



Centro de Ciências Exatas

Departamento de Bioquímica e Biotecnologia

Pós-Graduação em Biotecnologia

Discente: Tatiana de Ávila Miguel

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

**Avaliação dos Efeitos de Fertilização
Nitrogenada (Uréia e Uréia com NBPT) e
de Fungicida (Maxim – XL) na Produção de
Fumonisinhas por *Fusarium verticillioides***

Londrina - 2009

TATIANA DE ÁVILA MIGUEL

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**Avaliação dos Efeitos da Fertilização
Nitrogenada (Uréia e Uréia com NBPT) e
do Fungicida Maxim – XL na Produção de
Fumonisinhas por *Fusarium verticillioides***

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

ORIENTADORA:

Prof^a Dr^a Elisabete Yurie Sataque Ono

Londrina - 2009

TATIANA DE ÁVILA MIGUEL

**Avaliação dos Efeitos da Fertilização
Nitrogenada (Uréia e Uréia com NBPT) e
do Fungicida Maxim – XL na Produção de
Fumonisinhas por *Fusarium verticillioides***

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

COMISSÃO EXAMINADORA:

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

Prof Dr Carlos Kemmelmeier
Universidade Estadual de Maringá

Prof^a Dr^a Maria Angélica Ehara Watanabe
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 27 de Fevereiro de 2009

Dedico este trabalho aos meus pais,
amigos e namorado.

“Somos o que fazemos, mas somos,
principalmente, o que fazemos para
mudar o que somos”.

Eduardo Galeano

AGRADECIMENTOS

A Prof^a Dr^a Elisabete Yurie Sataque Ono, pela confiança, auxílio e compreensão.

Ao Fundo Paraná/SETI, a Fundação Araucária, CNPq , PPSUS/Ministério da Saúde e CAPES pelo apoio financeiro e pela concessão de bolsa de mestrado.

As Prof^{as} Dr^{as} Maria Helena P. Fungaro e Maria Angélica Ehara Watanabe, por todo o auxílio despendido e pela oportunidade de trabalho.

Ao Prof. Dr. Hideaki Wilson Takahashi, pela oportunidade de trabalho e pela colaboração.

A Prof^a Dr^a Elisa Yoko Hirooka, pelo auxílio, pela oportunidade de trabalho, apoio financeiro e moral.

Ao Prof. Dr. Édio Vizoni, pelo auxílio despendido na análise estatística dos dados.

A Prof^a Dr^a Célia G. T. J. Andrade, pela atenção, confiança e colaboração.

Aos professores do Programa de Mestrado, pelo auxílio e colaboração em diversos aspectos.

Aos funcionários dos Departamentos de Bioquímica e de Biologia, Nelson J. Rodriguez, Elda J. Aguiar, Sérgio N. Evangelista, por toda atenção e colaboração.

A Roberta Losi – Guembarovisky, Lara M. Ferracin, Daniele Sartori e Ricardo S. Okumura por todo o tempo e conhecimento a mim repassados.

Aos colegas do grupo de pesquisa, Patrícia Sambatti, Dani Luce D. da Silva, Cássia R. Takabayashi, Joice S. dos Santos, Luciana P. Bernd, Angélica T. Ishikawa, Thiago M. Souza, por toda a colaboração, atenção e auxílio.

Aos meus amigos, colegas de curso, de laboratório e estagiários, Elaine C. Moreno, Carolina N. Rossi, Jaqueline G. Bordini, Virgínia Carla A. Falcão, Lúgia Uno Lunardi e Carla Beatriz Fier pelo auxílio, pela força, e alegria que sempre me proporcionam.

Ao grupo de pesquisa do laboratório de microscopia eletrônica, Juca A.B.S. Martin e Osvaldo Capello, pela atenção, auxílio e colaboração.

A todos que colaboraram para a realização deste trabalho.

MIGUEL, Tatiana de Ávila. Avaliação dos Efeitos da Fertilização Nitrogenada (Uréia e Uréia com NBPT) e do Fungicida Maxim – XL na Produção de Fumonisinhas por *Fusarium verticillioides*. 2009. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina - Brasil.

RESUMO

O milho é um cereal de importância econômica mundial, suscetível à contaminação por fungos toxigênicos, dentre os quais *Fusarium verticillioides* predomina. Este fungo é responsável pela produção de fumonisinas, que são relacionadas a diversas micotoxicoses animais e possivelmente câncer esofágico em seres humanos. Devido aos problemas relacionados à presença de *F. verticillioides* e fumonisinas em milho, durante o cultivo empregam-se práticas que visem à minimização da contaminação, como a fertilização com nitrogênio, uma vez que a biossíntese dessas toxinas está relacionada à limitação de nitrogênio, e o emprego de fungicidas para o controle do crescimento de *Fusarium verticillioides*. No presente trabalho foi avaliada, primeiramente, a ocorrência natural de fungos toxigênicos e fumonisinas em amostras de milho recém-colhido da Região Norte do Paraná, tratado com diferentes tipos (uréia e uréia + inibidor de urease) e doses (80, 160 e 240 Kg/ha) de fertilizante nitrogenado. Os gêneros de fungos mais frequentes foram *Fusarium* e *Penicillium* (83,33% e 98,61%, respectivamente), sendo o gênero *Aspergillus* encontrado em baixa frequência (4,17%). As fumonisinas (B₁ e B₂) foram detectadas em 100% das amostras analisadas, sendo que altas concentrações de fumonisinas (19,49 µg/g) foram detectadas no tratamento ao qual não foi aplicado nenhum tipo de fertilizante nitrogenado. Apesar de a diferença na concentração de fumonisinas não ser estatisticamente significativa em relação à dose de nitrogênio aplicada, níveis menores de fumonisinas (3,13 µg/g) foram detectados no tratamento 2 (160 Kg/ha de uréia), e tratamentos com doses maiores ou menores que 160 kg/ha de uréia aumentaram os níveis das micotoxinas. Além disso, foi observada uma correlação negativa entre dosagens de fertilizantes nitrogenados e contaminação por fumonisinas. Os níveis de fumonisinas detectados em relação ao tipo de fertilizante nitrogenado utilizado não apresentaram diferença estatística significativa. Entretanto houve uma tendência de maior contaminação quando uréia + NBPT foi utilizada. Foi também avaliada a influência de Maxim – XL na expressão dos genes *FUM1* e *FUM21*, e na produção de fumonisina B₁ por *F. verticillioides* em meio de cultivo líquido definido. Os cultivos controle (sem fungicida) apresentaram produção média de 0,71 µg/mL de FB₁, equivalente a 31% da produção média dos cultivos com adição de fungicida (2,31 µg/mL). Não foi observada correlação entre a produção de FB₁ e a expressão do gene *FUM1*, e a expressão do gene *FUM21* foi apenas levemente estimulada pela presença do fungicida. Uma vez que não foi observada uma correlação forte entre a expressão dos genes estudados e a produção de FB₁, algumas hipóteses são discutidas a fim de elucidar o resultado detectado. Maxim – XL poderia influenciar na expressão de outros genes da via de biossíntese de fumonisinas, não influenciando diretamente na expressão de *FUM1* e *FUM21*. Em diversos fungos, transportadores celulares do tipo ABC têm sua expressão e/ou atividade aumentada na presença de substâncias tóxicas. *FUM19* codifica para um transportador do tipo ABC, que atua no efluxo de fumonisinas, mas poderia atuar também no efluxo de fungicida, aumentando os níveis da toxina no meio extracelular. Ainda, a ação de fludioxonil sobre MAP quinases, poderia alterar a morfologia celular, o que, combinado à agitação utilizada durante o cultivo de *F. verticillioides*, propiciaria a lise celular e liberação do conteúdo intracelular de fumonisinas, aumentando sua concentração no extrato livre de células. Os resultados apresentados ratificam a importância da fertilização nitrogenada e da compreensão do mecanismo de ação de fungicidas como ferramentas para minimização da ocorrência de fungos toxigênicos e fumonisinas, proporcionando maior segurança alimentar para animais e humanos.

PALAVRAS – CHAVE: *Fusarium verticillioides*, Fumonisin, Fungicida, Fertilizante nitrogenado, Milho.

MIGUEL, Tatiana de Ávila. Evaluation of the Effects of Nitrogen Fertilizer (Urea and Urea + NBPT) and Fungicide Maxim – XL on Fumonisin Production by *Fusarium verticillioides*. 2009. Dissertation (Master in Biotechnology) – State University of Londrina, Londrina - Brazil.

