189-2194, 1990.

KELLER, H.; PAMBOUKDJIAN, N.; PONCHET, M.; POUPET, A.; DELON, R.; VARRIER, J.L.; ROBY, D.; RICCI, P. Pathogen-induced elicitor production in transgenic tobacco generates a hypersensitive response and nonspecific disease resistance. **Plant Cell**, v.11, p.223-235, 1999.

KNEEN, E.; SANDSTEDT, R.M. An amylase inhibitor from certain cereals. **Journal of the American Chemical Society**, v.68, p.1247-1252, 1943.

KNEEN, E.; SANDSTEDT, R.M. Distribution and general properties of an amylase inhibitor in cereal. **Archives of Biochemistry**, v.9, p.235-249, 1945.

KNOGEE, W. Fungal infection of plants. **The Plant Cell**, v.8, p.1711-1722, 1996.

KOTARU, M.; SAITO, K.; YOSHIKAWA, H.I.; IDEUCHI, T.; IBUKI, F. Purification and some properties of an alpha-amylase inhibitor from cranberry bean (*P. vulgaris*). **Agriculture Biology and Chemistry**, v.51, p.577-578, 1987.

KPODO, K.; THRANE, U.; HALD, B. *Fusaria* and fumonisins in maize from Ghana and their co-occurrence with aflatoxins. **International Journal of Food Microbiology**, v.61, p.147-157, 2000.

KUIPER-GOODMAN, T.; SCOTT, P.M.; WATANABE, H. Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. **Regional Toxicology and Pharmacology**, v.7, p.253-306, 1987.

KULIK, M.M.; JUSTICE, O.L. Some influences of storage fungi, temperature and relative humidity on the germinability of grain seeds. **Journal of Stored Products Research**, v. 3, p.335-343, 1967.

KULMACZ, R.J.; SCHOEPFER, Jr, G.J. Sphingolipid base metabolism. Concerning the origin of the oxygen atom at carbon atom 4 of phytosphingosine. **Journal of the American Chemical Society**, v.100, p.3963-3964, 1978.

LAJOLO, F.M.; FINARDI-FILHO, F. Partial characterization of the amylase inhibitor of black bean (*Phaseolus vulgaris*), variety Rico 23. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.33, p.132-138, 1985.

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

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

LOGRIECO, A.; MORETTI, A.; RITIENI, A.; BOTTALICO, A.; CORDA, P. Occurrence and toxigenicity of *Fusarium proliferatum* from preharvest maize ear rot, and associated mycotoxins, in Italy. **Plant Disease**, v.79, n.7, p.727-731, 1995.

MACDONALD, M.V.; CHAPMAN, R. The incidence of *Fusarium moniliforme* on maize from Central America, Africa and Asia during 1992-1995. **Plant Pathology**, v.46, p.112-125, 1997.

MAGNOLI, C.E.; SAENZ, M.A.; CHIACCHIERA, S.M.; DALCERO, A.M. Natural occurrence of *Fusarium* species and fumonisin-production by toxigenic strains isolated from poultry feeds in Argentina. **Mycopathologia**, v.145, p.35-41, 1999.

MAHONEY, W.C.; HERMODSON, M.A.; JONES, B.; POWERS, D.D.; CORFMAN, R.S.; REECK, G.R. Amino acid sequence and secondary structural analysis of the corn inhibitor of trypsin and activated Hageman Factor. **Journal of Biological Chemistry**, v.259, p.8412-8416, 1984.

MANGELSDORF, P.C. **Corn: Its Origin, Evolution, and Improvement**, Massachusetts: Harvard University Press, 1974. 262p.

MARASAS, W.F.O. Fumonisin: Their implications for human and animal health. **Natural Toxins**, v.3, p.193-198, 1995.

MARASAS, W.F.O.; KELLERMAN, T.S.; GELDERBLUM, W.C.A.; COETZER, J.A.W. THIEL, P.G.; Vand 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.

MARENTES, E.; GRIFFITH, M.; MYRNARZ, A.; BRUSH, R.A. Proteins accumulate in the apoplast of winter rye leaves during cold acclimation. **Physiologia Plantarum**, v.87, p.499-507, 1993.

MARIJANOVIC, D.R.; HOLT, P.; NORRED, W.P.; BACON, C.W.; VOSS, K.A.; STANCEL, P.C.; RAGLAND, W.L. Immunosuppressive effects of *Fusarium moniliforme* corn cultures in chickens. **Poultry Science**, v.70, p.1895-1901, 1991.

MARÍN, S.; SANCHIS, V.; MAGAN, N. Water activity, temperature, and pH effects on growth of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* isolates from maize. **Canadian Journal Microbiology**, v.41, p.1063-1070, 1995.

MARÍN, S.; SANCHIS, V.; RAMOS, A.J.; MAGAN, N. Effect of water activity on hydrolytic enzyme production by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* during colonization of maize. **International Journal of Food Microbiology**, v.42, p.185-194, 1998.

MARÍN, S.; SANCHIS, V.; TEIXIDO, A.; SAENZ, R.; RAMOS, A.J.; VINAS, I.; MAGAN, N. Water and temperature relations and microconidial germination of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* from maize. **Canadian Journal Microbiology**, v.42, p.1045-1050, 1996.

MARKWICK, N.P.; LAING, W.A.; CHRISTELLER, J.T.; REID, S.J.; NEWTON, M.R. Alpha-amylase activities in larval midgut extracts from four species of Lepidoptera (Tortricidae and Gelechiidae): response to pH and to inhibitors from wheat, barley, kidney bean, and *Streptomyces*. **Journal of Economy and Entomology**, v.89, n.1, p.39-45, 1996.

MARSH, S.F.; PAYNE, A. Pre-harvest infection of corn silk and kernels by *Aspergillus flavus*. **Phytopathology**, v.74, p.1284-1289, 1984.

MARSHALL, J.J.; LAUDA, C.M. Purification and properties of phaseolamin, an inhibitor of alpha-amylase, from the kidney bean, *Phaseolus vulgaris*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 250, n.20, p.8030-8037, 1975.

MEDINA-MARTÍNEZ, M.S.; MARTÍNEZ, A.J. Mold occurrence and aflatoxin B₁ and fumonisin B₁ determination in corn samples in Venezuela. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, p.2833-2836, 2000.

MILLER, J.D.; SAVARD, M.E.; SCHAAFSMA, A.W.; SEIFERT, K.A.; REID, L.M. Mycotoxin production by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* from Ontario and occurrence of fumonisin in the 1993 corn crop. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.17, p.233-239, 1995.

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

MORTON, R.L.; SCHROEDER, H.E.; BATEMAN, K.S.; CHRISPEELS, M.J.; ARMSTRONG, E. Bean α -amylase inhibitor 1 in transgenic peas (*Pisum sativum*) provides complete protection from pea weevil (*Bruchus pisorum*) under field conditions. **Proceeding of the National Academy Science of the United States of America**, v.97, n.8, p.3820-3825, 2000.

MOTELIN, G.; HASCHEK, W.M.; NESS, D.K.; HALL, W.F.; HARLIN, K.S.; SCHAEFFER, D.J.; BEASLEY, V.R. Temporal and dose-response features in swine fed corn screenings contaminated with fumonisin mycotoxins. **Mycopathologia**, v.126, p.27-40, 1994.

MUBATANHEMA, W.; MOSS, M.O.; FRANK, M.J.; WILSON, D.M. Prevalence of *Fusarium* species of the Liseola section on Zimbabwean corn and their ability to produce the mycotoxins zearalenone, moniliformin and fumonisin B₁. **Mycopathologia**, v.148, p.157-163, 1999.

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

MUNKVOLD, G.P.; McGEE, D.C.; CARLTON, W.M. Importance of different pathways for maize kernel infection by *Fusarium moniliforme*. **Phytopathology**, v.87, n.2, p.209-217, 1997.

MUNKVOLD, G.P.; MCKEAN, J. **Field survey for corn ear rots and mycotoxin in 1993**. In: Iowa State Univ. Vet. Med. Ext. Newsl. 402-V751. 1994. Pages 5901-5904

MURPHY, P.A.; RICE, L.G.; ROSS, P.F. Fumonisin B₁, B₂ and B₃ content of Iowa, Wisconsin, and Illinois corn and corn screenings. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.41, n.2, p.263-266, 1993.

MUSSER, S. M.; PLATTNER, R. D. Fumonisin composition in cultures of *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum* and *Fusarium nygamai*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.45, n.4, p.1169-1173, 1997.

NELSON, P.E.; DESJARDINS, A.E.; PLATTNER, R.D. Fumonisin, mycotoxins produced by *Fusarium* species: biology, chemistry and significance. **Annual Review of Phytopathology**, v.31, p.233-252, 1993.

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.

NICHOLSON, R.L.; HAMMERSCHMIDT, R. Phenolic compounds and their role in disease resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v.30, p.369-389, 1992.

NORRED, W.P.; VOSS, K.A. Toxicity and role of fumonisins in animal diseases and human esophageal cancer. **Journal of Food Protection**, v.57, p.522-527, 1994.

NURNBERGER, T.; NENNSTIEL, D.; JABS, T.; SACK, W.R.; HAHLBROCK, K.; SCHEEL, D. High affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes triggers multiple defense responses. **Cell**, v.78, p.449-460, 1994.

NURNBERGER, T.; SCHEEL, D. Signal transmission in the plant immune response. **Plant Science**, v.6, n.8, p.372-379, 2001.

O'DONNELL, M.D.; McGEENEY, K.F. Purification and properties of an α -amylase inhibitor from wheat. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.222, p.159-169, 1976.

OERKE, E.C.; DEHNE, H.W.; SCHONBECK, F.; WEBER, A. Crop production and crop protection: estimated losses in major food and cash crops. Amsterdam, Elsevier Science, 1994.

ONO, E.Y.S.; ONO, M.A.; FUNO, F.Y.; MEDINA, A.E.; OLIVEIRA, T.C.R.M.; KAWAMURA, O.; UENO, Y.; HIROOKA, E.Y. Evaluation of fumonisins-aflatoxins co-occurrence in Brazilian corn hybrids by ELISA. **Food Additives and Contaminants**, v.18, p.719-729, 2001.

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

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

OSBORNE, T.B. The vegetable Proteins. Longmans, Green & Co.: London. 1924. 154p.

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

PETTERSON, S.; HANSEN, M.W.; AXBERG, K.; HULT, K.; SCHNURER, J. Ochratoxin A accumulation in cultures of *Penicillium verrucosum* with the antagonistic yeast *Pichia anomala* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Mycological Research**, v.102, p.1003-1008, 1998.

PICK, K.H.; WOBER, G. Proteinaceous alpha-amylase inhibitor from beans. **Physiological Chemistry**, v.359, p.1371-1377, 1978.

PIMENTEL, D. Handbook of pest management in agriculture. Vol. 1, 2ed. Boca Raton, CRC Press, 1991.

PIÑEIRO, M.S.; SILVA, G.E.; SCOTT, P.M.; LAWRENCE, G.A.; STACK, M.E. Fumonisin levels in Uruguayan corn products. **Journal of AOAC International**, v.80, n.4, p.825-828, 1997.

PIPERNO, D.R. On maize and the sunflower. **Science**, v.292, p.2260-2261, 2001.

PIPERNO, D.R.; FLANNERY, K.V. The earliest archaeological maize (*Zea mays* L.) from highland Mexico: new accelerator mass spectrometry dates and their implications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.98, p.2101-2103, 2001.

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

PLATTNER, R.D.; BRANHAM, B.E. Labeled fumonisins: production and use of fumonisin B₁ containing stable isotopes. **Journal of AOAC International**, v.77, p.525-532, 1994.

POWERS, J.R.; CULBERTSON, J.D. In vitro effect of bean amylase inhibitor on insect amylases. **Journal of Food Protection**, v.45, p.655-657, 1982.

POWERS, J.R.; WHITAKER, J.R. Purification and some physical and chemical properties of red kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) α -amylase inhibitor. **Journal of Food Biochemistry**, v.1, p.217-238, 1977.

PRATHAPKUMAR, S.H.; RAO, V.S.; PARAMKISHAN, R.J.; BHAT, R.V. Disease outbreak in laying hens arising from the consumption of fumonisin-contaminated food. **British Poultry Science**, v.38, p.475-479, 1997.

PRITSCH, C.; VANCE, C.P.; BUSHNELL, W.R.; SOMERS, D.A.; HOHN, T.M.; MUEHLBAUER, G.J. Systemic expression of defense response genes in wheat spikes as a response to *Fusarium graminearum* infection. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.58, p.1-12, 2001.

REINBOTHE, S.; MOLLENHAVER, B.; REINBOTHE, C. JIPs and RIPs: the regulation of the plant gene expression by jasmonates in response to environmental cues and pathogens. **Plant Cell**, v.6, p.1199-1209, 1994.

RHEEDER, J.P.; MARASAS, W.F.O.; THIEL, P.G.; SYDENHAM, E.W.; SHEPHARD, G.S.; van SCHALKWYCK, D.J. *Fusarium moniliforme* and fumonisins in corn in relation to human esophageal cancer in Transkei. **Phytopathology**, v.82, p.353-357, 1992.

RICHARDSON, M. **Seed storage proteins – the enzyme inhibitors**. In: Methods in Plant Biochemistry. L. ROGERS (ed). Academic Press, New York. 1991. Chapter 10.

RILEY, R.T.; AN, N-H.; SHOWKER, J.L.; YOO, H-S.; NORRED, W.P.; CHAMBERLAIN, W.J.; WANG, E.; MERRIL, A.H.; MOTELIN, G.; BEASLEY, V.R.; HASCHEK, V.M. Alteration of tissue and serum sphinganine to sphingosine ratio: an early biomarker of exposure to fumonisin-containing feeds in pigs. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.118, p.105-112, 1993.

RILEY, R.T.; VOSS, K.A.; YOOL, H.S.; GELDERBLUM, W.C.A.; MERRILL, JR. A.H. Mechanism of fumonisin toxicity and carcinogenesis. **Journal of Food Protection**, v.57, n.6, p.528-535, 1994.

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

ROGERS, L.M.; FLAISHMAN, M.A.; KOLATTUKUDY, P.E. Cutinase gene disruption in *Fusarium solani* spp pisi decrease its virulence on pea. **Plant Cell**, v.6, p.935-945, 1994.

- ROSS, P.F. What are we going to do with this dead horse? **Journal of the Association of Official Analytical Chemistry International**, v.77, p.491-494, 1994.
- ROSS, P.F.; RICE, L.G.; PLATTNER, R.D.; OSWEILER, 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. **Mycopathologia**, v.114, p.129-135, 1991.
- RYALS, J.A.; NEUENSCHWANDER, R.H.; WILLITS, M.G.; MOLINA, A.; STEINER, H.Y.; HUNT, M.D. Systemic acquired resistance. **Plant Cell**, v.8, p.1809-1819, 1996.
- RYAN, C.A. The search for the proteinase inhibitors-inducing factor PIIF. **Plant Molecular Biology**, v.19, p.123-133, 1992.
- RYAN, C.A. The systemin pathway: differential activation of plant defensive genes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1477, p.112-121, 2000.
- RYAN, C.A.; JAGENDORF, A. Self defense by plants. **Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America**, v.92, p.4075, 1995.
- SABINO, M.; PRADO, G.; INOMATA, E.I.; PEDROSO, M.O.; GARCIA, R.V. Natural occurrence of aflatoxin and zearalenone in maize in Brazil. Part II. **Food Additives and Contaminants**, v.6, p.327-331, 1989.
- SALA, N.; SANCHIS, V.; VILARO, P.; VILADRICH, R.; TORRES, M.; VIÑAS, I.; CANELA, R. Fumonisin producing capacity of *Fusarium* strains isolated from cereals in Spain. **Journal of Food Protection**, v.57, n.10, p.915-917, 1994.
- SALMOND, P.C. Secretion of extracellular virulence factors by plant pathogenic bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v.32, p.181-200, 1994.
- SAMSON, R.A.; HOESKSTRA, E.S.; FRISVALD, J.C. et al. **Introduction to food-borne fungi**. 4.ed. The Netherlands, Centraalbureau voor Schimmelcultures, 1995.
- SAS Institute. 1988. SAS user's guide. Statistics. SAS Inst., Cary, NC.
- SAUNDERS, R.M.; LANG, J.A. Alpha-amylase inhibitors in *Triticum aestivum*: purification and physical-chemical properties. **Phytochemistry**, v.12, p.1237-1241, 1973.
- SCHAFER, W. Molecular mechanisms of fungal pathogenicity to plants. **Annual Review of Phytopathology**, v.32, p.461-477, 1994.
- SCHAGGER, H.; von JAGOW, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Analytical Biochemistry**, v.166, p.368-379, 1987.
- SCOTT, G.E.; ZUMMO, N. Kernel infection and aflatoxin production in maize by *Aspergillus flavus* relative to inoculation and harvest dates. **Plant Disease**, v.78, p.123-125, 1994.

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

SCOTT, P.M. Mycotoxins transmitted into beer from contaminated grains during brewing. **Journal of AOAC International**, v.79, n.4, p.875-882, 1996.

SCOTT, P.M.; LAWRENCE, G.A. Analysis of beer for fumonisins. **Journal of Food Protection**, v.58, n.12, p.1379-1382, 1995.

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

SERNA-SALDIVAR, S.O.; ROONEY, L.W.; GREENE, L.W. Effect of lime treatment on the availability of calcium in diets of tortillas and beans: rat growth and balance studies. **Cereal Chemistry**, v.68, p.565-570, 1991.

SHAINKIN, R.; BIRK, Y. Alpha-amylase inhibitors from wheat: isolation and characterization. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.221, p.502-513, 1970.

SHELDON, J.L. A corn mold. In Annu. Rep. Agric. Exp. Stn. Nebr., 17th, p.23-32, 1904.

SHEPHARD, G.S.; MARASAS, W.F.O.; LEGGOTT, N.L.; YAZDANPANA, H.; RAHIMI, H.; SAFAVI, N. Natural occurrence of fumonisins in corn from Iran. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, p.1860-1864, 2000.

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

SHEPHARD, G.S.; THIEL, P.G.; STOCKENSTROM, S.; SYDENHAM, E.W. Worldwide survey of fumonisin contamination of corn and corn-based products. **Journal of AOAC International**, v.79, n.3, p.671-687, 1996.

SHETTY, P.H.; BHAT, R.V. Natural occurrence of fumonisin B₁ and its co-occurrence with aflatoxin B₁ in Indian sorghum, maize, and poultry feeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.45, p.2170-2173, 1997.

SHOWALTER, A.M. Structure and function of plant cell wall proteins. **Plant Cell**, v.5, p.9-23, 1993.

SIAME, B.A.; MPUCHANE, S.F.; GASHE, B.A.; ALLOTEY, J.; TEFFERA, G. Occurrence of aflatoxins, fumonisin B₁, and zearalenone in foods and feeds in Botswana. **Journal of Food Protection**, v.61, n.12, p.1670-1673, 1998.

SILANO, V.; FURIA, M.; GIANFREDA, L.; MACRI, A.; PALESCANDOLO, R.; RAB, A.; SCARDI, V.; STELLA, E.; VALFRE, F. Inhibition of amylase from different origins by albumins from the wheat kernel. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.391, p.170-178, 1975.

SILANO, V.; POCCHIARI, F.; KASARDA, D.D. Physical characterization of alpha-amylase inhibitors from wheat. **Biochimica et Biophysical Acta**, v.317, p.139-148, 1973.

SILVA, C.P.; TERRA, W.R.; SÁ, M.F.G.; SAMUELS, R.I.; ISEJIMA, E.M.; BIFANO, T.D.; ALMEIDA, J.S. Induction of digestive α -amylase in larvae of *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) in response to ingestion of common bean α -amylase inhibitor 1. **Journal of Insect Physiology**, v.47, p.1283-1290, 2001.

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 Governmental, Hellerup, Denmark, 1991.

SMITH, B.D. Documenting plant domestication: the consilience of biological and archaeological approaches. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.98, n.4, p.1324-1326, 2001.

SMITH, P.K.; KROHN, R.I.; HERMANSON, G.T.; MALLIA, A.K.; GARTNER, F.H.; PROVENZANO, M.D.; FUJIMOTO, E.K.; GOEKE, N.M.; OLSON, B.J.; KLENK, D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, v.150, p.76-85, 1985.

STACK, M.E.; EPPLEY, R.M. Liquid chromatographic determination of fumonisins B₁ and B₂ in corn and corn-based products. **Journal of AOAC International**, v.75, p.834-837, 1992.

STINTZI, A.; HEITZ, T.; PRASAD, V.; WIEDEMANN-MERDINOGLUS, S.; KAUFFMANN, S.; GEOFFROY, P.; LEGRAND, M.; FRITIG, B. Plant pathogenesis-related proteins and their role in defense against pathogens. **Biochimie**, v.75, p.687-706, 1993.

SYDENHAM, E.W.; SHEPHARD, G.S. Chromatographic and allied methods of analysis for selected mycotoxins. In: GILBERT, J. **Progress in food contaminant analysis**. London, Backie Academic & Professional, 1996, p.65-146.

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

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

SZABÓ, V.M.; BURR, B. Simple inheritance of key traits distinguishing maize and teosinte. **Molecular and General Genetics**, v.252, p.33-41, 1996.

THANHAUSER, T.W.; KONISHI, Y.; SCHERAGA, H.A. Analysis for disulfite bonds in peptides and proteins. **Methods in Enzymology**, v.143, p.115-119, 1987.

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

TOLLESON, W.H.; COUCH, L.H.; MELCHIOR, W.B.; JENKINS, G.R.; MUSKHELISHVILI, M.; MUSKHELISHVILI, L.; MCGARRITY, L.J.; DOMON, O.; MORRIS, S.M.; HORWARD, P.C. Fumonisin B₁ induces apoptosis in cultured human keratinocytes through sphinganine accumulation and ceramide depletion. **International Journal of Oncology**, v.14, n.5, p.833-843, 1999.

TSENG, T.C.; LIU, C.Y. Natural occurrence of fumonisins B₁ and B₂ in domestic maize of Taiwan. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.47, p.4799-4801, 1999.

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

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

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

Van der HOORN, R.A.L.; de WIT, P.J.G.M.; JOOSTEN, M.H.A.J. Balancing selection favors guaring resistance proteins. **Plant Science**, v.7, n.2, p.67-71, 2002.

VIGERS, J.A.; WIEDEMANN, S.; ROBERTS, W.K.; LEGRAND, M.; SELITRENNIKOFF, C.P. FRITIG, B. Thaumatin-like pathogenesis-related proteins are antifungal. **Plant Science**, v.83, p.155-161, 1992.

VISCONTI, A.; DOKO, M.B. Survey of fumonisin production by *Fusarium* isolated from cereals in Europe. **Journal of AOAC International**, v.77, n.2, p.546-550, 1994.

VOSS, K.A.; RILEY, R.T.; NORRED, W.P.; BACON, C.W.; MEREDITH, F.I.; HOWARD, P.C.; PLATTNER, R.D.; COLLINS, T.F.X.; HANSEN, D.K.; PORTER, J.K. An overview of rodent toxicities: liver and kidney effects of fumonisins and *Fusarium moniliforme*. **Environmental Health Perspectives**, v.109, supplement 2, p.259-266, 2001a.

VOSS, K.A.; STEPHEN, P.M.; MEREDITH, F.I.; BACON, C.W.; SAUNDERS, D.S. Fate of fumonisins during the production of fried tortilla chips. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p.3120-3126, 2001b.

WALTON, J.D. Decostructing the cell wall. **Plant Physiology**, v.104, p.1113-1118, 1994.

WANG, J.S.; HUANG, T.; SU, J.; LIANG, F.; WEI, Z.; LIANG, Y.; LUO, H.; KUANG, S.Y.; QIAN, G.S.; SUN, G.; HE, X.; KENSLER, T.W.; GROOPMAN, J.D. Hepatocellular carcinoma and aflatoxin exposure in Zhyqing Village, Fusui County, People's Republic of China. **Cancer Epidemiology Biomarkers**, v.10, p.143-146, 2001.

WANG, R.L.; STEC, A.; HEY, J.; LUKENS, L.; DOEBLEY, J. The limits of selection during maize domestication. **Nature**, v.398, p.236-239, 1999.

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

WANG, J.S.; HUANG, T.; SU, J.; LIANG, F.; WEI, Z.; LIANG, Y.; LUO, H.; KUANG, S.Y.; QIAN, G.S.; SUN, G.; HE, X.; KENSLER, T.W.; GROOPMAN, J.D. Hepatocellular carcinoma and aflatoxin exposure in Zhyqing Village, Fusui County, People's Republic of China. **Cancer Epidemiology and Biomarkers**, v.10, p.143-146, 2001.

WARCHALEWSKI, J.R. Chemie, biochemie, mikrobiologie, technologie, ernahrung. **Nahrung**, v.27, p.103-117, 1983.

WARD, E.R.; UKNES, S.J.; WILLIAMS, S.C.; DINCHER, S.S.; WIEDERHOLD, D.L.; ALEXANDER, D.C.; AHL-GOY, P.; MÉTRAUX, J.; RYALS, J.A. Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. **Plant Cell**, v.3, p.1085-1094, 1991.

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, p.2853-2856, 1999.

WATSON, S.A.; RAMSTAD, P.E. (eds.). **Corn: Chemistry and Technology**. American Association of Cereal Chemist, St. Paul, MN. 1987.

WEIBKING, T.S.; LEDOUX, D.R.; BERMUDEZ, A.J.; TURK, J.R.; ROTTINGHAUS, G.E.; WANG, E.; MERRILL, JR. A.H. Effects of feeding *Fusarium moniliforme* culture material, containing known levels of fumonisin B₁, on the young broiler chick. **Poultry Science**, v.72, n.3, p.456-465, 1993.

WHITAKER, J.R. Alpha-amylase inhibitors of higher plants and microorganism. In KINSELA, J.E. & SOCIE, W.G., **Food Proteins**, p.354-380, 1989.

WILCOX, E.; WHITAKER, J.R. Some aspects of the mechanism of complexation of red kidney bean alpha-amylase inhibitor and alpha-amylase. **Biochemistry**, v.23, p.1783-1791, 1984.

WILSON, J.J.; INGLEDEW, W.M. Isolation and characterization of *Schwanniomyces alluvius* amylolytic enzymes. **Applied and Environmental Microbiology**, v.44, n.2, p.301-307, 1982.

WONG, J.J.; HSIEH, D.P.H. Mutagenicity of aflatoxins related to their metabolism and carcinogenic potential. Proceeding of National Academy of Science of the United States of America, v.73, p.2241, 1976.

XAVIER-FILHO, J.; CAMPOS, F.A.P.; ARY, M.B.; SILVA, C.P.; CARVALHO, M.M.M.; MACEDO, M.L.R.; LEMOS, F.J.A.; GRANT, G. Poor correlation between the levels of proteinase inhibitors found in seeds of different cultivars of cowpea (*Vigna unguiculata*) and the resistance/susceptibility to predation by *Callosobruchus maculatus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.27, p.1139-1143, 1989.

YALPANI, N.; SHULAEV, V.; RASKIN, I. Endogenous salicylic acid levels correlate with accumulation of pathogenesis-related proteins and virus resistance in tobacco. **Phytopathology**, v.83, p.702-708, 1993.

YANG, Y.; SHAH, J.; KLESSIG, D.F. Signal perception and transduction in plant defense response. **Genes Development**, v.11, p.1621-1639, 1997.

YETTER, M.A.; SAUNDERS, R.M.; BOLES, H.P. Alpha-amylase inhibitors from wheat kernels as factors in resistance to postharvest insects. **Cereal Chemistry**, v.56, n.4, p.243-244, 1979.

YIN, X.; HO, F.M.; FILHO, F.F.; LAJOLO, F.M.; WHITAKER, J.R. Structural and mechanistic aspects of common bean (*Phaseolus vulgaris*) alpha-amylase inhibitors. **1st Brazilian Congress of Proteins, Published, UNICAMP Press, Campinas**, p.99-109, March 4-9, 1991.

ANEXOS

**TRABALHO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO NA
REVISTA *PLANT DISEASE* EM 26/08/02**

Amylase Inhibitor Present in Corn Seeds Active *in vitro* Against Amylase from *Fusarium verticillioides*

Edson L. Z. Figueira¹, Alejandro Blanco-Labra^{2*}, Antônio Carlos Gerage³, Elisabete Y. S. Ono¹, Elizabeth Mendiola-Olaya², Yoshio Ueno⁴, and Elisa Y. Hirooka¹

¹Universidade Estadual de Londrina. Campus Universitário. Caixa Postal 6001
CEP 86051-990, Londrina-PR, Brazil, e-mail: hirooka@uel.br

²Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Unidad Irapuato.
Apdo. Postal 629, 36500 Irapuato-Gto, Mexico, e-mail: ablanco@ira.cinvestav.mx

³Instituto Agronômico do Paraná. Caixa Postal 481 – CEP 86001-970, Londrina-PR, Brazil.