ABSTRACT

Corn is an economically important cereal worldwide, but it is susceptible to toxigenic fungi contamination, mainly *Fusarium verticillioides*. This fungus produces fumonisins, which cause several mycotoxicoses and probably esophageal cancer in humans. Due to the problems caused by *F. verticillioides* and fumonisin contamination in corn, during its cultivation some practices can be employed to reduce the crop contamination, such as nitrogen fertilization, since fumonisin biosynthesis is repressed by nitrogen, and fungicide application to control *Fusarium verticillioides* growth. In this work, natural occurrence of toxigenic fungi and fumonisins was evaluated in freshly harvested corn samples from the Northern Region of Paraná State. The corn kernels were treated with different kinds (urea and urea + urease inhibitor) and doses (80, 160 and 240 Kg/ha) of nitrogen fertilizer. The most frequent fungi genera were *Fusarium* and *Penicillium* (83.33% and 98.61%, respectively). *Aspergillus* sp. was detected in low frequency (4.17%). Fumonisins (B_1 and B_2) were detected in 100% samples, and high levels of fumonisin (19.49 $\mu\text{g/g}$) were detected in the treatment without fertilizer application. Although differences in mean fumonisin levels and nitrogen fertilizer doses were not statistically significant, the lowest fumonisin levels (3.13 $\mu\text{g/g}$) were detected in treatment 2 (160 Kg/ha urea), whereas in the treatments with higher or lower nitrogen doses, fumonisin levels increased. A negative correlation (-0.3780 ; $p < 0.05$) between nitrogen fertilizer doses and total fumonisin levels was observed. There were no statistically significant differences in mean fumonisin levels and nitrogen fertilizer kind. However, highest fumonisin levels were detected in the treatments where urea + NBPT was applied. The influence of Maxim – XL on the expression of *FUM1* and *FUM21* genes, and on the fumonisin B_1 production by *F. verticillioides* in defined liquid culture media were also evaluated. Fungicide addition to the culture media increased fumonisin B_1 production by 3 – fold (2.31 $\mu\text{g/mL}$) compared to the control cultures (without fungicide addition). There was no correlation between fumonisin B_1 (FB_1) and the expression of *FUM1*, while *FUM21* expression was only slightly increased in the presence of fungicide. Taking into account that a strong correlation between fungicide presence, gene expression, and FB_1 levels was not observed, some hypothesis are discussed to explain the results. First, Maxim – XL could influence the expression of other genes related to fumonisin biosynthesis. In several fungi, ABC cellular transporters have their expression and/or activity increased in the presence of toxic compounds. *FUM19* encodes an ABC transporter, which is responsible for the fumonisin efflux, but it could also be responsible for the fungicide efflux, increasing the extracellular fumonisin levels. Also, the action of the fungicide over MAP kinases could induce alterations in the cell morphology, which, in combination with the agitation used during cultivation, would lead to cellular lyses, increasing the fumonisin concentration in the cell free extract. These results presented ratify the importance of understanding nitrogen fertilization and fungicide mode of action as tools for reducing fumonisin occurrence in corn kernels, and assure food quality for both animals and humans.

KEY WORDS: *Fusarium verticillioides*, Fumonisins, Fungicide, Nitrogen fertilizer, Corn kernels.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. OBJETIVO GERAL.....	3
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1. CULTURA DO MILHO	4
3.2. <i>FUSARIUM VERTICILLIOIDES</i>	6
3.3. FUMONISINAS	8
3.4. MECANISMO DE AÇÃO DAS FUMONISINAS E MICOTOXICOSES.....	11
3.5. BIOSÍNTESE DE FUMONISINAS EM <i>FUSARIUM VERTICILLIOIDES</i>	14
3.5.1. Origem dos Componentes das Moléculas de Fumonisinas	14
3.5.2. Via de Biossíntese de Fumonisinas.....	16
3.5.3. Regulação da Biossíntese de Fumonisinas	23
3.6. MEDIDAS DE CONTROLE E MINIMIZAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE <i>FUSARIUM VERTICILLIOIDES</i> E FUMONISINAS EM GRÃOS DE MILHO	25
3.6.1. Fertilização Nitrogenada.....	26
3.6.2. Fungicidas.....	29
4. MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO DA FERTILIZAÇÃO NITROGENADA SOBRE A CONTAMINAÇÃO DE MILHO POR FUNGOS E FUMONISINAS.....	32
4.1.1. Caracterização da Área Experimental	33
4.1.2. Sistema de Plantio e Fertilização Nitrogenada	33
4.1.3. Avaliação da Microbiota Fúngica.....	34
4.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL PARA EXPERIMENTOS COM FUNGICIDA	35
4.2.1. Cepa de <i>Fusarium verticillioides</i>	36
4.2.2. Cultivo de <i>Fusarium verticillioides</i>	36
4.2.3. Extração e Purificação de RNA	37

4.2.4. Análise de Pureza e Quantificação de RNA	37
4.2.5. Síntese de DNA Complementar	38
4.2.6. Primers.....	38
4.2.7. PCR em Tempo Real	39
4.3. DETERMINAÇÃO DE FUMONISINAS.....	40
4.3.1. Extração de Fumonisinas	40
4.3.2. Quantificação de Fumonisinas	41
4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA FERTILIZAÇÃO NITROGENADA (URÉIA E URÉIA + NBPT) NA CONTAMINAÇÃO DE MILHO POR FUNGOS E FUMONISINAS.....	43
<i>Resumo</i>	<i>43</i>
<i>Introdução.....</i>	<i>44</i>
<i>Material e Métodos.....</i>	<i>46</i>
<i>Caracterização da área experimental</i>	<i>46</i>
<i>Sistema de Plantio e Fertilização Nitrogenada</i>	<i>46</i>
<i>Amostragem.....</i>	<i>47</i>
<i>Avaliação da microbiota fúngica</i>	<i>47</i>
<i>Determinação de Fumonisinas</i>	<i>47</i>
<i>Análise Estatística</i>	<i>48</i>
<i>Resultados e discussão</i>	<i>49</i>
<i>Agradecimentos</i>	<i>52</i>
<i>Referências.....</i>	<i>53</i>
<i>Figures Captions.....</i>	<i>58</i>
<i>Figura 1.....</i>	<i>59</i>
<i>Figura 2.....</i>	<i>60</i>
<i>Figura 3.....</i>	<i>61</i>

<i>Figura 4</i>	62
<i>Tabela 1 – Fontes e doses de fertilizante nitrogenado</i>	63
<i>Tabela 2 – Perfil de contagem, frequência absoluta e relativa de Fusarium spp., Aspergillus spp. e Penicillium spp. em amostras de milho submetido a diferentes tratamentos com fertilização nitrogenada na região norte do Paraná</i>	64
<i>Tabela 3 – Níveis médios de fumonisinas em amostras de milho cultivadas no norte do Paraná de acordo com as doses e fontes de fertilização nitrogenada utilizadas nos tratamentos</i>	65
AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO FUNGICIDA MAXIM – XL NA EXPRESSÃO GÊNICA E NA PRODUÇÃO DE FUMONISINA B₁ POR <i>FUSARIUM VERTICILLIOIDES</i>	66
<i>Resumo</i>	66
<i>Introdução</i>	67
<i>Material e Métodos</i>	69
<i>Cepa de Fusarium verticillioides</i>	69
<i>Cultivo de Fusarium verticillioides</i>	70
<i>Extração e Purificação de RNA</i>	70
<i>Análise de Pureza e Quantificação de RNA</i>	71
<i>Síntese de DNA Complementar</i>	71
<i>Primers</i>	72
<i>PCR em Tempo Real</i>	73
<i>Extração de Fumonisinas</i>	73
<i>Determinação de Fumonisinas</i>	74
<i>Análise Estatística</i>	74
<i>Resultados e Discussão</i>	75
<i>Agradecimentos</i>	78
<i>Referências</i>	79
<i>Tabela 1 – Produção de FB₁ por F. verticillioides em meio líquido definido na presença e na ausência de fungicida Maxim – XL</i>	84
<i>Tabela 2 – Análise quantitativa da expressão do RNA mensageiro para os genes FUM1 e FUM21</i>	85

6. CONCLUSÕES	86
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87
ANEXO 1 – Parcelas dos Experimentos com Milho.....	100
ANEXO 2 – Tratamentos dos Experimentos com Milho.....	101
ANEXO 3 – Avaliação da Microbiota Fúngica.....	102
ANEXO 4 – Extração de Fumonisinhas	103
ANEXO 5 – Gel de cDNA e Teste de <i>Primers</i> para o Gene <i>TUB2</i>	104
ANEXO 6 – Curvas de <i>Melting</i> dos Experimentos de PCR em Tempo Real para o Gene <i>FUM21</i>	105
ANEXO 7 – Curvas de <i>Melting</i> dos Experimentos de PCR em Tempo Real para o Gene <i>FUM1</i>	106
ANEXO 8 – Instruções Normativas da <i>Food Additives and Contaminants</i>	107

1. INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é um cereal de importância econômica mundial, uma vez que é utilizado como insumo na produção de mais de 500 produtos

derivados, sendo que a suinocultura e avicultura são responsáveis pelo consumo de cerca de 70% do milho produzido no mundo (DUARTE *et al.*, 2006).