⁴Yashio Institute of Environmental Sciences, Usui Bldg. 2F, 8-10 Nishi-Gokencho, Shinjuku-ku, Tokio 162-0812, Japan.

*Corresponding author.

ABSTRACT

Figueira, E. L. Z., Blanco-Labra, A., Carlos Gerage, A., Ono, E. Y. S., Mendiola-Olaya, E., Ueno, Y., and Hirooka, E. Y. 200_. New amylase inhibitor present in corn seeds active *in vitro* against amylase from *Fusarium verticillioides*. Plant Dis. 8_:

A screening for specific amylase inhibitor levels against amylase from *Fusarium verticillioides* (*Fusarium moniliforme*), the most relevant mycotoxigenic fungus in corn, was conducted on 37 corn hybrids. The amylase inhibitor levels in these hybrids ranged from 5.5 to 16.0 amylase inhibitor units (AIU/g) per gram of corn in the MASTER and AG5011 hybrids, respectively. The hybrid with the maximum content of inhibitor was used as the

source of this new protein. The inhibitor was partially purified using fractional precipitation, gel filtration on Sephadex G-75 column, HPLC Superose HR 10/30 column, and HPLC anion exchange chromatography, obtaining a 20.7-fold purification. Electrophoresis after denaturing and heating under reductive conditions showed an apparent 23.8 kDa molecular weight and an acidic isoelectric point of 5.4, which differs from previous molecular weights reported for other inhibitors present in corn seeds (14 and 22 kDa). This inhibitor showed activity against amylases from human saliva and pancreas, from the fungi *F. verticillioides* and *A. flavus*, and from the insects *A. obtectus*, *Z. subfasciatus*, *T. castaneum*, and *S. cerealela*. The mycoflora found in the corn grain indicated *Fusarium* sp. as the most prevalent fungi (81.1% of the samples) with a count ranging from 1.5×10^2 to 2.4×10^6 CFU/g of corn. The presence of fumonisins was detected in 21 out of the 37 hybrids studied, ranging from 0.05 to 2.67 μg of FB/g of corn. No correlation could be established between this amylase inhibitor level in the corn seeds and the presence of *Fusarium* sp. or with the fumonisin content under the experimental conditions of the test.

Keywords: amylase inhibitor, *Fusarium verticillioides*, corn fungal resistance

Corn (*Zea mays* L.) is an important staple food in different regions of the world. Its economic importance is also relevant for its use as feed, mainly in the economically developed countries (23). However, its nutritional characteristics also expose it to the constant attack of fungi and insect predators (40).

Fusarium verticillioides, *F. proliferatum*, *F. oxysporum*, *F. graminearum*, *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *Cladosporium* sp. and *Penicillium* sp. are the most common seedborne corn mycoflora, with *F. verticillioides* being the most frequent fungus present in corn kernels (14,20,22). A major problem related to fungal attack in corn is the production of toxic secondary metabolites, particularly fumonisin, zearalenone and aflatoxin, produced by *F. verticillioides*, *F. graminearum* and *A. flavus*, respectively (33,34). Zearalenone is an estrogenic compound that produces infertility and other reproductive problems in swine (21). Aflatoxin has powerful teratogenic, mutagenic and hepatocarcinogenic effects (39,42), while fumonisins are reported to have cancer-promoting activity, in addition to causing several diseases in animals (5,26). The co-occurrence of fumonisin with aflatoxin B₁ (AFB₁) is presumed to play an important role in the promotion of carcinogenesis (37). Both fungal and mycotoxin contamination are currently regarded as the primary concern in the effort to reduce problems in the global trading of agricultural commodities.

Increasing natural defense in plants can improve agricultural productivity and food safety by reducing the intensive use of pesticides, as well as the potential for mycotoxin contamination in the commodities (7,12,16). Special attention has been given to enzymatic inhibitors, with emphasis on α -amylase inhibitor (AI), whose study in corn started in the 1980 when a proteinaceous AI active against insect α -amylases was described (1). Blanco-Labra et al. (2) characterized a bifunctional protein with molecular weight of 12 kDa, which inhibited insect α -amylase from *Tribolium castaneum* and *Callosobruchus maculatus* as well as the bovine and fungal proteases from *A. niger* and *A. fumigatus*. Chen et al. (7) reported the presence of a trypsin inhibitor in corn that was active on α -amylase synthesis in *A. flavus* as well as on its enzymatic activity, affecting also its fungal growth. These results demonstrated the promising potential of natural defense mechanisms for practical use. The importance of corn in the food chain, associated with the risk of serious mycotoxin hazards, has pointed out the relevance of producing new hybrids with particular resistance for the control of this fungi (11,12).

Previous reports have shown the presence of AFB₁ in 12.3% of the corn samples taken from several Brazilian States (29). A high occurrence of *F. verticillioides* associated with natural fumonisin contamination has also been found in corn in the State of Paraná, which produces 25% of the corn crop in Brazil (27).

The aim of this work was to evaluate the level of AI in corn, found to be active *in vitro* against *F. verticillioides* amylase, and to study its possible relation with fungi and fumonisin contamination in corn kernels of 37 hybrids belonging to the 1997 interseasonal crop. The isolation and partial characterization of the AI extracted from the hybrid with the highest AI activity against *F. verticillioides* is also presented.

MATERIALS AND METHODS

Corn hybrids. The 37 freshly harvested corn hybrids from the 1997 interseasonal crop (planting in March, harvesting in September) were screened for AI, fumonisin and fungal contamination. These hybrids were cultivated at the experimental station of the Agronomy Institute of Paraná (IAPAR), Brazil, located in the Northern region of the State of Paraná, Brazil (23°19'00"S; 51°22'00"W-GR, altitude 576 m). The corn kernels were left to dry at field temperature to 14% moisture content and stored at -20°C.

Amylase source. Amylase from the mycotoxigenic fungi was isolated from *F. verticillioides* (*F. moniliforme* strain 113F) cultures and *A. flavus* randomly isolated from feeds involved in animal intoxications. The strains were maintained on potato dextrose agar (PDA) at 4°C. Crude amylase was obtained by growing the fungi in corn medium as described by Figueira et al. (10). The fungus was inoculated into 480 ml of corn medium, consisting of 2% ground corn in the supernatant of milky stage corn and incubated for 20 days at 25°C. The culture medium was centrifuged at 5,000 x g for 10 min at 4°C, using the supernatant as source of amylase.

Human salivary α -amylase and pancreatic α -amylase were obtained from Amersham Pharmacia Biotech, and barley β -amylase, were obtained from Sigma Chemical Co. Amylases from different insects were obtained according Blanco-Labra et al. (2). Insects were provided by the insectary at Cinvestav-Irapuato Unit. Insect cultures of *Prostephanus truncatus*, *Sitotroga cerealela* and *Sitophilus zeamais* were maintained on whole maize seeds, while *Tribolium castaneum* was grown on maize flour. *Zabrotes subfasciatus* and *Acanthoscelides obtectus* cultures were grown on whole navy bean. All cultures were maintained in a growth chamber at 28°C with a relative humidity of 65-75%. For amylases extraction, the acetone-defatted larvae of the corresponding insects were homogenized with different buffer solutions in a 1:5 (wt/vol) ratio. The *P. truncatus* amylase was extracted with a 0.1 M NaCl in 0.04 M succinic acid, pH 6.5, solution. The amylases from *S. zeamais*, *T. castaneum*, *Z. subfasciatus*, *S. cerealela* and *A. obtectus* were extracted with 0.2 M succinic acid buffer, pH 4.5. The suspensions were centrifuged at 10,000 x g for 10 min at 4°C, and the supernatants were used as source of amylase.

Amylase from corn was extracted with 0.01 M CaCl₂ – 0.1 M NaCl solutions, from 5-day old germinated seeds.

Microbiological analysis. One kg of corn kernels was homogenized and a representative sample was finely ground. Ten grams were blended with 90 ml of sterile 0.1% peptone water (wt/vol) and serial dilutions up to 10⁻⁶ were carried out. One ml of each dilution was inoculated in PDA, pH 4.0, supplemented with 50 µg/ml chloramphenicol. After 6 days

incubation at 25°C, the total fungal count, *Fusarium* sp. like colonies and other fungi were visually determined (colony-forming units – CFU/g) according to Samson et al. (30).

Fumonisin determination. Fumonisin B₁ (FB₁) and B₂ (FB₂) were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC) according to the method of Shephard et al. (35), as modified by Ueno et al. (38). Corn seeds (10 g), ground to pass a 50 mesh size, were mixed with 30 ml methanol-water (3:1 vol/vol). The suspension was shaken at 150 rpm for 30 min and centrifuged at 4,500 x *g* for 10 min. The crude extract was cleaned with a Sep Pak accell plus QMA cartridge (Waters Co., Ltd.) and the fumonisins were eluted with 10 ml of methanol containing 0.5% acetic acid. The eluate was evaporated to dryness under a nitrogen stream at 40°C, and the residue was dissolved in methanol-water (3:1 vol/vol) and derivatized with *o*-phthaldialdehyde. The fumonisins were analyzed with a reverse-phase isocratic HPLC system, using a Shim-pack CLC-ODS (M) column (4.6 x 250 mm, Shimadzu, Tokyo-Japan). Excitation and emission wavelengths were 335 nm and 450 nm, respectively. The eluent was CH₃OH:0.1 M NaH₂PO₄ (80:20 vol/vol) adjusted to pH 3.3 with ortho-phosphoric acid. The flow rate was 1 ml/min. The lowest detection limits for FB₁ and FB₂ were 50 ng/g and 80 ng/g, respectively. Total fumonisin content was calculated as the sum of FB₁ and FB₂.

Corn amylase inhibitor extraction procedure. Finely ground corn seeds (48 mesh in a Janke & Kunkel model A10 mill) were 4-times defatted by shaking with acetone (1:1 vol/vol) for 15 min and decanting. The defatted flour was dried at room temperature and stored at -20°C. This corn flour (20 g) was mixed with 100 ml of 0.1 M acetate buffer, pH 6.0, and continuously stirred for 90 min at 4°C. The soluble proteins were obtained by centrifuging at 30,000 x *g* for 20 min at 4°C and precipitating them by adding ammonium sulfate to reach 60% saturation. After standing for 12 h at 4°C, the precipitate was recovered by centrifuging at 30,000 x *g* for 20 min at 4°C. The pellet was dissolved in 6 ml of 0.05 M KH₂PO₄-NaOH buffer, pH 6.7, and dialyzed extensively against the same buffer. The sample was centrifuged at 15,000 x *g* for 15 min at 4°C and the supernatant stored at -20°C.

Amylase and amylase inhibitor activity. Amylase inhibitor screening in the 37 corn hybrids: amylase activity was analyzed by the iodometric method (41). One unit of amylase (AU) activity was defined as the amount of enzyme that hydrolyzed 0.1 mg of starch in 10 min at 40°C, when 5.0 mg of starch was present.

The AI activity of each hybrid was analyzed by pre-incubating 0.25 ml of fungal amylase after appropriate dilution (corresponding to 15 AU) with 0.25 ml of corn extract, also after appropriate dilution, to obtain a 50% reduction of the original amylase activity. The AI from each hybrid was then incubated for 30 min at 40°C and the residual amylase activity determined. One unit of AI activity (AIU) was defined as the amount of protein that inhibited 1 AU of fungal amylase under the assay conditions described, and expressed as AIU/g of corn on dry weight basis (dwb).

Amylase inhibitor purification and characterization: Amylase activity was analyzed by the iodometric method (41) modified as for microplate determination, where the AI activity was analyzed by pre-incubating the AI with fungal amylase (corresponding 0.2 AU) in a final volume of 70 µl, to obtain 50% reduction of the original amylase activity. Each AI was then incubated for 10 min at 25°C, and the residual amylase activity determined. One unit of AI activity (AIU) was defined as the amount of protein that inhibited 1 AU of fungal amylase under the assay conditions described.

One unit of amylase (AU) activity was defined as the amount of enzyme that hydrolyzed 0.1 mg of starch in 60 min at 25°C, when 0.038 mg of starch was present.

Amylase inhibitor extraction and partial purification. Corn hybrid AG5011 was selected as the source of AI, based on its high inhibitory activity on *F. verticillioides* amylase. Defatted corn flour (100 g) was extracted with 500 ml of 0.1 M acetate buffer, pH 6.0 (12 h at 4°C). The soluble proteins were obtained after centrifuging at 30,000 x g for 20 min at 4°C and submitted to fractionated precipitation with ammonium sulfate (30-60% saturation). The precipitate (P₃₀₋₆₀) was recovered by centrifuging at 30,000 x g for 20 min at 4°C and dissolving the pellet in 0.01 M Tris-HCl buffer, pH 8.0, then concentrated using an ultrafiltration cell with a 30 kDa molecular weight exclusion membrane.

The concentrated sample was fractionated on a Sephadex G-75 gel filtration column (166 x 1.6 cm), equilibrated with 0.01 M ammonium bicarbonate buffer, pH 8.2, and the elution was carried out at a flow rate of 15 ml/h, collecting 7 ml fraction. Protein content was monitored at 280 nm. The active fractions (against *F. verticillioides* amylase) were pooled and dried. The pellet was solubilized in 0.01 M Tris-HCl buffer, pH 7.5 and fractionated in a HPLC system fitted with a Superose 12 HR 10/30 (Pharmacia Fine Chemicals) equilibrated with the same buffer. The elution was carried out at a flow rate of 0.4 ml/min and the active peak was collected and concentrated by ultrafiltration cell using a 10 kDa molecular weight exclusion membrane. This solution was used for the inhibitor characterization. The active sample was applied into a HPLC system fitted with an anionic exchange column Vydac 300 VHP 575 (0.75 cm i.d. x 5.0 cm) equilibrated with 0.01 M Tris-HCl, pH 7.5. Separation was performed using a linear NaCl gradient in the same buffer (0 to 0.5 M NaCl in 120 min). The separation was monitored by U.V. absorbance at 220 nm. The active peak was collected and stored at -20°C. This fraction was used to determine the isoelectric point and the apparent molecular weight. Total soluble protein recuperation in each purification step was determined by the Bradford (4) method.

Pre-incubating time effect. Constant amounts (1.54 µg) of AI were pre-incubated with 0.05 M KH₂PO₄-NaOH buffer (pH 6.7) for 0, 5, 10, 20 and 30 min, with constant amounts of amylase from *F. verticillioides*, prior to the addition of the substrate, and the remaining amylase activity determined.

Thermal stability. Constant amounts (1.54 µg) of AI were pre-incubated with 0.05 M KH₂PO₄-NaOH buffer (pH 6.7) for 30 min at 25, 40, 70 and 94°C, then they were immediately cooled and pre-incubated for 10 min with amylase from *F. verticillioides* at 25°C, and the remaining amylase activity determined.

pH effect. To determine the pH effect on the activity of *F. verticillioides* amylase, AI (1.54 µg) activity was measured at different pHs (4.0-5.0-6.0-7.0-8.0-9.0) using the following 0.05 M buffers: sodium acetate pH 4.0 and 5.0; sodium phosphate pH 6.0 and 7.0; and Tris-HCl pH 8.0 and 9.0. The AI and the enzyme were kept constant (0.2 AU). The AI together with the amylase were pre-incubated at each one of these pHs for 10 min at 25°C, and the remaining amylase activity was determined at the corresponding pH.

Molecular weight determination. The apparent molecular weight of the purified AI was measured by SDS-PAGE, according to Schagger & Von Jagow (32), using 4% acrylamide for the stacking gel and 13% (wt/vol) for the separating gel. The gels were silver-stained using the method of Blomm et al. (3), and the molecular weight was determined using the software

Quantity One 4.2.1 (Bio Rad).

Zymogram was performed under the same electrophoretic conditions. Activity was detected after washing the gel with 0.05 M KH_2PO_4 -NaOH buffer, pH 6.7, containing 2.5% Triton X-100 for 30 min at room temperature. Then the gel was immersed in a solution prepared with crude *F. verticillioides* amylase in a 0.05 M KH_2PO_4 -NaOH buffer, pH 6.7 (620 AU) and allowed to react for 120 min at room temperature. The gel was washed and incubated 150 min in a 0.5% starch-agarose gel. The AI activity band was stained after immersing the starch-agarose gel into a 0.5% I_2 , 5% KI solution. The presence of the AI showed as a colored band.

Isoelectric focusing determination. The isoelectric point (pI) of the purified AI was determined using a Phast-System instrument (Pharmacia), operating with Phast Media IEF 3-9, which allows separation at a pH range extending from 3 to 9. The samples were run as described by the manufacturer (Separation Technique File No. 100). The bands were visualized by silver nitrate staining after IEF, and the pI was determined using the software Quantity One 4.2.1 (Bio Rad).

Specificity. The specificity of AI was evaluated against amylase from different sources. *F. verticillioides*, *A. flavus*, human salivary and pancreatic α -amylase; from germinating seeds of corn, barley β -amylase, and from the insects *S. zeamais*, *T. castaneum*, *Z. subfasciatus*, *A. obtectus*, *P. truncatus* and *S. cerealela*. AI (1.54 μg), with the corresponding amylase, were pre-incubated for 30 min at room temperature in 0.05 M sodium phosphate buffer, pH 7.0 for human saliva, pancreatic α -amylase, and *F. verticillioides* amylase, or 0.05 M sodium phosphate buffer, pH 6.0 for *A. flavus*, *A. obtectus*, *Z. subfasciatus* and *T. castaneum* amylase, or 0.05 M sodium acetate buffer, pH 5.0 for corn amylase, barley β -amylase, *S. cerealela*, *S. zeamais* and *P. truncatus* amylase, and the remaining amylase activity determined.

Moisture content. Ten grams of defatted corn flour were dried at 105°C until constant weight in an infrared analyzer (OHAUS^R, model MB2000). The moisture content, expressed in percentage, was used to calculate the level of AI on dry weight basis.

Statistical analysis. AI content in the hybrids was analyzed and compared using a SAS version 6.12 (31). The Tukey's multiple comparison test was applied whenever the significance difference was $P < 0.05$. The correlation among AI, *Fusarium* sp. and fumonisin level, was also determined.

RESULTS

AI activity against *F. verticillioides* amylase was monitored in all 37 hybrid samples (Table 1). Analysis showed a significant difference in AI content ($P < 0.05$) among the hybrids tested. The AI level ranged from 5.5 to 16.0 AIU/g of corn, with minimal and maximal value being observed for the MASTER and AG5011 hybrids, respectively, with a variation coefficient of 6.5% and a minimal significant difference of 1.2 (Table 1).

The hybrid AG5011, which showed the highest level of AI, was selected as source of AI. Table 2 summarizes the results of the partial isolation procedure. After ammonium sulfate precipitation (30-60% saturation) and ultrafiltration the fraction obtained was submitted to gel filtration on a Sephadex G-75 column chromatography. The active fractions were pooled and dried (Fig. 1A), resulting in a 1.9-fold increase in specific activity (Table 2). After Superose 12 HR 10/30 chromatography on HPLC the specific activity

increase 6.9-fold and the active peak (Fig. 1B) was concentrated and then applied in an anionic exchange column Vydac 300 VHP 575, resulting in an additional 20.7-fold increase in specific activity (Table 2). The active peak (Fig. 1C) was used to determine the apparent molecular weight and the isoelectric point.

The relative molecular weight determined by Superose 12 HR 10/30 chromatography was 80 kDa (data not shown). However, when this apparent molecular weight was determined by SDS-PAGE under reductive conditions and after heating the sample at 40°C during 30 min, or at 94°C for 4 min, an apparent molecular weight of 23.8 kDa was found (Fig. 2A), and this was confirmed by its zymogram (Fig. 2C). The pI, determined by Phast System (Pharmacia), showed an acid protein with a pI of 5.4 (Fig. 2B).

An experiment to measure the pre-incubation time requirement showed a 10 min maximum (data not shown). The AI thermostability data (Table 3), showed a relatively stable protein, since it could stand temperatures up to 94°C for 30 min, retaining 52% of the activity. The effect of pH on the inhibitory activity of the AI measured against *F. verticillioides* amylase, showed a maximum at pH 7.0 (Fig. 3).

This AI showed a broad spectrum of inhibition displaying high inhibition to the fungi amylases from *F. verticillioides* and *A. flavus*, as well as amylases from some important insects, such as *A. obtectus*, *Z. subfasciatus*, *T. castaneum* and *S. cerealela*. However, it did not recognize the amylases from *S. zeamais* and *P. truncatus*. Amylase from human saliva and human pancreas were also recognized, whereas amylases from germinating seed of corn, and β -amylase from barley were not recognized (Table 4).

Mycoflora content and mycotoxin contamination in all hybrids are shown in Table 5. The total fungi and yeast count ranged from 1.2×10^3 to 2.4×10^6 CFU/g. *Fusarium* sp. (81.1% of the samples) prevailed (range from 1.5×10^2 to 2.4×10^6 CFU/g), followed by *Penicillium* sp. detected in 54.1% of the samples (range from 1.0×10^2 to 4.0×10^5 CFU/g). *Aspergillus* sp. occurred in 5.4% of the samples (range from 5.0×10^2 to 5.0×10^4 CFU/g), *Cladosporium* sp. in 32.4% (range from 5.0×10 to 5.0×10^5 CFU/g), and yeasts in 78.4% of the samples (range from 4.0×10^2 to 5.6×10^5 CFU/g).

Fumonisin ($FB_1 + FB_2$) were detected in 21 out of the 37 hybrids studied (56.8%), in the concentration range of 0.05 to 2.67 μ g of FB/g of corn (Table 5). The hybrids AS32, XL360, and DINA766 (Table 5) were fumonisin positive, but negative for *Fusarium* sp. It is interesting to note that these freshly collected samples were highly infected by yeast (Table 5), which has been reported to interfere with Fusaria growth (6,18,28).

The correlation between toxin contamination and AI content was evaluated using Fusaria count, fumonisin data and AI against *F. verticillioides* (Fig. 4). Consequently, the 37 corn hybrids were grouped into 6 classes of AI levels for a correlation test. However, although correlation showed a tendency in the decrease of Fusaria count ($r = -0.48$) relative to fumonisin content ($r = -0.37$), when the AI level was high, statistical analysis indicated that neither a correlation existed between AI and fumonisin level, nor between AI and *Fusarium* sp. count.

DISCUSSION

Amylase inhibitors have been extensively studied, mainly as resistance factors to insects. However, much less information is available on their role as resistance factors to fungi. Recently, Fakhoury and Woloshuk (9) have reported a 38 kDa AI from *Lablab purpureus* active against *A. flavus* amylase and also against its growth.

The new AI herein described differs from the 12 and 14 kDa inhibitors previously reported, in both molecular weight and specificity (2,7); and from the 22 kDa in

that the pI of this new AI is 5.4 while the 22 kDa protein showed a basic pI (13,17). In addition, Gómez-Leyva and Blanco-Labra (13) recently demonstrated that this pure protein lacks of inhibitory activity. This inhibitor also shows a wide range of inhibition, showing interesting potential for the control of some agricultural important insect pests.

González et al. (14), in a similar study in Argentina on corn, also detected a predominance of *Fusarium* sp., in both genus frequency and relative density, followed by *Penicillium* sp., *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *Cladosporium* sp., *Nigrospora* sp., and *Trichoderma* sp. *Fusaria* prevailed in the internal seedborne mycoflora, while *Penicillium* sp. were the most common fungi in the external mycoflora. Other studies carried out in different countries, demonstrated that *F. verticillioides* have been found to be important primary fungi of field and stored corn in Brazil (15), United States of America (23), Honduras (19), the European Community (8) and Italy (22).

Table 5 shows that the fumonisin concentration in the tested materials were lower than those found in previous studies (8,22,23,25), including our own previous reports (15,27). However, these levels are still under the range reported by Munkvold and McKean (24) and Shephard et al. (36). A possible explanation for this could be that the experimental field plot used was kept under more controlled conditions.

Nevertheless, evidence suggesting that inhibitors of amylases contribute to resistance to fungal pathogens has been shown by Fakhoury and Woloshuk (9). This new corn AI, which in the laboratory has been shown to be active against *F. verticillioides* amylase, when measured in the field under the conditions tested, showed no correlation to fungal growth or fumonisin production. This lack of effect *in vivo* could be influenced by the conditions used, contamination by yeast or else could be the result of a fungal detoxification such as a proteolytic activity acting on this protein. However, the specificity shown against some important insect and fungal amylases opens new perspectives for its application.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was financed by National Council of Scientific and Technological Development-CNPq (Brazil), and Concyteg-Mexico (project 00-03). The authors wish to thank the National Council of Scientific and Technological Development-CNPq for a Doctoral fellowship to Edson L. Z. Figueira (Process 144787/1998-9), and for a research productivity fellowship to Elisa Y. Hirooka; and the CAPES Foundation for Doctoral Sandwich fellowship to Edson L. Z. Figueira (Process BEX0119/01-6).

LITERATURE CITED

1. Blanco-Labra, A., and Iturbe-Chiñas, F.A. 1981. Purification and characterization of an α -amylase inhibitor from maize (*Zea mays*). J. Food Biochem. 5:1-17.
2. Blanco-Labra, A., Chagolla-Lopez, A., Martínez-Gallardo, N., and Valdes-Rodriguez, S. 1995. Further characterization of the 12 kDa protease/alpha-amylase inhibitor present in maize seeds. J. Food Biochem. 19:27-41.
3. Bloom, H., Beier, H., and Gross, H.S. 1987. Improved silver staining of the plant protein, RNA and DNA in polyacrylamide gels. Electrophoresis 8:93-99.
4. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72:248-254.
5. Bullerman, L.B., and Draughon, F.A. 1994. *Fusarium moniliforme* and fumonisin symposium - introduction. J. Food Protect. 57:513.

6. Camilo, S.B., Ono, C.J., Ueno, Y., and Hirooka, E.Y. 2000. Anti-*Fusarium moniliforme* activity and fumonisin biodegradation by corn and silage microflora. *Braz. Arch. Biol. Techn.* 43:159-164.
7. Chen, Z.Y., Brown, R.L., Russin, J.S., Lax, A.R., and Cleveland, T.E. 1999. A corn trypsin inhibitor with antifungal activity inhibits *Aspergillus flavus* α -amylase. *Phytopathology* 89:902-907.
8. Doko, M.B., Rapior, S., Visconti, A., and Schjoth, J.E. 1995. Incidence and levels of fumonisin contamination in maize genotypes grown in Europe and Africa. *J. Agric. Food Chem.* 43:429-434.
9. Fakhoury, A.M., and Woloshuk, C.P. 2001. Inhibition of growth of *Aspergillus flavus* and fungal α -amylases by a lectin-like protein from *Lablab purpureus*. *Mol. Plant-Microbe Interac.* 14:955-961.
10. Figueira, E.L.Z., and Hirooka, E.Y. 2000. Culture medium for amylase production by toxigenic fungi. *Braz. Arch. Biol. Techn.* 43:461-467.
11. Gatehouse, A.M.R., Hilder, V.A., and Gatehouse, J.A. 1992. Control of insect pests by plant genetic engineering. *Proc. Royal Soc. Edinburgh*, 99B (3/4):51-60.
12. Gomes, V.M., and Xavier-Filho, J. 1994. Biochemical defenses of plants. *Arq. Biol. Tecnol.* 37:371-383.
13. Gómez-Leyva, J.F., and Blanco-Labra, A. 2001. Bifunctional α -amylase/trypsin inhibitor activity previously ascribed to the 22 kDa TL protein, resided in a contaminant protein of 14 kDa. *J. Plant Physiol.* 158:177-183.
14. González, H.H.L., Resnik, S.L., Boca, R.T., and Marasas, W.F.O. 1995. Mycoflora of Argentinian corn harvested in the main production area in 1990. *Mycopathologia* 130:29-36.
15. Hirooka, E.Y., Yamaguchi, M.M., Aoyama, S., Sugiura, Y., and Ueno, Y. 1996. The natural occurrence of fumonisins in Brazilian corn kernels. *Food Addit. Contam.* 13:173-183.
16. Huang, Z., White, D.G., and Payne, G.A. 1997. Corn seed proteins inhibitory to *Aspergillus flavus* and aflatoxin biosynthesis. *Phytopathology* 87:622-627.
17. Huynh, Q.K., Borgmeyer, J.R., and Zobel, J.F. 1992. Isolation and characterization of a 22 kDa protein with antifungal properties from maize seeds. *Biochem. Bioph. Res. Co.* 182:1-15.
18. Janisiewicz, W.J., Peterson, D.L., and Bors, R. 1994. Control of storage decay of apples with *Sporobolomyces roseus*. *Plant Dis.* 78:466-470.
19. Julian, A.M., Wareing, P.W., Philips, S.I., Medlock, V.F.P., MacDonald, M.V., and Río, L.E. 1995. Fungal contamination and selected mycotoxins in pre- and post-harvest maize in Honduras. *Mycopathologia* 129:5-16.
20. Kedera, C.J., Plattner, R.D., and Desjardins, A.E. 1999. Incidence of *Fusarium* spp. and levels of fumonisin B₁ in maize in western Kenya. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:41-44.
21. Kuiper-Goodman, T., Scott, P.M., and Watanabe, H. 1987. Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 7:253-306.
22. Logrieco, A., Moretti, A., Ritieni, A., Bottalico, A., and Corda, P. 1995. Occurrence and toxigenicity of *Fusarium proliferatum* from preharvest maize ear rot, and associated mycotoxin, in Italy. *Plant Dis.* 79:727-731.
23. Munkvold, G.P., and Desjardins, A.E. 1997. Fumonisins in maize, can we reduce their occurrence? *Plant Dis.* 81:556-565.
24. Munkvold, G.P., and McKean, J. 1994. Field survey for corn ear rots and mycotoxin in 1993. Pages 5901-5904 in: Iowa State Univ. Vet. Med. Ext. Newsl. 402-V751.