A produção anual média de milho é de 500 milhões de toneladas, sendo os maiores produtores os Estados Unidos, China e Brasil que, em 2005, produziram 280,2; 131,1; e 35,9 milhões de toneladas, respectivamente (Companhia Nacional de Abastecimento – CONAB, 2007).

Devido à alta qualidade nutricional, o milho é suscetível ao ataque por diversos insetos e à deterioração por fungos toxigênicos, principalmente *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. e *Aspergillus* spp. *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg é a espécie predominante, e apresenta ampla distribuição geográfica, sendo considerado um fungo endêmico nos grãos de milho (SWEENEY e DOBSON, 1998; MARASAS *et al.*, 1984; MUNKVOLD e DESJARDINS, 1997; WEIDENBÖRNER, 2001).

Esse fungo é o principal produtor de um grupo de micotoxinas denominadas fumonisinas. Embora existam 28 análogos de fumonisinas identificados e caracterizados, a fumonisina B₁ (FB₁) constitui o tipo encontrado em maiores concentrações em milho e derivados (MARASAS, 2001; RHEEDER *et al.*, 2002).

A FB₁ causa leucoencefalomalácia em eqüinos (WILSON *et al.*, 1985; MARASAS *et al.*, 1988), edema pulmonar em suínos (HARRISON *et al.*, 1990), câncer de fígado e esôfago em ratos (GELDERBLOM *et al.*, 1996), efeitos hepatotóxicos, diarreia, perda de peso e desenvolvimento reduzido em aves (LEDOUX *et al.*, 1992; WEIBKING *et al.*, 1993) e possivelmente câncer esofágico (GELDERBLOM *et al.*, 1996, 1992; THIEL *et al.*, 1992; MARASAS, 1995; YANG, 1980; CHU e LI, 1994) e hepático (SUN *et al.*, 2007) em humanos.

Os genes responsáveis pela biossíntese de fumonisinas encontram-se em um *cluster*, onde o gene *FUM1* codifica para uma policetídeo sintase, que catalisa a primeira reação para a formação das fumonisinas. Dentro do *cluster* apenas um dos genes, *FUM21*, desempenha um papel regulador (PROCTOR *et al.*, 1999; BROWN *et al.*, 2007).

Além dos riscos à saúde humana e animal, a ocorrência natural de fumonisinas causa prejuízos econômicos, portanto, durante o cultivo de milho

são empregadas práticas que visem à minimização da contaminação. A fertilização nitrogenada, que é importante para aumentar a produtividade dos grãos de milho, pode ser uma alternativa para minimizar a ocorrência de fumonisinas, uma vez que a biossíntese dessas toxinas está relacionada à limitação de nitrogênio. Diversos estudos demonstram que as concentrações e fontes de nitrogênio exercem influência sobre a síntese de micotoxinas, incluindo fumonisinas por *F. verticillioides* (BLANDINO *et al.*, 2008; HASSEGAWA *et al.*, 2008).

Fungicidas são também amplamente utilizados para o controle do crescimento de *Fusarium verticillioides* em milho, podendo-se citar o produto Maxim – XL (Syngenta), cujos princípios ativos são fludioxonil e metalaxyl – M. Alguns estudos, entretanto, indicam que determinados fungicidas podem aumentar a produção de micotoxinas por fungos presentes em grãos, apesar de promover o controle do seu crescimento (MUSS e FRANK, 1985; DRAUGHTON e CHURCHVILLE, 1985; MATTHIES e BUCHENAUER, 1996; DOOHAN *et al.*, 1999).

Considerando que existem poucos estudos sobre a regulação da biossíntese de fumonisinas, e a influência de fatores externos como a presença de fungicidas e fertilização nitrogenada sobre a mesma, o presente estudo visa uma melhor compreensão desses aspectos, fornecendo assim subsídios para o controle e minimização da contaminação por fumonisinas em milho.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a influência da fertilização nitrogenada na contaminação natural de milho por fungos e fumonisinas.

Avaliar a influência de fungicidas na expressão de genes envolvidos com a biossíntese de fumonisinas e na produção da micotoxina.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a influência de diferentes doses de fertilizante nitrogenado na contaminação de milho por fungos e fumonisinas.
- Avaliar a influência de diferentes fontes de fertilização nitrogenada (uréia e uréia + NBPT) na contaminação de milho por fungos e fumonisinas.
- Avaliar a influência do fungicida Maxim XL (Syngenta) na expressão dos genes *FUM1* e *FUM21* de *Fusarium verticillioides* (linhagem 103F).
- Avaliar o efeito do fungicida Maxim XL (Syngenta) sobre a produção de fumonisina B₁ por *Fusarium verticillioides* (linhagem 103F).

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Cultura do Milho

O milho (*Zea mays* L.) é uma monocotiledônea pertencente à família das gramíneas (Poaceae). É originário de Guilá Naquitz, Estado de Oaxaca, no México, onde começou a ser domesticado há cerca de 5 a 10 mil anos. Posteriormente, passou a ser cultivado em outras localidades no México e sudoeste dos Estados Unidos, difundindo-se para toda a América e, alguns anos depois, para outros continentes (WANG *et al.*, 1999; SMITH, 2001; PIPERINO e FLANNERY, 2001).

Devido a grande importância econômica do milho no mundo, pesquisadores procuram desenvolver cultivares que suportem as mais diversas condições climáticas. Por este motivo, o milho apresenta grande facilidade de adaptação, podendo ser cultivado tanto em regiões de clima tropical quanto em locais de clima temperado, sendo este um dos motivos pelo qual é um dos cereais mais cultivados no mundo (MAGALHÃES *et al.*, 2003).

Além disso, a qualidade nutricional dos grãos de milho, ricos em carboidratos (71,7% base seca), proteínas (9,5% base seca) e lipídios (4,3% base seca), tornaram-no um alimento básico em diversos países das Américas, África e Ásia, sendo utilizado como ingrediente de mais de 500 produtos alimentícios, destinados à alimentação humana e animal. Como exemplos, citam-se a silagem, ração animal, farinhas e fubás, amido, xarope de glucose, maltodextrinas, pipoca, pães, bolos, canjica, bebidas alcoólicas e não – alcoólicas (MUNKVOLD e DESJARDINS, 1997; WIEDENBÖRNER, 2001).

Deve-se ressaltar que, apesar de ser amplamente utilizado para alimentação humana e animal em geral, a suinocultura e a avicultura são responsáveis pelo consumo de cerca de 70% do milho produzido mundialmente (DUARTE *et al.*, 2006).

Devido à qualidade nutricional, facilidade de adaptação e aplicabilidade, o milho constitui um cereal de importância econômica mundial. A produção anual média é de aproximadamente 500 milhões de toneladas, sendo o maior produtor mundial os Estados Unidos, seguido da China e Brasil. Em 2005, estes países produziram 280,2; 131,1; e 34,9 milhões de toneladas, respectivamente. A produção nacional em 2006 foi aproximadamente de 42,6 milhões de toneladas, e no ano de 2007 de 51,4 milhões de toneladas. Estes dados refletem um incremento da área plantada no Brasil e, conseqüentemente, um aumento na produção e consumo interno do milho

(Companhia Nacional de Abastecimento – CONAB, 2007; DUARTE *et al.*, 2006).

Este incremento vem sendo observado desde 1970, em face de fatores como o crescimento das indústrias de rações e das atividades de criação (suinocultura, avicultura e pecuária), e tende a continuar ocorrendo, uma vez que a produção nacional não supre a demanda interna, que é, ainda, crescente (MAGALHÃES *et al.*, 2003; DUARTE *et al.*, 2006).

No Brasil, o milho é cultivado em todo o território nacional, mas o maior produtor é o Estado do Paraná, responsável por 22 a 24% da produção de milho no país, dependendo do ano (Companhia Nacional de Abastecimento – CONAB, 2007).

As características nutricionais do milho tornam-no suscetível ao ataque por diversos insetos e à deterioração por fungos e outros microrganismos. A presença de microrganismos nos grãos de milho, em especial de fungos toxigênicos, acarreta perdas econômicas e riscos à saúde humana e animal, uma vez que metabólitos tóxicos podem ser produzidos. No Brasil, os principais fungos encontrados no milho são *Fusarium* spp. e *Cephalosporium* spp. em campo, e *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp., em condições de armazenamento (SWEENEY e DOBSON, 1998; MARASAS *et al.*, 1984; MUNKVOLD e DESJARDINS, 1997; WEIDENBÖRNER, 2001).

Dentre estes fungos, *Fusarium verticillioides* é endêmico dos grãos de milho, além de apresentar ampla distribuição geográfica. Em diversos levantamentos realizados em outros países foi constatada a presença deste fungo em grãos de milho, sendo estimado que cerca de 90% de todo o milho do mundo apresenta alguma fitopatologia e/ou contaminação relacionada à presença de *F. verticillioides* (BACON e NELSON, 1994; MILLER *et al.*, 1995).