25. Murphy, P.A., Rice, L.G., and Ross, P.F. 1993. Fumonisin B₁, B₂ and B₃ content of Iowa, Wisconsin and Illinois corn and corn screenings. *J. Agric. Food Chem.* 41:263-266.
26. Norred, W.P., and Voss, K.A. 1994. Toxicity and role of fumonisins in animal diseases and human esophageal cancer. *J. Food Protect.* 57:522-527.
27. Ono, E.Y.S., Ono, M.A., Funo, F.Y., Medina, A.E., Oliveira, T.C.R.M., Kawamura, O., Ueno, Y., and Hirooka, E.Y. 2001. Evaluation of fumonisins-aflatoxins co-occurrence in Brazilian corn hybrids by ELISA. *Food Addit. Contam.* 18:719-729.
28. Petterson, S., Hansen, M.W., Axberg, K., Hult, K., and Schnurer, J. 1998. Ochratoxin A accumulation in cultures of *Penicillium verrucosum* with the antagonistic yeast *Pichia anomala* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Mycol. Res.* 102:1003-1008.
29. Sabino, M., Prado, G., Inomata, E.I., Pedroso, M.O., and Garcia, R.V. 1989. Natural occurrence of aflatoxin and zearalenone in maize in Brazil. Part II. *Food Addit. Contam.* 6:327-331.
30. Samson, R.A., Hoeskstra, E.S., Frisvad, J.C., and Filtenborg, O. 1995. Introduction to foodborn fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Netherlands.
31. SAS Institute. 1988. SAS user's guide. Statistics. SAS Inst., Cary, NC.
32. Schägger, H, and Von Jagow, G. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166:368-379.
33. Scott, G.E., and Zummo, N. 1994. Kernel infection and aflatoxin production in maize by *Aspergillus flavus* relative to inoculation and harvest dates. *Plant Dis.* 78:123-125.
34. Scott, P.M. 1993. Fumonisin. *Int. J. Food Microbiol.* 18:257-270.
35. Shephard, G.S., Sydenham, E.W., Thiel, P.G., and Gelderblom, W.C.A. 1990. Quantitative determination of fumonisins B₁ and B₂ by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Liq. Chromatogr.* 13:2077-2087.
36. Shephard, G.S., Thiel, P.G., Stockenstrom, S., and Sydenham, E.W. 1996. Worldwide survey of fumonisin contamination of corn and corn-based products. *J. AOAC Intern.* 79:671-687.
37. Ueno, Y. 2000. Risk of multiple exposure to natural toxins. *Mycotoxins* 50:13-22.
38. Ueno, Y., Aoyama, S., Sugiura, Y., Wang, D.S., Lee, U.S., Hirooka, E.Y., Hara, S., Karet, T., Chen, G., and Yu, S.Z. 1993. A limited survey of fumonisins in corn and corn-based products in Asian countries. *Mycotoxin Res.* 9:27-34.
39. Wang, J.S., Huang, T., Su, J., Liang, F., Wei, Z., Liang, Y., Luo, H., Kuang, S.Y., Qian, G.S., Sun, G., He, X., Kensler, T.W., and Groopman, J.D. 2001. Hepatocellular carcinoma and aflatoxin exposure in Zhyqing Village, Fusui County, People's Republic of China. *Cancer Epidemiol. Biomarkers* 10:143-146.
40. Watson, S.A., and Ramstad, P.E., eds. 1987. *Corn: Chemistry and Technology*. American Association of Cereal Chemist, St. Paul, MN. (Chapters 5 and 6).
41. Wilson, J.J., and Ingledew, W.M. 1982. Isolation and characterization of *Schwanniomyces alluvius* amylolytic enzymes. *Appl. Environ. Microb.* 44:301-307.
42. Wong, J.J., and Hsieh, D.P.H. 1976. Mutagenicity of aflatoxins related to their metabolism and carcinogenic potential. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 73:2241.

Table 1. Amylase inhibitor levels active against *F. moniliforme* amylase in different corn hybrids.

Hybrid	Inhibition level (AIU/g)	Hybrid	Inhibition level (AIU/g)
AG5011	15.97±0.42 ^a	DINA766	9.76±0.42 ^{ghij}
ZEN8490	15.54±1.03 ^a	EXCELER	9.75±0.71 ^{ghij}
XL360	14.07±0.16 ^{ab}	AG3010	9.71±0.69 ^{ghij}
XL220	14.05±0.48 ^{ab}	DENSUS	9.71±0.82 ^{ghij}
FT9006	13.93±0.22 ^{abc}	AS32	9.69±0.23 ^{ghij}
XL Exp9663	13.82±0.75 ^{abc}	BR205	9.67±0.30 ^{ghijk}
AGX9682	13.24±1.80 ^{bcd}	AGX9632	9.54±0.99 ^{ghijk}
XL221	12.91±0.71 ^{bcde}	AS3466	9.46±0.52 ^{hijk}
DINA556	12.51±0.43 ^{bcdef}	AG122	9.45±0.81 ^{hijk}
C435	12.42±0.98 ^{bcdef}	P3071	9.31±0.64 ^{ijk}
FT9043	11.75±0.72 ^{cdefg}	ZEN8202	9.29±0.42 ^{ijk}
C625	11.65±0.51 ^{cdefgh}	DINA1000	9.16±0.16 ^{ijkl}
ZEN8392	11.26±0.47 ^{defghi}	BR3123	8.54±0.70 ^{ijklm}
C701	10.82±0.87 ^{efghi}	BR206	8.38±0.75 ^{ijklm}
C333	10.57±0.68 ^{fghij}	P3027	7.46±0.67 ^{klmn}
P3041	10.56±0.15 ^{fghij}	XL345	6.98±1.47 ^{lmn}
DINA769	10.43±0.85 ^{fghij}	ZEN8501	6.70±0.53 ^{mn}
C901	10.33±1.02 ^{fghij}	MASTER	5.48±0.36 ⁿ
SG150	10.10±0.80 ^{ghij}		

a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l, m, and n : significant differences determined by the Tukey test ($P < 0.05$).

AIU/g: unit of AI activity of corn on dwb (means ± SD; n = 3).

Variation coefficient: 6.49%

Minimal significant difference: 1.20

Table 2. Corn amylase inhibitor purification steps.

Procedure	Specific Activity (AIU/mg of protein)	Yield (%)	Purification folds
Crude extract	5.5	100.0	1.0
Ammonium sulfate fractionation	8.7	57.6	1.6
Gel filtration (G-75)	10.3	17.4	1.9
Gel filtration-HPLC	38.0	17.4	6.9
Ion-exchange-HPLC	113.4	3.6	20.7

Table 3. AI thermostability after 30 min of thermal treatment.

Temperature (°C)	% Inhibition Activity as Compared with that at 25°C
25	100.0±7.5 ^a
40	112.2±9.2 ^a
70	69.8±5.1 ^b
94	52.0±2.9 ^c

^{a, b, c}: significant differences determined by the Tukey test ($P < 0.05$).

Inhibition (%): relative value compared with 25°C treatment (means ± SD; n = 3).

Variation coefficient: 7.97%

Table 4. AI activity measured against amylases from different sources.

Amylase source	Specific Activity (AIU/mg of protein)
Human salivary	27.7±7.5
Human pancreatic	14.3±4.6
<i>F. verticillioides</i>	28.8±7.2
<i>A. flavus</i>	68.2±1.7
<i>A. obtectus</i>	51.3±7.5
<i>Z. subfasciatus</i>	57.6±2.6
<i>T. castaneum</i>	21.8±2.3
<i>S. cerealela</i>	22.7±0.9
<i>S. zeamais</i>	-
<i>P. truncatus</i>	-
Germinated corn	-
Barley β-amylase	-

AIU/mg of protein: means ± SD; n = 3.

-: not detected.

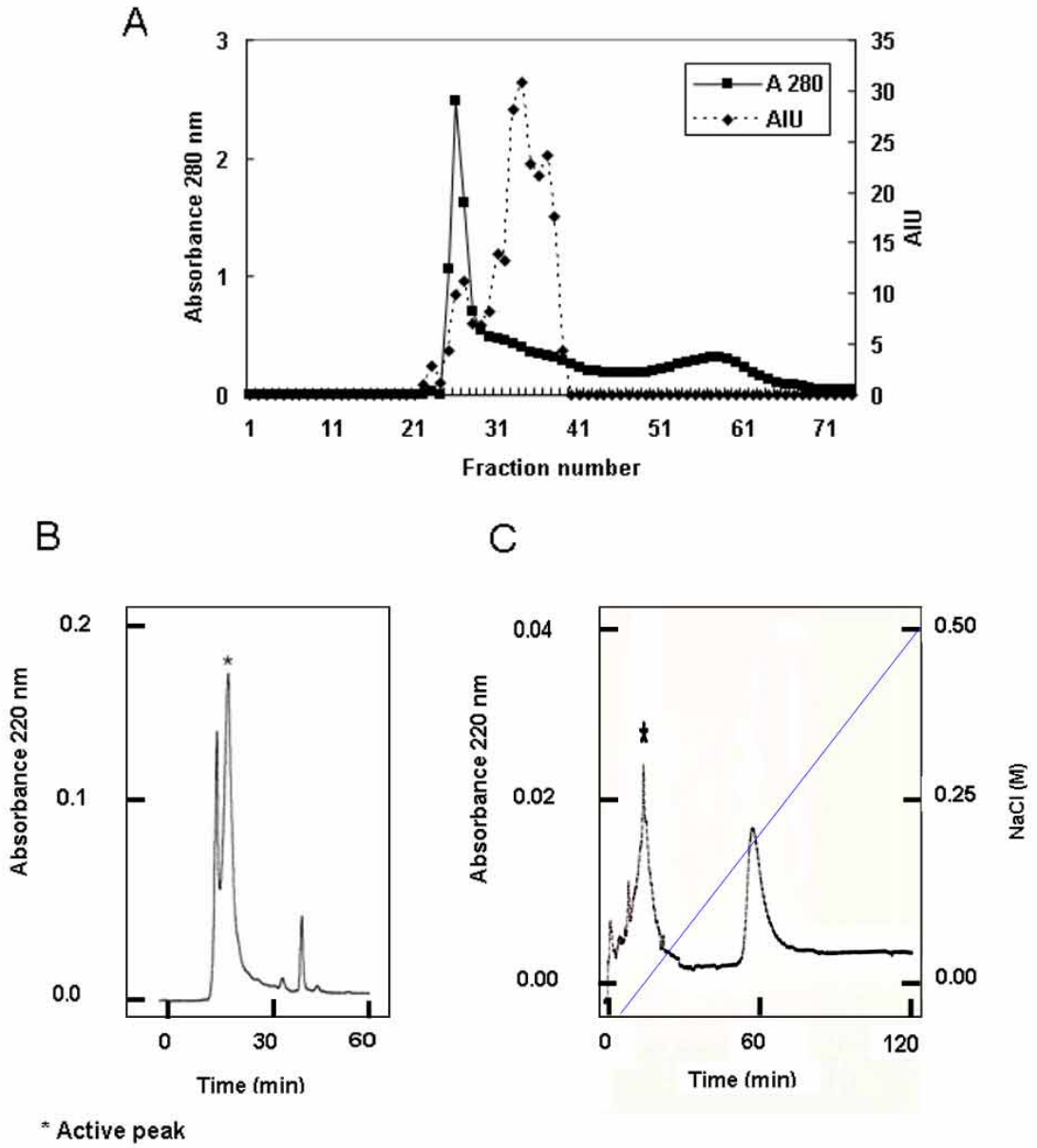


Fig. 1. (A) Sephadex G-75 gel filtration chromatography of fraction P₃₀₋₆₀ (166 x 1.6 cm column). (B) HPLC-Superose 12 HR 10/30 column from Sephadex G-75 chromatography active pool. (C) HPLC-anionic exchange column Vydac 300 VHP 575 from Superose chromatography active peak.

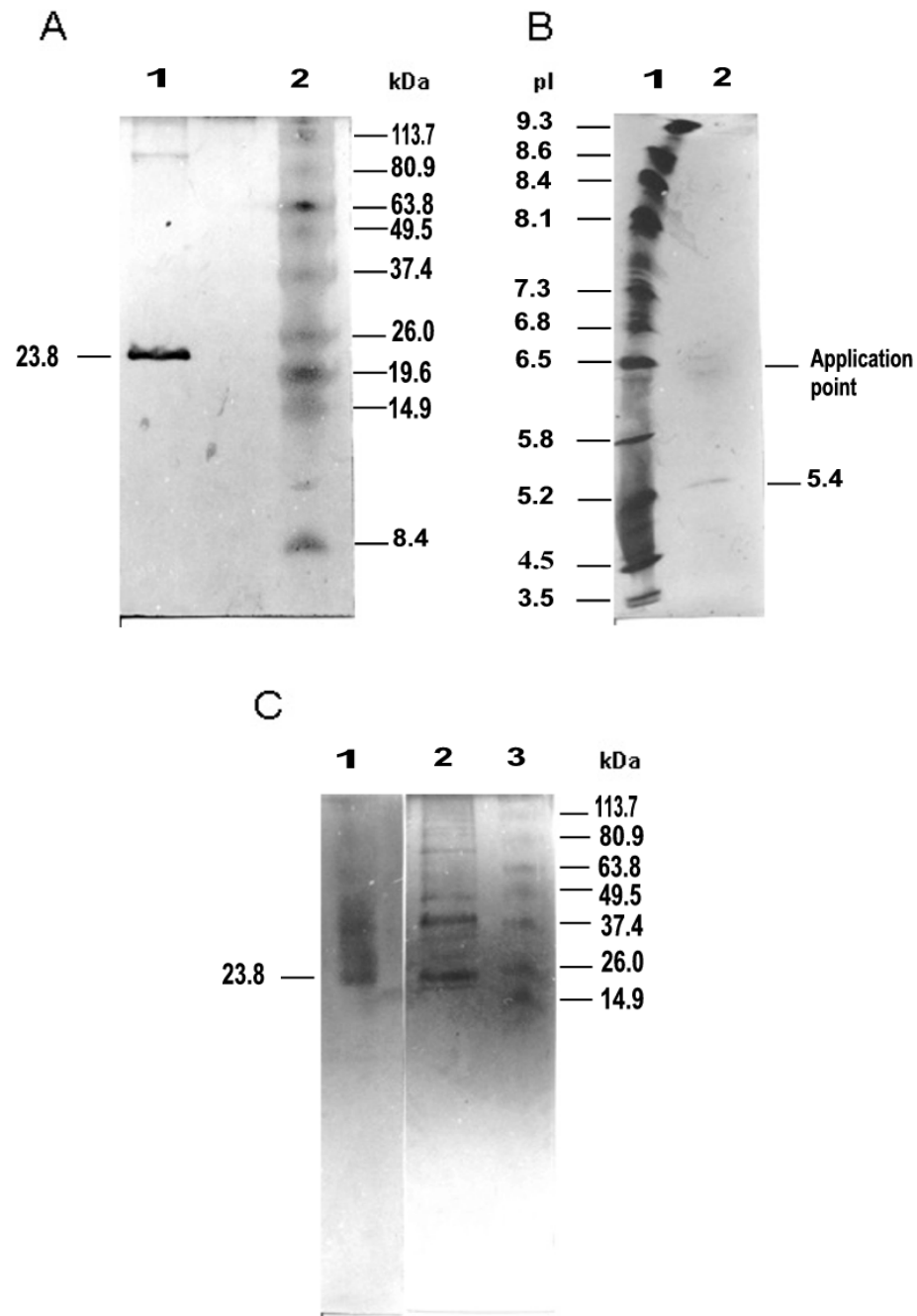


Fig. 2. (A) SDS-PAGE of the AI active peak from HPLC-anion exchange column Vydac 300 VHP 575. Line 1: AI. Line 2: Molecular weight markers (B) Isoelectric focusing of the AI active peak from HPLC-anion exchange column Vydac 300 VHP 575. Line 1: pI markers. Line 2: AI. (C) AI zymogram on SDS-PAGE of the inhibitor. Line 1: AI activity from active pool from Sephadex G-75 gel filtration chromatography. Line 2: Protein from active pool from Sephadex G-75 gel filtration chromatography. Line 3: Molecular weight markers.

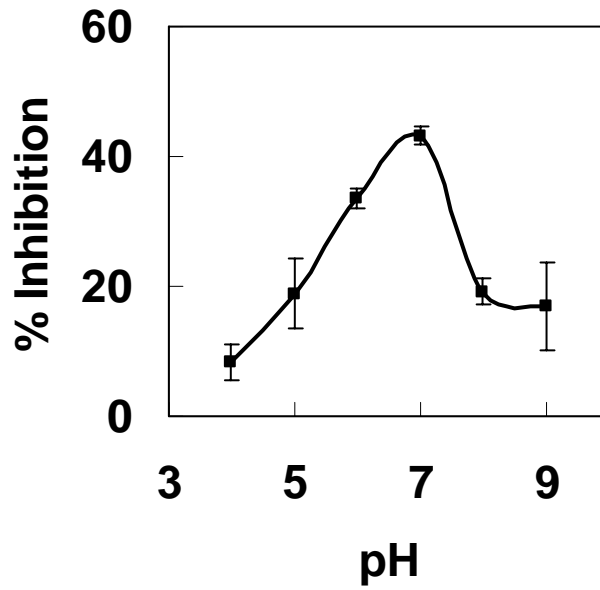


Fig. 3. Effect of pH on the interaction of *F. verticillioides* amylase and the amylase inhibitor.

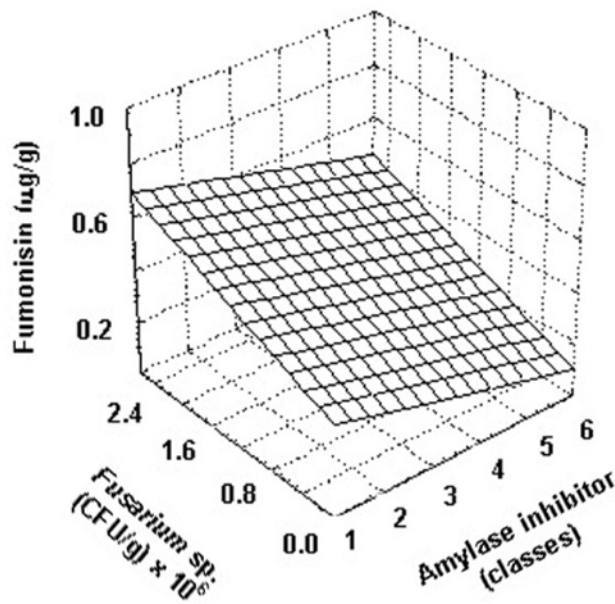


Fig. 4. Effect of *F. moniliforme* amylase inhibitor on *Fusarium* sp. count and fumonisin content.

**TRABALHO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO NA
REVISTA *PHYTOPATHOLOGY* EM 31/12/02**

Characterization of an Hydrophobic Amylase Inhibitor from Corn (*Zea mays*) Seeds with Activity against Amylase from *Fusarium verticillioides*

Edson L. Z. Figueira¹, Elisa Y. Hirooka¹, Elizabeth Mendiola-Olaya², and
Alejandro Blanco-Labra^{2*}

¹Universidade Estadual de Londrina. Campus Universitário. Caixa Postal 6001

CEP 86051-990, Londrina-PR, Brazil, e-mail: hirooka@uel.br

²Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Unidad Irapuato.

Apdo. Postal 629, 36500 Irapuato-Gto, Mexico, e-mail: ablanco@ira.cinvestav.mx

*Corresponding author.

ABSTRACT

A hydrophobic 19.7 kDa amylase inhibitor (AI) was purified from corn kernels by 95% ethanol extraction and anionic exchange chromatography. The AI has an isoelectric point of 3.6, and was very stable at different pH and high temperatures, maintaining 47.6% activity after being heated at 94°C for 60 min. Amino acid analysis indicates high valine, leucine, glycine, alanine and glutamic acid/glutamine content, and especially high valine content (41.2 mol %). This inhibitor is not a glycoprotein. It required 30 min preincubation time to maximize complex enzyme-inhibitor formation, when the amylase from *F. verticillioides* was tested. The optimal pH of interaction was 6.5. It showed broad spectrum activity including the following amylases: human saliva, porcine pancreas, *Fusarium verticillioides*, as well as those from some insects of agricultural importance (*Acanthoscelides obtectus*, *Zabrotes subfasciatus*, *Sitophilus zeamais* and *Prostephanus truncatus*). This novel hydrophobic protein has not only inhibited the amylase from *F. verticillioides*, but it also decreased the conidia germination. Thus this protein represents an approach to decrease the production of

fumonisin in corn, either by using it as a molecular marker to detect fungal resistance or through genetic engineering.

INTRODUCTION

Fusarium verticillioides is the fungus most frequently found in corn kernels (10,13). It is responsible for production of a group of structurally related metabolites known as fumonisins. A large number of reports on the occurrence of these mycotoxins in corn and corn-based foods and feeds have been published. They are associated with diseases at all stages of the corn plant development, infecting the roots, stalk and kernels (20). These toxins are a recurrent problem worldwide in corn, and so far, their postharvest elimination from corn kernels is not economically feasible. Therefore, efforts are presently focused on control strategies that prevent preharvest as well as postharvest contamination. Among these, the most desirable control strategy is the one based on the use of resistant corn, or possibly the use of genetically engineered plants that express antifungal proteins. Another possible approach could be based on the identification of naturally occurring components in corn that inhibit fumonisin synthesis, as proposed by Munkvold and Desjardins (16).

The natural occurrence of α -amylase inhibitors (AI) has been reported in a wide variety of plants, since Chrzazscs and Janicki detected the first α -amylase inhibitor in wheat in 1933 and 1934 (6). The research on corn AI started in the 1980's with the detection of a protein active against insect α -amylase, that was inactive against *Aspergillus oryzae* α -amylase (1). Later on, Mahoney et al. (14) and Blanco-Labra et al. (2) characterized a 12 kDa bifunctional protein, active against insect α -amylase (*Tribolium castaneum* and *Callosobruchus maculatus*), and also active against bovine and fungal protease (*Aspergillus niger* and *Aspergillus fumigatus*). These findings triggered interest in the study of these inhibitors as part of the natural resistance in corn for the control of specific phytopathogens. Although, Figueira et al. (7, in press) reported a corn inhibitor that inhibited *F. verticillioides* amylase *in vitro*, it did not have an effect when measured in the field against this fungus.

Amylase inhibitors also have been reported to play important roles as part of plant defense mechanisms, particularly against the attack by some insect such as *Sitophilus oryzae*, *Tenebrio molitor*, *Tribolium confusum* and *Callosobruchus maculatus* (2,9,24). Advances also have been made in expressing some of these inhibitors in different crops to provide increased resistance to specific insects (12,15).

In this work we describe the isolation and partial characterization of a new 19.7 kDa hydrophobic amylase inhibitor from corn (*Zea mays* L.) kernels. This protein inhibits the amylase activity and the conidia germination of *F. verticillioides*. It is also active against the amylase from some economically important insects. Therefore it has potential to control both the production of mycotoxins and insect attack in important grain crops.

MATERIALS AND METHODS

Kernels of corn hybrid AG5011 harvested from the 1999 crop, were used as the source of the AI. It was a gift from Antônio Carlos Gerage from the Agronomy Institute of Parana. The kernels were dried in the field to 14% moisture content and stored at -20°C.

α -Amylase from the mycotoxigenic fungus was obtained from *F. verticillioides* (previously known as *F. moniliforme*) strain 113F cultures, which were isolated from kernels reported to have been involved in animal intoxications. The strain was

maintained on potato dextrose agar (PDA) at 4°C. Crude amylase was obtained by growing the fungus in corn medium, as described by Figueira et al. (8). The activated fungal strain was inoculated into 480 ml of corn medium, consisting of 2% ground corn in the supernatant of milky stage corn and incubated for 20 days at 25°C. The culture medium was centrifuged at 5,000 x g for 10 min at 4°C, using the supernatant as the source of amylase.

Human salivary and pancreatic α -amylases were obtained from Amersham Pharmacia Biotech; swine pancreatic α -amylase, barley α -amylase and β -amylase, were obtained from Sigma Chemical Co. Amylases from different insects were obtained by the method of Blanco-Labra et al. (2). Insects were provided by the insectary at the Cinvestav-Irapuato Unit. Insect cultures of *P. truncatus*, *S. cerealela* and *S. zeamais* were maintained on whole maize seeds, while *T. castaneum* was grown on wheat flour. *Callosobruchus maculatus* cultures were maintained on whole chickpea seeds; *Zabrotes subfasciatus* and *Acanthoscelides obtectus* cultures were grown on whole navy beans. All cultures were maintained in growth chambers at 28°C with a relative humidity of 65-75%. For amylase extraction, the larvae of the corresponding insects were homogenized with different buffer solutions in a 1:5 (wt/vol) ratio. In the case of *P. truncatus* α -amylase, the extraction was done in a solution of 0.1 M NaCl and 40 mM succinate, pH 6.5. The amylases from *S. zeamais*, *T. castaneum*, *Z. subfasciatus*, *C. maculatus* and *A. obtectus*, were extracted with 0.2 M succinate buffer, pH 4.5. The suspensions were centrifuged at 10,000 x g for 10 min at 4°C, and the supernatants were used as source of α -amylase.

α -Amylase from corn and rice were extracted in a solution of 0.01 M CaCl₂ and 0.1 M NaCl, from seeds germinated five and three days, respectively.

Amylase Inhibitor Assay: Amylase activity was analyzed by the iodometric method (23) modified to a micro method for microplate assay. The AI activity was measured by preincubating the AI with the amylase (0.2 AU) for 30 min at 25°C. The residual amylase activity was measured after the substrate was added and the reaction was left to proceed for 60 min at 25°C. A starch control without amylase was used in each test.

One unit of AI (AIU) was defined as the amount of protein that inhibited 1 AU of amylase under the assay conditions described. One unit of amylase activity (AU) was defined as the amount of enzyme that hydrolyzed 0.1 mg of starch in 60 min at 25°C.

Amylase Inhibitor Extraction: In order to optimize the AI extraction, several ethanol concentrations were tested (0, 20, 40, 60, 80, and 95%). 95% ethanol gave the best results. Finely ground corn kernels (48 mesh in a Janke & Kunkel model A10 mill) were suspended in each solution (1:5 wt/vol) and continuously stirred in an orbital shaker (150 rpm) for 2 h at room temperature. The supernatant was separated by centrifugation (30,000 x g for 20 min, at 4°C), and the activity determined.

Amylase Inhibitor Purification: Finely ground corn kernels were extracted with 95% ethanol (1:5 wt/vol) as previously described, and the supernatant was separated by centrifugation (30,000 x g, 20 min, at 4°C), and dried in a speed vacuum. The pellet was dissolved in 0.01 M ammonium bicarbonate, containing 1% triton X-100 and applied to an Econo-Pac Q cartridge, 1.0 x 5.0 cm (Bio Rad), equilibrated with the same solution, and eluted with a salt gradient from 0 to 0.25 M NaCl in 0.01 M ammonium bicarbonate, containing 1% triton X-100 over 90 min at a flow rate of 1 ml/min. Two milliliter fractions were collected. The active fractions eluted from this column were pooled and stored at -20°C.

Preincubation Time Effect: Constant amounts (1.3 µg) of AI were preincubated with 0.05 M KH_2PO_4 -NaOH buffer (pH 6.7) for 0, 5, 10, 15, 30, 45, 60 and 120 min at 25°C containing fixed amounts of amylase from *F. verticillioides* prior to addition of substrate. The remaining amylase activity was determined.