3.2. *Fusarium verticillioides*

Fusarium verticillioides Sacc. Nirenberg (anteriormente denominado *F. moniliforme* Sheldon) foi primeiramente descrito em 1904, associado a doenças

em animais. É um fungo imperfeito, caracterizando a fase anamórfica de *Gibberella fujikuroi*, pertencente à seção *Liseola*, mais especificamente à população A do complexo *Gibberella fujikuroi*. (DESJARDINS *et al.*, 1995; MUNKVOLD e DESJARDINS, 1997).

Trata-se de um fungo comumente encontrado em plantas, em especial no milho, para o qual é endêmico, sendo, de fato, considerado como um dos principais patógenos associado a culturas deste vegetal (NELSON *et al.*, 1994; DESJARDINS *et al.*, 1995).

F. verticillioides é responsável por fitopatologias em todos os estágios de desenvolvimento de milho, podendo causar podridão de colmo, raiz e espiga (Figura 1), além de deterioração de grãos armazenados, acarretando perdas econômicas para produtores (MUNKVOLD e DESJARDINS, 1997; MUNKVOLD *et al.*, 1997).



Figura 1 – Fitopatologias do Milho Causadas por *F. verticillioides* . À esquerda, podridão de espiga moderada (A) e severa (B); à direita, podridão de raiz e colmo (C).

Fonte: MUNKVOLD e DESJARDINS, 1997.

Este patógeno é um fungo de solo, capaz de sobreviver nos restos de cultura, podendo reiniciar seu ciclo de infecção na próxima geração de cultivo. É também freqüentemente encontrado associado às sementes de milho, que se encontram, portanto, já contaminadas antes mesmo do crescimento do vegetal. Acompanhando o desenvolvimento da planta, ocorre a contaminação sistêmica do vegetal, atingindo especialmente o colmo, a raiz e as espigas de milho (MUNKVOLD e DESJARDINS, 1997; MUNKVOLD *et al.*, 1997).

A infecção pode também ocorrer por meio da disseminação de macro e microconídios pelo ar e/ou gotículas de chuva. Neste caso, o ponto de inserção do fungo na planta é geralmente o estigma. Além disso, insetos podem atuar como vetores de transmissão, ou ainda, provocar injúrias na planta, propiciando a infecção por *F. verticillioides* (MUNKVOLD e DESJARDINS, 1997; MUNKVOLD *et al.*, 1997).

A infecção pode apresentar-se também assintomática. O maior problema deste tipo de infecção são as micotoxinas, denominadas fumonisinas, que *F. verticillioides* produz, contaminando o milho. A alta incidência dessas micotoxinas é freqüente no Brasil (HIROOKA *et al.* 1996, ONO *et al.* 2000; KAWASHIMA e SOARES, 2006), e uma vez que as fumonisinas causam micotoxicoses em animais e provavelmente câncer em seres humanos, a infecção assintomática dos grãos de milho por *F. verticillioides* constitui um perigo oculto, colocando em risco a saúde animal e humana (NELSON *et al.*, 1994; MUNKVOLD e DESJARDINS, 1997; MUNKVOLD *et al.*, 1997).

Ressalta-se, entretanto, que este fungo não é o único produtor de fumonisinas. Quinze outras espécies do gênero *Fusarium*, e *Alternaria alternata* são também produtores de fumonisinas, mas as espécies reconhecidas como principais produtoras são *F. verticillioides* e *F. proliferatum*, sendo que a primeira prevalece em culturas de milho e sorgo (RHEEDER *et al.*, 2002).

A importância de *F. verticillioides* na produção de fumonisinas em grãos de milho reside no fato de que produzem níveis mais elevados desta toxina, além de apresentarem ampla distribuição geográfica, ocorrência freqüente em milho (atingindo mais de 90% do milho produzido no mundo) e serem associadas a micotoxicoses (RHEEDER *et al.*, 2002; LINO *et al.*, 2004).

3.3. Fumonisinas

As fumonisinas são micotoxinas, produtos do metabolismo secundário de algumas espécies de *Fusarium* e *Alternaria alternata* (MARASAS, 2001;

RHEEDER *et al.*, 2002). Foram primeiramente isoladas de culturas de *F. verticillioides*, linhagem MRC 826, na África do Sul por GELDERBLOM *et al.* (1988). No mesmo ano, estas micotoxinas tiveram sua estrutura elucidada, por BEZUIDENHOUT *et al.*, sendo originalmente identificadas as fumonisinas A₁, A₂, B₁ e B₂, por meio de ressonância magnética nuclear e espectrometria de massas.

As fumonisinas são moléculas fortemente polares, solúveis em água, metanol e em acetonitrila – água, e insolúveis em solventes orgânicos (SCOTT, 1993).

Quimicamente, as fumonisinas são moléculas estruturalmente relacionadas, caracterizadas por uma cadeia linear de 20 átomos de carbono, com grupos metil unidos aos carbonos 12, 16 e 20, e um grupo hidroxila junto ao carbono 3. Sete radicais encontram-se distribuídos na molécula, sendo as fumonisinas classificadas de acordo com os radicais que formam o composto (SEO e LEE, 1998; RHEEDER *et al.*, 2002).

A Figura 2 ilustra a estrutura básica das fumonisinas, e a Tabela 1 mostra uma lista dos análogos caracterizados, assim como os radicais de cada molécula.

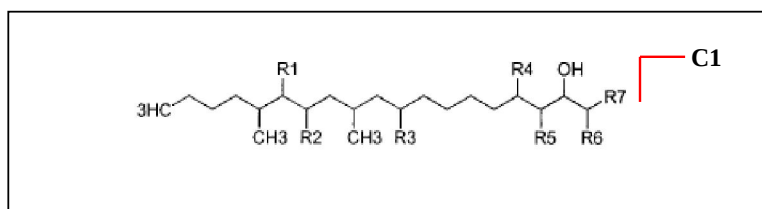


Figura 2 – Estrutura Básica das Fumonisinias. O carbono 1 (C1) está indicado à direita.

Fonte: RHEEDER *et al.*, 2002.

Tabela 1 – Análogos de Fumonisinias

Cadeias laterais (radicais)

Análogo	Side						
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇
FA ₁	TCA	TCA	OH	OH	H	NHCOCH ₃	CH ₃
FA ₂	TCA	TCA	H	OH	H	NHCOCH ₃	CH ₃
FA ₃	TCA	TCA	OH	H	H	NHCOCH ₃	CH ₃
PHFA _{3a}	TCA	OH	OH	H	H	NHCOCH ₃	CH ₃
PHFA _{3b}	OH	TCA	OH	H	H	NHCOCH ₃	CH ₃
HFA ₃	OH	OH	OH	H	H	NHCOCH ₃	CH ₃
FAK ₁	=O	TCA	OH	OH	H	NHCOCH ₃	CH ₃
FBK ₁	=O	TCA	OH	OH	H	NH ₂	CH ₃
FB ₁	TCA	TCA	OH	OH	H	NH ₂	CH ₃
Iso-FB ₁	TCA	TCA	OH	H	OH	NH ₂	CH ₃
PHFB _{1a}	TCA	OH	OH	OH	H	NH ₂	CH ₃
PHFB _{1b}	OH	TCA	OH	OH	H	NH ₂	CH ₃
HFB ₁	OH	OH	OH	OH	H	NH ₂	CH ₃
FB ₂	TCA	TCA	H	OH	H	NH ₂	CH ₃
FB ₃	TCA	TCA	OH	H	H	NH ₂	CH ₃
FB ₄	TCA	TCA	H	H	H	NH ₂	CH ₃
FB ₅ ^c							
FC ₁	TCA	TCA	OH	OH	H	NH ₂	H
N-acetyl-FC ₁	TCA	TCA	OH	OH	H	NHCOCH ₃	H
Iso-FC ₁	TCA	TCA	OH	H	OH	NH ₂	H
N-acetyl-Iso-FC ₁	TCA	TCA	OH	H	OH	NHCOCH ₃	H
OH-FC ₁	TCA	TCA	OH	OH	OH	NH ₂	H
N-acetyl-OH-FC ₁	TCA	TCA	OH	OH	OH	NHCOCH ₃	H
FC ₂	TCA	TCA	OH	H	H	NH ₂	H
FC ₄	TCA	TCA	H	H	H	NH ₂	H
FP ₁	TCA	TCA	OH	OH	H	3HP	CH ₃
FP ₂	TCA	TCA	H	OH	H	3HP	CH ₃
FP ₃	TCA	TCA	OH	H	H	3HP	CH ₃

* TCA = Ácido tricarbálico.

Fonte: RHEEDER *et al.*, 2002.

Conforme pode ser observado na Tabela 1, já foram descritos 28 análogos de fumonisinas (RHEEDER *et al.*, 2002). Ressalta-se, entretanto, que como a molécula de fumonisina B₁ apresenta 10 centros quirais, as estimativas estatístico-químicas ($2^n = X$, onde n representa o número de centros quirais) apontam a possibilidade de existência de 1024 isômeros (APSÍMON *et al.*, 1994).

Os análogos de fumonisinas descritos são agrupados basicamente em quatro grupos distintos: séries A, B, C e P (SEO e LEE, 1998).

As fumonisinas B₁, B₂, A₁ e A₂ tiveram sua estrutura elucidada, conforme mencionado anteriormente, em 1988, por BEZUIDENHOUT *et al.* As fumonisinas B₃ e B₄ e seus produtos de hidrólise (série HB) foram caracterizadas por CAWOOD *et al.* (1991), as da série C por BRANHAM & PLATTNER (1993b), e as da série P por MUSSER *et al.* (1996).

Dentre todos os análogos de fumonisina, alguns das séries A, B e C já foram encontrados contaminando naturalmente milho e produtos à base de milho (SEO e LEE, 1998; RHEEDER *et al.*, 2002).

Entretanto, os da série B são considerados como os mais relevantes, uma vez que são os mais abundantes e encontrados em condições naturais. A

fumonisin B₁ (FB₁) compreende de 70 a 80% do total de fumonisinas, enquanto fumonisinas B₂ (FB₂) e B₃ (FB₃) constituem de 15 a 25% e 3 a 8% do total produzido, respectivamente. Outros análogos podem ocorrer naturalmente, porém em concentrações menores de 5% do total (RHEEDER *et al.*, 2002).

As fumonisinas da série B apresentam também 20 átomos de carbono, com um grupo amino unido ao carbono 2, dois ácidos tricarbóxicos (ácido tricarbálico) esterificados nos carbonos 14 e 15 e com grupos hidroxila em posição e número variável, de acordo com o análogo (SEO e LEE, 1998). A Figura 3 ilustra a estrutura química dos análogos da série B.

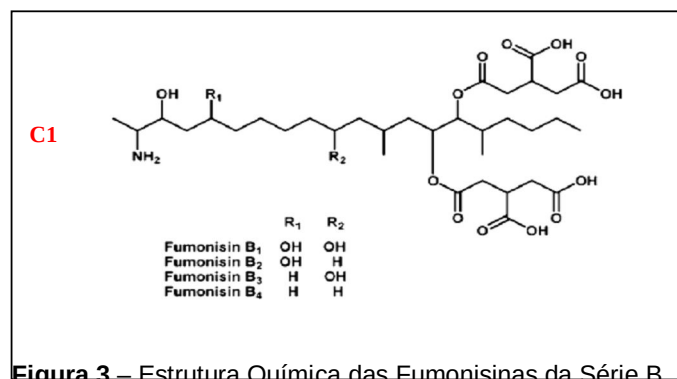


Figura 3 – Estrutura Química das Fumonisininas da Série B.

Fonte: PROCTOR *et al.* (2006).

As fumonisinas, em especial FB₁, são toxinas bastante abundantes em milho e derivados, representando riscos à saúde animal e humana (NELSON *et al.*, 1993; PROCTOR *et al.*, 2006; NELSON *et al.*, 1994).

3.4. Mecanismo de Ação das Fumonisininas e Micotoxicoses

As fumonisinas são associadas a diversas micotoxicoses animais, como leucoencefalomalácia em eqüinos (WILSON *et al.*, 1985; MARASAS *et al.*, 1988), edema pulmonar em suínos (HARRISON *et al.*, 1990), efeitos hepatotóxicos, diarreia, perda de peso e desenvolvimento reduzido em aves

(LEDOUX *et al.*, 1992; WEIBKING *et al.*, 1993). Além disso, apresentam efeito indutor de câncer hepático, esofágico e renal em ratos e camundongos (GELDERBLOM *et al.*, 1996). Em humanos, estudos epidemiológicos realizados nas regiões de Transkei na África do Sul (GELDERBLOM *et al.*, 1996, 1992; THIEL *et al.*, 1992; MARASAS, 1995), Linxian, na China (YANG, 1980; CHU e LI, 1994) e Huaian, Fusui e Huantai na China (SUN *et al.*, 2007), sugerem que as fumonisinas são possivelmente indutoras de câncer esofágico e hepático, sendo avaliadas pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC) como carcinógenos do grupo 2B, i.e., provavelmente carcinogênico para humanos.

Algumas hipóteses foram sugeridas para explicar o mecanismo de ação pelo qual as fumonisinas causam os efeitos tóxicos. Atualmente, o modelo mais aceito foi proposto por WANG *et al.* (1991), e tem como base a semelhança estrutural entre fumonisinas e esfingolípídios precursores, esfingosina e esfinganina (Figura 4).

As fumonisinas bloqueiam o metabolismo de esfingolípídios, impedindo a biossíntese de esfingolípídios complexos. Neste sentido, essas micotoxinas, por apresentarem estrutura semelhante à esfinganina e à esfingosina, competem pelo sítio da enzima ceramida sintetase (sinônimos: esfingosina ou esfinganina *N* – aciltransferase), responsável por converter os precursores esfingóides em *N* – acil derivados, posteriormente utilizados para a biossíntese de esfingolípídios mais complexos. Como consequência, ocorre aumento na concentração desses precursores, e diminuição da concentração de esfingolípídios mais complexos que seriam formados (WANG *et al.*, 1991; RILEY *et al.*, 1993; WANG *et al.*, 1992).

A Figura 5 ilustra o mecanismo de ação das fumonisinas sobre a biossíntese de esfingolípídios complexos.

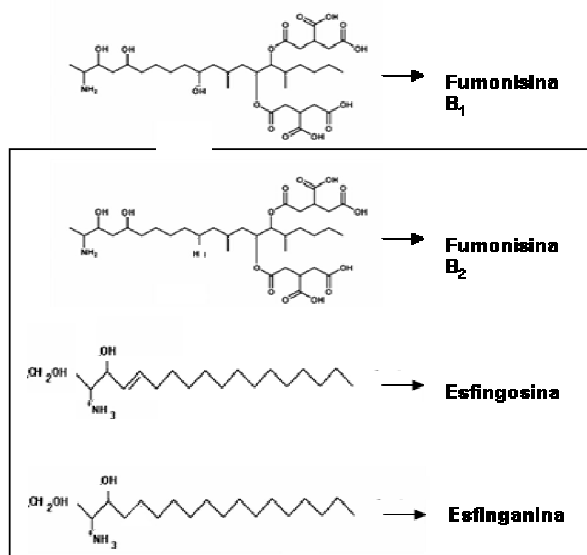


Figura 4 – Semelhança Estrutural entre Fumonisinás, Esfingosina e Esfinganina.

Fonte: WANG *et al.* (1992).

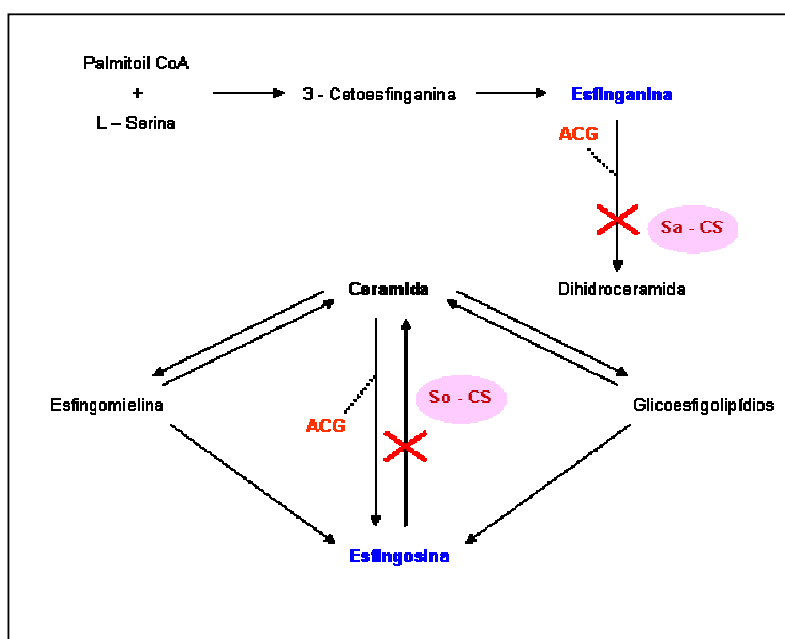


Figura 5 – Mecanismo de Ação das Fumonisinás.

Fonte: NORRED (1993); LINO *et al.* (2004).

Os esfingolípídios são constituintes de membranas celulares, e participam da regulação do ciclo e comunicação celular, do controle de proteínas de membrana, dentre outras funções (MERRIL, 1991).