Thermal Stability: Constant amounts (1.3 µg) of AI were heated in 0.05 M KH_2PO_4 -NaOH buffer (pH 6.7) for 0, 5, 10, 15, 30, 45 and 60 min at 50, 70 and 94°C. They then were immediately cooled and preincubated for 30 min with the amylase from *F. verticillioides* at 25°C, and the remaining amylase activity was determined.

pH Effect on the AI Activity: To determine the effect of pH on the inhibition of the *F. verticillioides* amylase, AI (1.3 µg) activity was measured at pH 4.0, 5.0, 6.0, 6.5, 7.0, 8.0 and 9.0, using the following 0.05 M buffers: sodium acetate pH 4.0 and 5.0; sodium phosphate pH 6.0, 6.5 and 7.0; and tris-HCl pH 8.0 and 9.0. The AI and the enzyme concentrations were kept constant (0.2 UI). The AI together with the amylase were preincubated at each pH for 30 min at 25°C, and the remaining amylase activity was determined.

pH Stability: The effect of pH on AI stability was measured at pH of 4.0, 5.0, 6.0, 6.5, 7.0, 8.0 and 9.0, using the same buffers as above. The AI (1.3 µg) was incubated for 16 h at 4°C, then the samples were adjusted to pH 6.7, and the residual activity was determined.

Molecular Weight Determination: The apparent molecular weight of the purified AI was measured by SDS-PAGE according to the method of Schägger & von Jagow (19), using 4% acrylamide for the stacking gel and 13% for the separating gel. Molecular weight standards (Bio Rad) were run in adjacent lanes, and the gels were silver-stained using the method of Blomm et al. (4).

Isoelectric Point Determination: The AI isoelectric point was measured in a Rotofor Cell (Bio Rad) using ampholytes in a pH range from 3.0 to 10.0. Focusing was carried out at 15 W constant power for 4 h at 4°C. Twenty fractions were collected for pH and AI activity determination.

Specificity: The specificity of the AI was evaluated against amylase extracts from *F. verticillioides*, human saliva and pancreas, swine pancreas and germinated corn, rice and barley (in barley β-amylase was also determined) and from the insects *S. zeamais*, *T. castaneum*, *Z. subfasciatus*, *A. obtectus*, *P. truncatus* and *S. cerealela*. The AI (1.3 µg) with the corresponding amylase, was preincubated for 30 min at room temperature in 0.05 M sodium phosphate buffer, pH 7.0 before the inhibitory activity was measured.

Carbohydrate: The possible presence of carbohydrate in AI was determined by SDS-PAGE following Schägger & von Jagow method (19). Acrylamide concentrations were 4% for the stacking gel and 10% for the separating gel, and the gel was stained with Schiff Reagent (PAS).

Dilution Factor: The possible presence of molecular aggregates was determined by a dilution experiment in which the AI was diluted 1:2, 1:4, 1:8 and 1:10. The specific AI activity was determined in the standard solution, and in each dilution, where the amount of AI remained constant (1.3 µg) throughout the assay.

Amino Acid Analysis: Amino acid analysis of the purified AI was determined by reverse-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC). A 260 µg sample was hydrolyzed under vacuum with 200 µl of 6 N HCl and 1.0% distilled phenol at 105°C in a sealed tube for 24 h. The hydrolyzed sample was dried and derivatized with phenyl isothiocyanate, dried and solubilized in 0.005 M phosphate buffer, pH 7.4 and methanol (8:2 vol/vol) and then 16 µl were analyzed on a C-18 Pico-Tag column. Data were integrated using a model 19-740 integrator (Waters Chromatography, Millipore Corp.).

Cysteine was determined according to Thanhauser et al. (22) as modified by Chan and Wasserman (5).

Fungal Growth Assay: Growth medium (1 ml) composed of 1% starch and 0.13% tryptone, containing 0, 25, 50, 100 and 200 µg/ml of AI, was placed in a sterile tube. *F. verticillioides* (1.6×10^6 conidia) was added to the medium to test for inhibition of conidial germination and hyphal growth. Germination data were collected from three repetitions comprising 100 conidia each. Hyphal growth data represent three repetitions of 40 determinations each.

Protein Assay: Protein was determined by the bicinchoninic acid procedure (21). Bovine serum albumin was used as the standard protein.

RESULTS

With regard to the extraction procedure, increasing the percentage of ethanol up to 95% during the extraction, the amount and selectivity of the AI extraction, as shown by SDS-PAGE analysis under reducing conditions, improved steadily (Fig. 1).

The overall results of the purification procedure are shown in Table 1. In a typical experiment, 100 g of corn flour were extracted with 500 ml of 95% ethanol (crude extract), yielding approximately 0.58 g of protein. After solvent elimination in a speed vacuum, the pellet was solubilized in 0.01 M ammonium bicarbonate containing 1% triton X-100, obtaining a 74.7% AI recovery with 4.7-fold purification. The protein extract was then applied to an anion exchange chromatography column. The AI was eluted using a NaCl linear gradient in 0.01 M ammonium bicarbonate, containing 1% triton X-100. The AI eluted as a single non-symmetric peak (Fig. 2), with a final yield of 56.4% of the total activity originally present, and purification of 14 times (Table 1).

The active fractions (peak 2) obtained after ion-exchange chromatography were pooled and concentrated using an ultrafiltration cell with a 10 kDa molecular weight exclusion membrane, and the apparent molecular weight determined by SDS-PAGE under reducing conditions. The purified AI gave a single protein band, with an apparent molecular weight of 19.7 kDa (Fig. 3). The negative stain for carbohydrates after SDS-PAGE indicated that the AI is not a glycoprotein (data not shown).

The isoelectric point, determined by a Rotofor Cell system using a pH range from 3.0 to 10.0, gave a pI of 3.6. When a dilution factor assay for aggregate molecular detection was used (the protein was subjected to serial dilution with the total amount of protein remaining constant), the specific activity in all dilutions remained constant. Therefore, it was concluded that no molecular aggregates were formed.

The AI amino acid composition (Table 2) showed a highly hydrophobic protein with 63.6 mol % of hydrophobic amino acids, and a very high valine concentration (41.2 mol %). In terms of nutritional value according to FAO/WHO (1973), this AI showed low levels of the essential amino acids, lysine, threonine, cysteine + methionine and

isoleucine, but exceptionally high levels of valine, leucine and phenylalanine + tyrosine.

The required preincubation time for formation of the enzyme-inhibitor complex, was 30 min. The thermostability data (Table 3) indicated a relatively stable protein, that was stable up to 100°C for 30 min and maintaining almost half of the original activity.

When the effect of pH on AI activity was measured, it showed a maximum at pH 6.5 (Fig. 4) that decreased at lower and higher pHs. The stability determination of AI at different pH values indicated maximal stability at neutral pH (Fig. 5).

The AI showed a broad spectrum of amylase inhibition, inhibiting the fungal amylase from *F. verticillioides*, and it also inhibited amylases from the important insects, *A. obtectus*, *Z. subfasciatus*, *S. zeamais*, and *P. truncatus*, but it had no effect on the amylase activities from *T. castaneum* and *S. cerealela*. Amylases from human saliva and swine pancreas were also inhibited, but human pancreatic amylase was not. Amylases from germinating seed of rice and β -amylase from barley were not inhibited, whereas α -amylases from germinating corn and barley seeds were inhibited (Table 4).

Another important characteristic of this protein was the inhibition of fungal conidial germination. When conidia of *F. verticillioides* were incubated with 10, 25, 50, 100 and 200 $\mu\text{g/ml}$ of AI, germination was reduced 100% after 12 h at an AI concentration of 50 $\mu\text{g/ml}$ (Fig. 6).

DISCUSSION

The present work describes the purification and characterization of the ethanol soluble AI present in a 95% alcoholic extract of corn kernels. The purified AI showed some differences compared to other previously reported AIs. Among the differences is its high hydrophobicity, which explains its solubility in ethanol. Most of the amylase inhibitors studied are water soluble (albumin-like inhibitors), some others are globulin type proteins, which are extracted with NaCl solutions and dilute acid solutions. However, there are a few amylase inhibitors that are extracted with aqueous alcohols, particularly 70-80% ethanol, such as some hydrophobic cereal storage proteins including several protease and amylase inhibitors (18).

According to Osborne (17), based on the extraction procedure, this new AI would be classified as a prolamine. In corn zein is the most important maize storage protein. This AI and these types of proteins are generally poor in basic amino acids, and as are most of the zein proteins. AI also is poor in some essential amino acids (tryptophan, lysine and threonine), but very rich in valine, leucine and phenylalanine + tyrosine.

The pI of this AI is similar to those reported from beans. However, unlike those found in common beans and tepary beans, this AI is not a glycoprotein (3,11). The optimal pH of 6.5 decreased at higher and lower pHs.

This AI showed a broad spectrum of amylase inhibition; high inhibition on the fungal amylase from *F. verticillioides*, and also on amylases from some agriculturally important insects. In addition, this AI inhibited the germination of *F. verticillioides* conidia *in vitro*. Perhaps the most promising aspect for this AI is that it inhibits the amylase activity and conidial germination of the most important pathogen of corn, which also affects human and animal health. In addition, this inhibitor did not affect human pancreatic amylase, and it showed low inhibition on the amylase produced during corn germination. Therefore, this AI might be a useful molecular marker in the search for *F. verticillioides* resistance in corn.

Considering that an AI from common bean has been successfully expressed in pea (*Pisum sativum*) and in azuki bean resulting in a pea with increased resistance to attack

of *Bruchus pisorum*, and in azuki bean with increased resistance to *C. chinensis*, *C. maculatus* and *C. analis* (12,15), one should consider this AI as a protein with good potential for its expression in some other plants to increase resistance to specific pathogens and insects.

In summary, this AI shows interesting properties *in vitro* which could be of interest, particularly for its possible effect on the control of *F. verticillioides* and a decrease in fumonisin production. The broad spectrum of AI inhibition of insect amylases is interesting for its possible participation in the defense of grains against numerous insects of agricultural importance. However, there are yet several questions to be answered, among them; does this AI function *in vivo* as part of the defense mechanism of the plant?. Where is it located inside the mature dry grain?. Finally, if this inhibitor works *in vivo*, would this defense be sustained in time?, or would the fungus or insect develop resistance?. All these questions need to be answered when a protein is to be considered for developing a program to increase resistance to a specific fungus or insect.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was financed by the National Council of Scientific and Technological Development-CNPq (Brazil), and 0003 CONCYTEG/CONACYT – 079 (Mexico). The authors wish to thank the National Council of Scientific and Technological Development-CNPq for a Doctoral fellowship to Edson L. Z. Figueira (Process 144787/1998-9), and for a research productivity fellowship to Elisa Y. Hirooka; and the CAPES Foundation (Brazil) for a Doctoral Sandwich fellowship to Edson L. Z. Figueira (Process BEX0119/01-6).

LITERATURE CITED

1. Blanco-Labra, A., and Iturbe-Chiñas, F.A. 1981. Purification and characterization of an α -amylase inhibitor from maize (*Zea mays*). J. Food Biochem. 5:1-17.
2. Blanco-Labra, A., Chagolla-Lopez, A., Martínez-Gallardo, N., and Valdes-Rodriguez, S. 1995. Further characterization of the 12 kDa protease/alpha-amylase inhibitor present in maize seeds. J. Food Biochem. 19:27-41.
3. Blanco-Labra, A., Sandoval-Cardoso, L., Mendiola-Olaya, E., Valdés-Rodríguez, S., and López, M.G. 1996. Purification and characterization of a glycoprotein α -amylase inhibitor from tepary bean seeds (*Phaseolus acutifolius* A. Gray). J. Plant Physiol. 149:650-656.
4. Bloom, H., Beier, H., and Gross, H.S. 1987. Improved silver staining of the plant protein, RNA and DNA in polyacrylamide gels. Electrophoresis 8:93-99.
5. Chan, K.Y., and Wasserman, B.P. 1993. Direct colorimetric assay of free thiol groups and disulfide bonds in suspension of solubilized and particulated cereal proteins. Cereal Chem. 78:22-26.
6. Chrzaszcz, T., and Janicki, J. 1934. The inactivation of animal amylase by plant paralyzers and the presence of inactivating substances in solutions of animal amylase. Biochem. J. 28:296-304.
7. Figueira, E.L.Z., Blanco-Labra, A., Gerage, A.C., Ono, E.Y.S., Mendiola-Olaya, E., Ueno, Y., and Hirooka, E.Y. (accepted by Plant. Dis., August 26, 2002). New amylase inhibitor present in corn seeds active *in vitro* against amylase from *Fusarium verticillioides*.
8. Figueira, E.L.Z., and Hirooka, E.Y. 2000. Culture medium for amylase production by toxigenic fungi. Braz. Arch. Biol. Techn. 43:461-467.

9. Gatehouse, A., Fenton, K.A., Jepson, I., and Pavey, D.J. 1986. The effects of alpha-amylase inhibitors on insect storage pests: inhibition of alpha-amylase *in vitro* and effects on development *in vivo*. *J. Sci. Food Agric.* 37:727-734.
10. González, H.H.L., Resnik, S.L., Boca, R.T., and Marasas, W.F.O. 1995. Mycoflora of Argentinian corn harvested in the main production area in 1990. *Mycopathologia* 130:29-36.
11. Ho, M.F., Yin, X., Filho, F.F., Lajolo, F., and Whitaker, J.R. 1994. Naturally occurring α -amylase inhibitors: structure/function relationships. Chapter 5 in: *Protein Structure Function Relationships in Foods*. R.Y. Yada, R.L. Jackman, and J.L. Smith, eds. Blackie Academic & Professional, London.
12. Ishimoto, M., Sato, T., Chrispeels, M.J., and Kitamura, K. 1996. Bruchid resistance of transgenic azuki bean expressing seed α -amylase inhibitor of common bean. *Entomol. Exp. Appl.* 79:309-315.
13. Kedera, C.J., Plattner, R.D., and Desjardins, A.E. 1999. Incidence of *Fusarium* spp. and levels of fumonisin B₁ in maize in western Kenya. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:41-44.
14. Mahoney, W.C., Hermodson, M.A., Jones, B., Powers, D.D., Corfman, R.S., and Reeck, G.R. 1984. Amino acid sequence and secondary structural analysis of the corn inhibitor of trypsin and activated Hageman Factor. *J. Biol. Chem.* 259:8412-8416.
15. Morton, R.L., Schoeder, H.E., Bateman, K.S., Chrispeels, M.J., and Armstrong, E. 2000. Bean α -amylase inhibitor 1 in transgenic peas (*Pisum sativum*) provides complete protection from pea weevil (*Bruchus pisorum*) under field conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:3820-3825.
16. Munkvold, G.P., and Desjardins, A.E. 1997. Fumonisin in maize, can we reduce their occurrence? *Plant Dis.* 81:556-565.
17. Osborne, T.B. 1924. *The Vegetable Proteins*. Longmans, Green & Co.: London. 154 pp.
18. Richardson, M. 1991. Seed storage proteins – the enzyme inhibitors. Chapter 10 in: *Methods in Plant Biochemistry*. L. Rogers, ed. Academic Press, New York.
19. Schägger, H., and von Jagow, G. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166:368-379.
20. Shephard, G.S., Thiel, P.G., Stockenstrom, S., and Sydenham, E.W. 1996. Worldwide survey of fumonisin contamination of corn and corn-based products. *J. AOAC Intern.* 79:671-687.
21. Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., and Klenk, D.C. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150:76-85.
22. Thannhauser, T.W., Konishi, Y., and Scheraga, H.A. 1987. Analysis for disulfite bonds in peptides and proteins. *Methods Enzymol.* 143:115-119.
23. Wilson, J.J., and Ingledew, W.M. 1982. Isolation and characterization of *Schwanniomyces alluvius* amyolytic enzymes. *Appl. Environ. Microb.* 44:301-307.
24. Xavier-Filho, J., Campos, F.A.P., Ary, M.B., Silva, C.P., Carvalho, M.M.M., Macedo, M.L.R., Lemos, F.J.A., and Grant, G. 1989. Poor correlation between the levels of proteinase inhibitors found in seeds of different cultivars of cowpea (*Vigna unguiculata*) and the resistance/susceptibility to predation by *Callosobruchus maculatus*. *J. Agric. Food Chem.* 27:1139-1143.