Além disso, os precursores esfingóides constituem a cadeia carbônica base para a síntese de esfingomielina, cerebrosídeos, sulfatídeos, gangliosídeos e outros esfingolipídios complexos importantes (MERRIL, 1991; WANG *et al.*, 1991; RILEY *et al.*, 1993).

Esfingolipídios são, portanto, moléculas bastante bioativas, e um bloqueio em sua via biossintética pode acarretar disfunção de todo o metabolismo celular, o que explica a toxicidade observada nas células e tecidos contaminados com fumonisinas (WANG *et al.*, 1991; RILEY *et al.*, 1993; ABADO-BECOGNÉE *et al.*, 1998; MERRIL, 1991).

As fumonisinas são encontradas em milho e derivados por todo o mundo, constituindo um risco eminente à saúde animal e humana. Por este motivo, muitos estudos procuram esclarecer as características químicas, mecanismo de ação, genes relacionados e biossíntese das fumonisinas, a fim de obter uma melhor compreensão e, conseqüentemente, subsídios para o desenvolvimento de métodos mais adequados para a minimização da contaminação por fumonisinas (BROWN *et al.*, 2006).

Neste sentido, a compreensão da biossíntese das fumonisinas e dos genes relacionados, assim como sua regulação, é primordial para o desenvolvimento de novos métodos que visem limitar a contaminação vegetal, humana e animal por fumonisinas (BROWN *et al.*, 2006).

3.5. Biossíntese de Fumonisinas em *Fusarium verticillioides*

3.5.1. Origem dos Componentes das Moléculas de Fumonisinas

A biossíntese de fumonisinas ocorre durante o metabolismo secundário dos fungos produtores da micotoxina, que se inicia no final da fase exponencial de crescimento. As fumonisinas são sintetizadas pela via das policetidas, que é iniciada com moléculas de acetil – CoA provenientes do catabolismo de macromoléculas essenciais (GRIFFIN, 1994), conforme mostra a Figura 6.

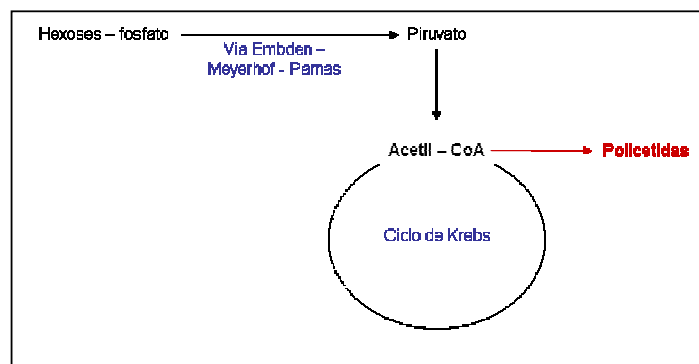


Figura 6 - Via das Policetidas.

Fonte: Adaptado de GRIFFIN (1994).

Alguns estudos sobre a biossíntese de fumonisinas procuraram elucidar a origem dos componentes da molécula da toxina (BOJJA *et al.*, 2004; BRANHAM e PLATTNER, 1993a; CALDAS *et al.*, 1998; BLACKWELL *et al.*, 1996; PLATTNER e SHACKELFORD, 1992).

BOJJA *et al.* (2004) demonstraram que a cadeia carbônica das fumonisinas é originada a partir de um policetídeo com 18 carbonos, que seria complexado a um aminoácido para originar a cadeia com 20 átomos de carbono.

Primeiramente, foi observado que os carbonos de 3 a 20 da cadeia das fumonisinas são derivados do acetato (BRANHAM e PLATTNER, 1993a; BLACKWELL *et al.*, 1996).

A fim de esclarecer a origem dos carbonos 1 e 2, pesquisas foram realizadas com base na semelhança estrutural entre fumonisinas e esfingosina, sendo levantada a hipótese de incorporação da alanina durante os primeiros passos da biossíntese de FB₁, o que seria análogo ao primeiro passo da via

dos esfingolipídeos, onde ocorre condensação entre serina e palmitoil-CoA para a formação de 3-ceto esfinganina, catalisada pela enzima serina palmitoiltransferase (BRANHAM e PLATTNER, 1993a).

Alanina marcada com isótopo radioativo foi adicionada como precursor em meio de cultura de *F. verticillioides*. As evidências apresentadas indicaram que a alanina é incorporada diretamente na molécula de FB₁, e de maneira intacta, originando os carbonos 1 e 2 da micotoxina, bem como o grupo amino em C-2 (BRANHAM e PLATTNER, 1993a).

A origem de várias outras moléculas que aparecem ligadas ao esqueleto carbônico das fumonisinas também foi amplamente pesquisada. PLATTNER e SHACKELFORD (1992) investigaram a origem dos grupamentos metil das fumonisinas, e observaram que metionina marcada com deutério foi incorporada nos carbonos 12 e 16, indicando que ambos os grupos metil posicionados nesses carbonos são derivados da metionina.

CALDAS *et al.* (1998) verificaram que o oxigênio presente nas moléculas de ácido tricarbalílico (TCA) da FB₁ foram derivados da H₂O, enquanto que as hidroxilas presentes na cadeia de FB₁ foram originadas do oxigênio molecular. Também foi constatado que o grupo hidroxila do carbono 3 da FB₁ é oriundo de um grupo carbonil, derivado do acetato, enquanto as hidroxilas dos carbonos 5, 10, 14 e 15 são provavelmente derivadas do oxigênio molecular.

Por fim, as moléculas de TCA parecem ser originadas do ciclo do ácido cítrico, ou do aconitato, ou do citrato (BLACKWELL *et al.*, 1996; BOJJA *et al.*, 2004).

3.5.2. Via de Biossíntese de Fumonisinas

Estudos em relação à via de biossíntese de fumonisinas procuraram esclarecer os genes que codificam para produtos envolvidos nas reações químicas da biossíntese, assim como a ordem em que estas reações ocorrem.

Embora muitos estudos já tenham sido publicados a respeito do assunto, a rota metabólica de síntese das fumonisinas ainda não foi completamente esclarecida. Sabe-se, entretanto, que por apresentarem analogia à esfinganina e esfingosina, as fumonisinas são sintetizadas por uma rota metabólica semelhante a destes esfingolipídios (BRANHAM e PLATTNER, 1993a).

As fumonisinas são sintetizadas, pelo menos em parte, por enzimas codificadas pelos genes *FUM*, que estão contidos em um *cluster*, localizado no cromossomo 1 de *F. verticillioides* (PROCTOR *et al.*, 1999; PROCTOR *et al.*, 2003; SEO *et al.*, 2001; DESJARDINS *et al.*, 1996, BUTCHKO *et al.*, 2006).

O significado funcional desse tipo de organização gênica para a biossíntese de micotoxinas ainda não foi esclarecido. Provavelmente, a organização em *cluster* facilite a formação de estruturas cromossômicas envolvidas com a regulação da expressão gênica, ou ainda, pode refletir origem evolutiva comum das vias de biossíntese de micotoxinas, uma vez que normalmente genes envolvidos na biossíntese de metabólitos “dispensáveis”, como as fumonisinas, estão agrupados em *clusters* em fungos filamentosos (KELLER e HOHN, 1997; DESJARDINS *et al.*, 1996).

Por exemplo, os genes para biossíntese de aflatoxina e esterigmatocistina (BROWN *et al.*, 1996), giberelinas (TUDZYNSKI e HOLTER, 1998) e tricotecenos (DESJARDINS *et al.*, 1993) encontram-se em *clusters* em todos os fungos que produzem esses metabólitos. Esses *clusters* incluem genes que codificam para enzimas, fatores de transcrição e transportadores. Devido à correlação entre os *loci Fum* de *F. verticillioides*, e a freqüente ocorrência de *clusters* gênicos em fungos filamentosos, é provável que pelo menos parte dos genes relacionados à biossíntese das fumonisinas estejam também em um *cluster* (SEO *et al.*, 2001).

DESJARDINS *et al.* (1996), PROCTOR *et al.* (1999) e SEO *et al.* (2001) foram os primeiros a caracterizar o cluster gênico das fumonisinas, cuja identificação facilitou estudos diretos sobre os genes relacionados à biossíntese.

O cluster gênico das fumonisinas consiste de 17 genes caracterizados, denominados *FUM1* a *FUM3*, *FUM6* a *FUM8*, *FUM10*, *FUM11*, *FUM13* a *FUM21*. O papel de alguns destes genes foi determinado por meio da deleção dos mesmos, com conseqüente geração de linhagens mutantes, as quais forneceram os subsídios necessários para os estudos de função dos genes. O produto previsto de cada gene foi determinado por meio de análises de similaridade de seqüência com outros genes de função conhecida (PROCTOR *et al.*; 1999; PROCTOR *et al.*; 2003; BUTCHKO *et al.*, 2003a; 2006; BOJJA *et al.*, 2004; BROWN *et al.*, 2007), conforme mostra a Tabela 2.