Table 1: Purification of AI from corn kernels.

Procedure	Specific Activity (AIU/mg protein)	Yield (%)	Purification (fold)
Crude extract in 95% ethanol	8.9	100.0	1.0
Extraction in 0.01 M ammonium bicarbonate containing 1% triton X-100	41.8	74.8	4.7
Anion exchange (Q-sepharose) chromatography	123.8	56.2	13.9

Table 2: Amino acid composition of the purified AI and its nutritional value.

Amino Acid	Mol %		Amino Acid	Mol %	
	IA	FAO/WHO ^a		IA	FAO/WHO ^a
Asx	1.4		Val	41.2	4.2
Glx	7.0		Met	1.7	
Ser	3.4		Cys	1.0	
Gly	7.1		Met+Cys	2.7	3.0
His	2.1		Ile	2.3	3.5
Arg	0.7		Leu	9.3	6.2
Thr	2.6	3.9	Phe	3.7	
Ala	7.1		Phe+Tyr	5.3	4.0
Pro	7.1		Lys	0.7	4.3
Tyr	1.6		Trp	-	0.5

-: not determined.

^a: Nutritional value calculated from FAO/WHO (1973).

Table 3: Thermostability of the AI.

Time (min)	Temperature (°C)		
	50	70	94
15	86.7±1.4*	104.6±6.9	107.2±2.9
30	90.3±3.9	103.0±1.6	135.8±4.3
60	92.7±3.0	89.6±9.0	47.6±4.6

* Numbers indicate % inhibition activity compared with the no heated protein ± standard deviations. Samples were heated for 15, 30 and 60 min at the indicated temperature, immediately cooled and the activity determined at 25°C.

Table 4. AI activity measured against amylases from different sources.

Amylase source	Specific Activity (AIU/mg of protein)
Human saliva	24.4±1.2
Human pancreas	-
Swine pancreas	126.4±2.5
<i>F. verticillioides</i>	36.9±7.0
<i>A. obtectus</i>	132.6±1.2
<i>Z. subfasciatus</i>	62.1±0.4
<i>T. castaneum</i>	-
<i>S. cerealela</i>	-
<i>S. zeamais</i>	93.1±1.3
<i>P. truncatus</i>	58.8±1.6
Germinated corn	11.9±1.6
Germinated rice	-
Barley α -amylase	109.7±1.8
Barley β -amylase	-

AIU/mg of protein: means \pm SD; n = 3.

-: no activity detected.

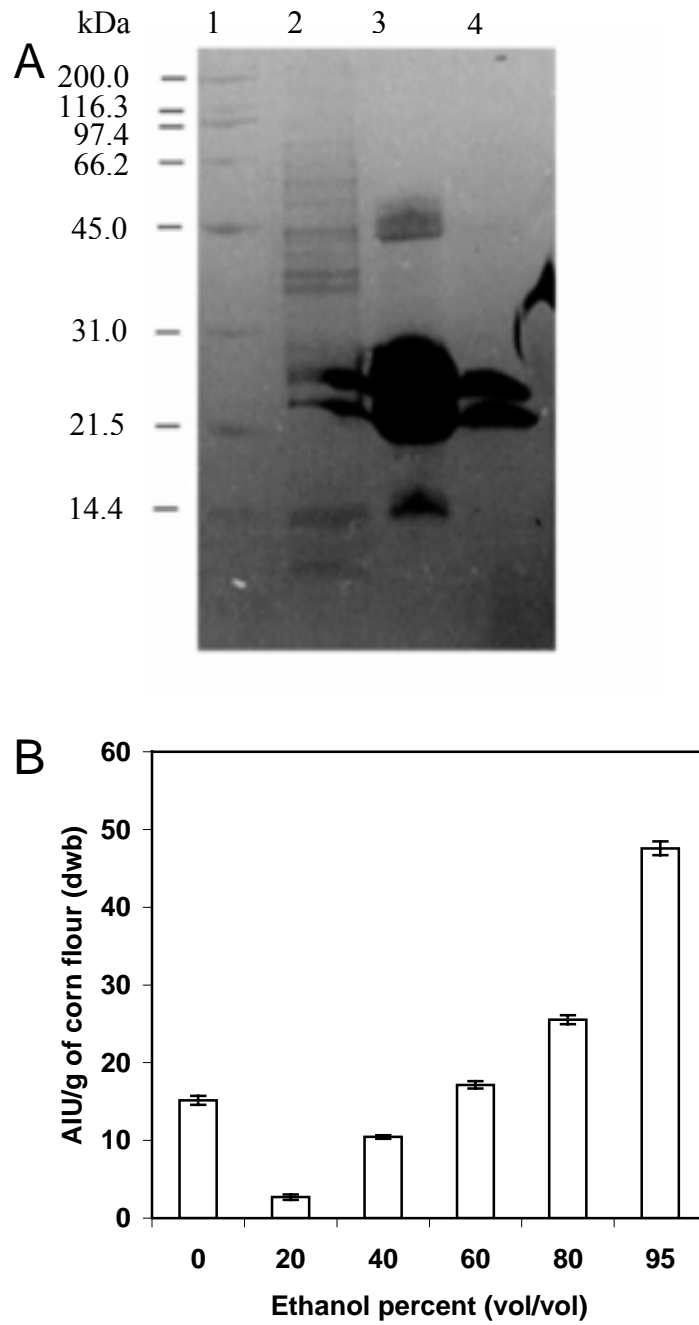


Fig. 1: Extraction of AI using different ethanol concentrations. **(A)** Electrophoresis of extraction products. Lane 1. Molecular weight standards. Lane 2. 0% ethanol: Lane 3. 60% ethanol. Lane 4. 95% ethanol. **(B)** Total AI activity extracted.

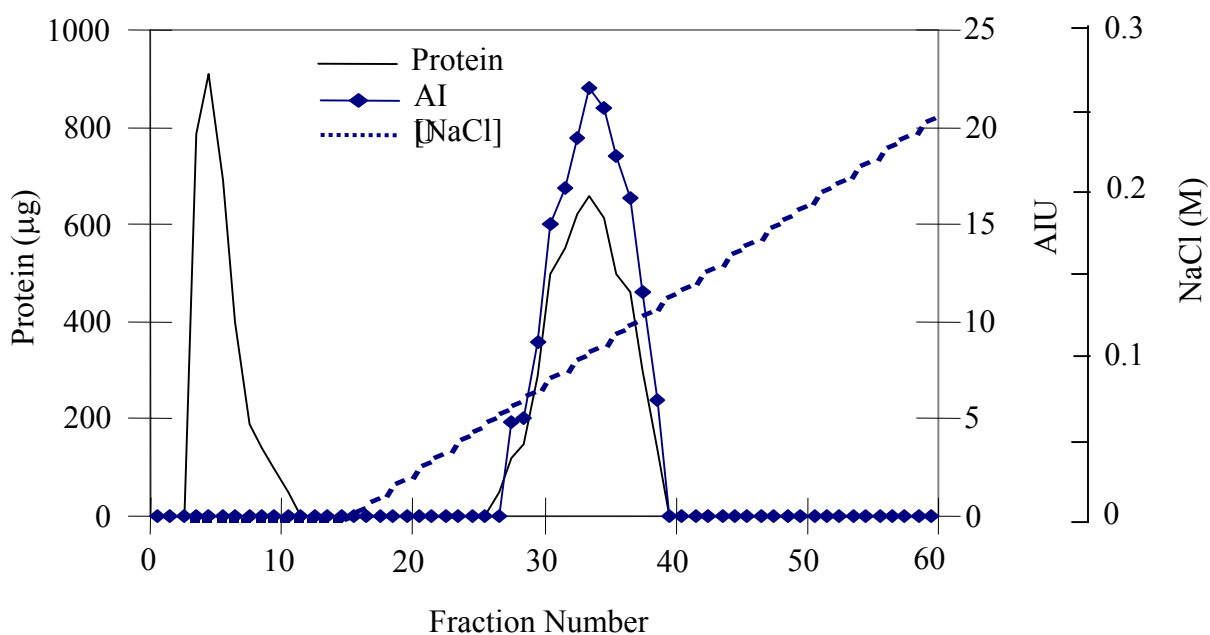


Fig. 2: Ion exchange chromatography on Econo-Pac® cartridge (1.0 x 5.0 cm) of the pellet solubilized with 10 mM ammonium bicarbonate containing 1% Triton X-100 and eluted with a linear gradient of 0 to 0.25 M NaCl in 10 mM ammonium bicarbonate, containing 1% Triton X-100 at a flow rate of 1 ml/min. Total time for elution was 90 min.

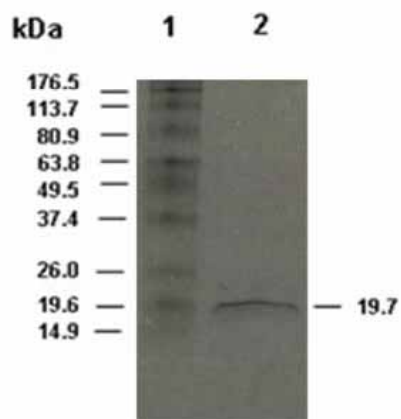


Fig. 3. SDS-PAGE of the AI active peak from ion exchange chromatography. Lane 1: Molecular weight markers. Lane 2: AI.

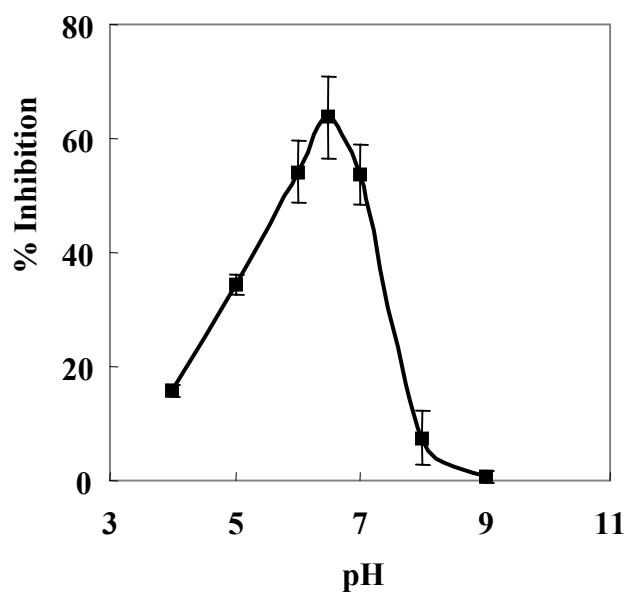


Fig. 4: Effect of pH on AI activity. Purified AI (1.3 μ g) and amylase from *F. verticillioides* (0.2 AU) were used.

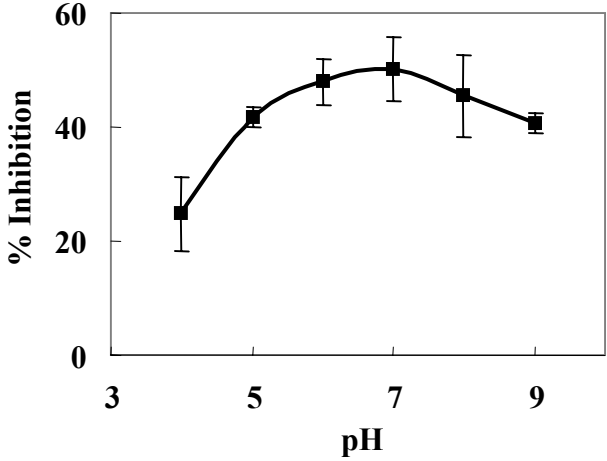


Fig. 5: Effect of pH on the stability of the purified AI. Constant amounts of the inhibitor (1.3 μg) and *F. verticillioides* amylase (0.2 AU) were used. The AI was incubated at 4°C for 16 h at each pH and then activity was measured at pH 6.7.

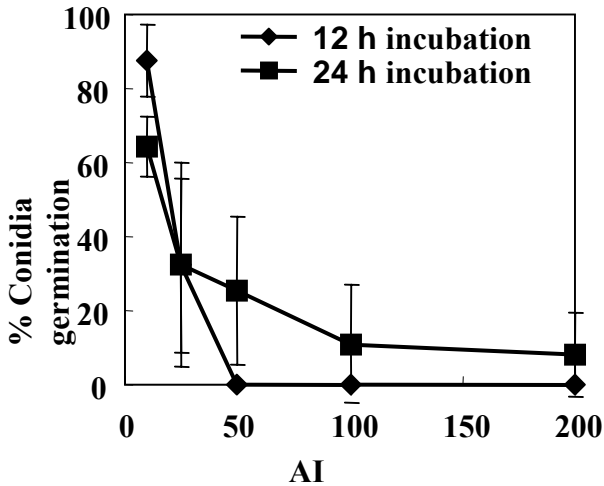


Fig. 6: Conidial germination at different AI concentrations at 25°C. Each test had 1.6×10^6 conidia in a medium composed of 1% starch and 0.13% tryptone.