Análises de seqüências de aminoácidos indicaram que 11 desses genes são previstos como codificadores de enzimas que catalisam reações bioquímicas (*FUM1* – *FUM3*; *FUM6* – *FUM8*; *FUM10*; *FUM13* – *FUM16*). Dois são previstos como codificadores de transportadores (*FUM11* e *FUM19*), dois como codificadores de fatores de longevidade (*FUM17* e *FUM18*), provavelmente com função de autoproteção, um com função desconhecida (*FUM20*) e outro atuando como regulador (*FUM21*) (BUTCHKO *et al.*, 2003a).

Embora a via de biossíntese de fumonisinas ainda não tenha sido completamente esclarecida, BUTCHKO *et al.* propuseram em 2006 uma versão atualizada e mais completa de como as reações desta via poderiam ocorrer (Figura 7).

A biossíntese começa com a reação catalisada pela policetídeo sintase (PKS) Fum1p, na qual uma molécula de acetil-CoA, 8 moléculas de malonil-CoA e duas moléculas de metionina sob forma de S-adenosil são condensadas, gerando um policetídeo de 18 carbonos (BOJJA *et al.*, 2004; BUTCHKO *et al.*, 2006).

Ressalta-se que o gene *FUM1*, que codifica para Fum1p mostrou-se essencial para a biossíntese de fumonisinas, uma vez que foi observado que a transformação de *G. fujikuroi* com um cosmídeo carregando este gene aumentou a produção de fumonisinas, além de restaurar a produção da toxina em linhagens não produtoras. A interrupção do gene provocou redução de mais de 99% na produção de fumonisinas por *G. fujikuroi* (PROCTOR *et al.*, 1999).

Em 1996, DESJARDINS *et al.* por meio de análises de genética clássica de variantes naturais de *F. verticillioides* com fenótipos de produção de fumonisina alterados, identificaram três *loci* importantes para a biossíntese de

fumonisininas. Foi observado que o *locus Fum1* confere a capacidade de produzir fumonisininas, de tal forma, que linhagens que apresentam defeitos neste *locus* não produzem fumonisininas.

Posteriormente, foi observado que o *locus Fum1* e *FUM5* eram o mesmo gene, e a denominação de *FUM5* passou a ser *FUM1* (DESJARDINS *et al.*, 2002).

Após a ação da PKS Fum1p, resultando na formação da cadeia de 18 carbonos, ocorre condensação da alanina, formando uma molécula de 20 carbonos, com o grupo amino no carbono 2 e grupos metil nos carbonos 12 e 16, reação catalisada pela aminoacil transferase Fum8p, codificada por *FUM8* (BOJJA *et al.*, 2004; BUTCHKO *et al.*, 2006).

Fum8p é homólogo à serina palmitoiltransferase que catalisa o primeiro passo da via dos esfingolipídeos, produzindo 3-cetoesfinganina a partir de serina e palmitoil-CoA (YI *et al.*, 2005).

Assim como *FUM1*, o gene *FUM8* também se mostrou essencial para a biossíntese de fumonisininas, uma vez que a interrupção desse gene provocou bloqueio na produção das toxinas (SEO *et al.*, 2001).

O próximo passo da via de biossíntese é catalisado pela citocromo P450 monoxigenase/redutase Fum6p, que promove oxidação nos carbonos 14 e 15. O gene *FUM 15* também codifica para uma citocromo P450 monoxigenase, e poderia desempenhar um papel junto a *FUM6* e/ou *FUM2*. Entretanto, a deleção de *FUM15* não provocou efeito observável na produção de fumonisininas (PROCTOR *et al.*, 2003; BOJJA *et al.*, 2004; BUTCHKO *et al.*, 2006). A interrupção do gene *FUM6* também provocou bloqueio na síntese de fumonisininas (SEO *et al.*, 2001; BOJJA *et al.*, 2004).

O intermediário 3-ceto resultante da ação de Fum6p sofre redução no grupo carbonil localizado no carbono 3 da cadeia policetídisca, com conseqüente formação de um grupo hidroxila neste local. A enzima que catalisa este passo é a Fum13p, uma carbonil redutase codificada por *FUM13* (BUTCHKO *et al.*, 2003a; BOJJA *et al.*, 2005; YI *et al.*, 2005; BUTCHKO *et al.*, 2006).

Tabela 2 – Produtos Previstos dos Genes que Participam da Biossíntese de Fumonisininas

Gene	Produto Previsto	Referência
<i>FUM1 (FUM5*)</i>	Policetídeo sintase	DESJARDINS <i>et al.</i> , 1996 PROCTOR <i>et al.</i> , 1999
<i>FUM2 (FUM12*)</i>	Citocromo P450 monoxigenase/redutase	DESJARDINS <i>et al.</i> , 1996 PROCTOR <i>et al.</i> , 2006
<i>FUM3 (FUM9*)</i>	Dioxigenase	DESJARDINS <i>et al.</i> , 1996
<i>FUM6</i>	Citocromo P450 monoxigenase/redutase	SEO <i>et al.</i> , 2001
<i>FUM7</i>	Desidrogenase	SEO <i>et al.</i> , 2001 BUTCHKO <i>et al.</i> , 2006
<i>FUM8</i>	Oxoamina sintase	SEO <i>et al.</i> , 2001
<i>FUM10</i>	Acil-CoA graxo sintetase	BUTCHKO <i>et al.</i> , 2006
<i>FUM11</i>	Transportador tricarboxilato	PROCTOR <i>et al.</i> , 2003 BUTCHKO <i>et al.</i> , 2006
<i>FUM13</i>	Carbonil redutase	BUTCHKO <i>et al.</i> , 2003a YI <i>et al.</i> , 2005
<i>FUM14</i>	Domínio de condensação da peptídeo sintase	BUTCHKO <i>et al.</i> , 2006
<i>FUM15</i>	Citocromo P450 monoxigenase/redutase	PROCTOR <i>et al.</i> , 2003
<i>FUM16</i>	Acil-CoA graxo sintetase	BUTCHKO <i>et al.</i> , 2006
<i>FUM17</i>	Fator de longevidade	BUTCHKO <i>et al.</i> , 2003a
<i>FUM18</i>	Fator de longevidade	BUTCHKO <i>et al.</i> , 2003 ^a
<i>FUM19</i>	Transportador ABC	PROCTOR <i>et al.</i> , 2003 BOJJA <i>et al.</i> , 2004
<i>FUM20</i>	Função desconhecida	BROWN <i>et al.</i> , 2005
<i>FUM21</i>	Fum21p – regulação da biossíntese	BROWN <i>et al.</i> , 2007

* Denominação anterior

Simultaneamente às reações acima descritas, os transportadores tricarboxilatos, codificados por *FUM11*, promovem o transporte de precursores

tricarboxílicos e ésteres tricarbalílicos (TCAs) da mitocôndria, onde poderiam ser produzidos como resultado do ciclo do ácido cítrico, para o citoplasma, onde serão utilizados na síntese de fumonisinas (BUTCHKO *et al.*, 2006).

A proteína prevista para *FUM11* exibe alto grau de similaridade a transportadores tricarboxilato de ligação a membranas, presentes nas mitocôndrias. Além disso, apesar dos níveis de fumonisinas produzidas em linhagens mutantes em *FUM11* serem semelhante à linhagens selvagens, grande parte das toxinas apresentaram-se parcialmente hidrolisadas, indicando que este gene provavelmente não é essencial para a produção de fumonisinas e TCA, mas que a disponibilidade de TCA provavelmente estava limitada. Portanto, a proteína codificada por *FUM11* pode elevar os níveis de TCA e, conseqüentemente, de fumonisina íntegras produzidas (PROCTOR *et al.*, 2003; BUTCHKO *et al.*, 2006).

A partir deste ponto, a via de biossíntese de fumonisinas se ramifica. Para a produção de fumonisinas B₂ e B₄, o intermediário resultante da ação de Fum13p é adicionado das moléculas de TCA (reações descritas posteriormente). Entretanto, quando há produção de fumonisinas B₁ e B₃, um passo é adicionado à via. Neste passo, catalisado pela proteína codificada por *FUM2*, Fum2p (citocromo P450 monoxigenase), ocorre a hidroxilação do carbono 10 da cadeia policetílica (DESJARDINS *et al.*, 1996; BUTCHKO *et al.*, 2003a; BUTCHKO *et al.*, 2003b; BOJJA *et al.*, 2004; PROCTOR *et al.*, 2006; BUTCHKO *et al.*, 2006).

Para serem adicionadas à cadeia policetílica, as moléculas precursoras dos TCA são modificadas pela desidrogenase Fum7p, codificada por *FUM7*. Os precursores das reações neste ponto da via ainda não foram totalmente esclarecidos. Entretanto, o substrato para a desidrogenase de Fum7p, ou o precursor dos TCAs, é possivelmente o *cis* – aconitato, devido a sua semelhança estrutural com TCA. Além disso, o *cis* – aconitato é um intermediário do ciclo do ácido cítrico, e, portanto, poderia ser utilizado na biossíntese de fumonisinas. No entanto, é possível que outros ácidos tricarboxílicos sejam precursores do TCA, como por exemplo, o citrato (BUTCHKO *et al.*, 2006).

De acordo com o precursor, a enzima Fum7p poderia atuar de duas maneiras distintas. Caso o precursor seja o aconitato, a proteína catalisa a

redução da dupla ligação (função alceno) antes da esterificação na cadeia das fumonisinas, uma vez que as moléculas de TCA apresentam uma função alceno antes de serem esterificadas à cadeia da fumonisina. Caso o precursor seja o citrato, a desidrogenase poderia remover a hidroxila do carbono 3 do citrato, formando TCA. Essas reações poderiam ocorrer antes ou depois das reações de ativação, catalisada por *FUM10*, e esterificação, catalisada por *FUM14* (SEO *et al.*, 2001; PROCTOR *et al.*, 2003; BOJJA *et al.*, 2004; BUTCHKO *et al.*, 2006).

A reação de ativação envolve a tioesterificação dos TCA com CoA, catalisada por Fum10p, uma acil-CoA graxo sintetase. Assim como *FUM10*, a proteína prevista para *FUM16* é uma acil – CoA sintetase, que pode estar envolvida na ativação das moléculas de TCA com a coenzima A. Entretanto, ao contrário dos mutantes para *FUM10*, os mutantes para *FUM16* não exibiram produção de fumonisinas alterada em relação à linhagem selvagem. Portanto, enquanto *FUM10* é essencial para a formação dos ésteres tricarbálicos, *FUM16* não é (PROCTOR *et al.*, 2003; BUTCHKO *et al.*, 2006).

Finalmente, a enzima de condensação codificada por *FUM14* promove a esterificação dos TCAs ativados aos átomos de oxigênio nos carbonos 14 e 15 da cadeia do policetídeo (BUTCHKO *et al.*, 2006).

Uma vez que mutantes para *FUM10* e *FUM14* apresentaram acúmulo apenas das formas hidrolisadas de fumonisinas desprovidas do grupo hidroxila no carbono 5 (FB₃ e FB₄ hidrolisadas), ao invés de hidrolisados de FB₁, a esterificação dos TCAs deve ocorrer antes da hidroxilação no carbono 5 (BUTCHKO *et al.*, 2006).

Neste ponto da via, já estão formadas FB₃ e FB₄. Para a formação dos análogos B₁ e B₂, as reações se confluem novamente. As moléculas de FB₃ e FB₄ sofrem ação da Fum3p, codificada pelo gene *FUM3*, que catalisa a hidroxilação no carbono 5 dos policetídeos. A evidência para a função desta proteína foi observada por BUTCHKO *et al.* (2003b), que demonstraram que mutantes para *FUM3* produziram apenas FB₃ e FB₄, desprovidas de hidroxila no carbono 5. Os mesmos autores demonstraram que *FUM9* e o locus *Fum3* eram o mesmo gene, cuja denominação passou a ser *FUM3*.

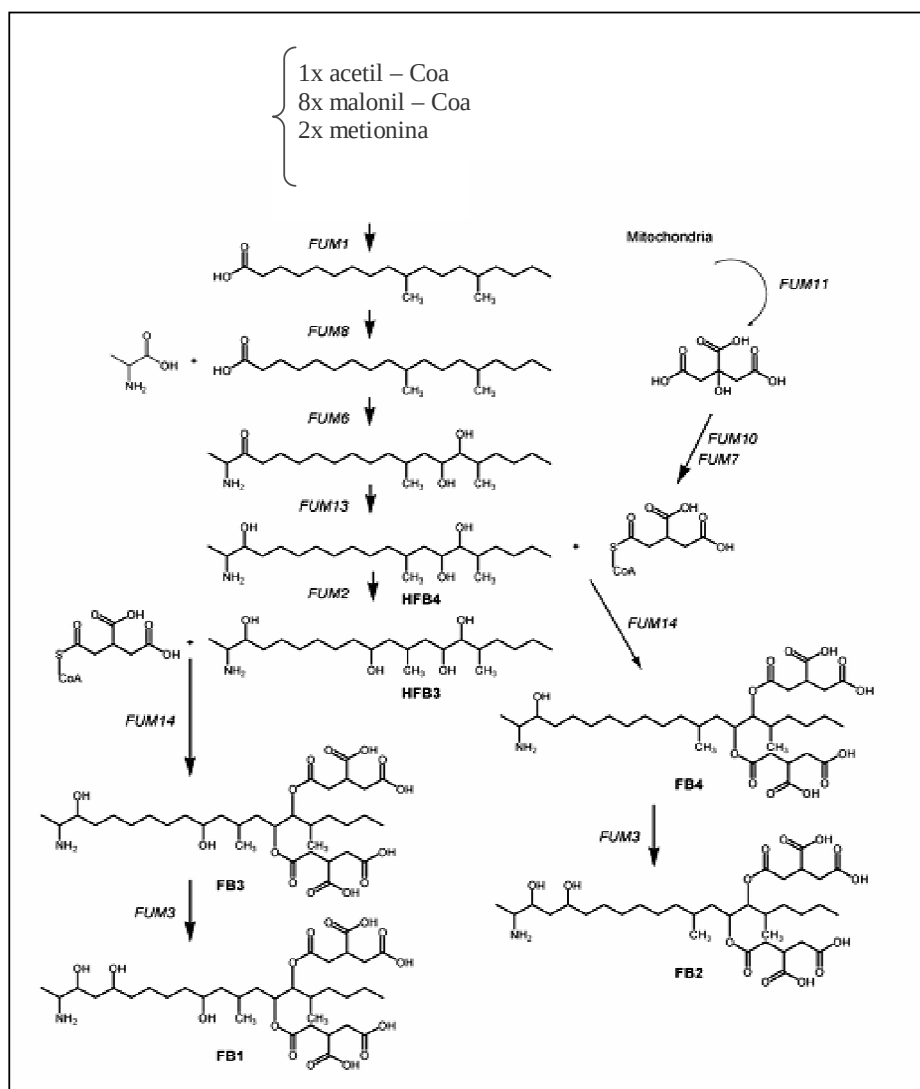


Figura 7 - Via de Biossíntese de Fumonisinias

Fonte: Adaptado de BOJJA *et al.* (2004) e BUTCHKO *et al.* (2006)

Portanto, Fum3p é responsável por gerar FB₁ quando catalisa a hidroxilação do carbono 5 nos análogos B₃, e por gerar FB₂ quando catalisa a hidroxilação do carbono 5 nos análogos B₄ (BUTCHKO *et al.*, 2003a; BUTCHKO *et al.*, 2003b; DING *et al.*, 2004).

O transporte extracelular das micotoxinas sintetizadas é realizado pela proteína codificada por FUM19, um transportador ABC – cassete de ligação de ATP (PROCTOR *et al.* 1999; PROCTOR *et al.*, 2003; BOJJA *et al.*, 2004; LÓPEZ – ERRASQUÍN *et al.*, 2007).

Deve-se ressaltar que o entendimento da via de biossíntese das fumonisinas é importante para pesquisas que visem à detoxificação de alimentos, e para a aplicação de estratégias genéticas e de biologia molecular com a finalidade de minimização da ocorrência das referidas micotoxinas (BRANHAM e PLATTNER, 1993a).

3.5.3. Regulação da Biossíntese de Fumonisinas

A regulação da transcrição de metabólitos secundários pode ser afetada positiva ou negativamente por fatores de transcrição de amplo ou curto espectro de ação, ou ainda por reguladores globais (BROWN *et al.*, 2007).

Os fatores de transcrição de curto espectro de ação são normalmente codificados por genes localizados dentro do *cluster* responsável pela biossíntese do metabólito secundário, e estimulam a transcrição dos genes desse *cluster* (BROWN *et al.*, 2007).

Por outro lado, fatores de transcrição globais e de amplo espectro de ação são codificados por genes localizados em regiões do genoma que não o *cluster* biossintético do metabólito, e em geral influenciam diversos processos fisiológicos, respondendo a fatores ambientais, como pH, temperatura, nutrientes, dentre outros (BROWN *et al.*, 2007).

Apesar de o conhecimento a respeito da regulação da biossíntese de fumonisinas ser ainda limitado, alguns genes foram relatados como influentes no processo, participando ou impactando na biossíntese das fumonisinas por *F. verticillioides* (WOLOSHUK e SHIM, 2001; FLAHERTY *et al.*, 2003; FLAHERTY e WOLOSHUK, 2004; BROWN *et al.*, 2007).

O gene *FCC1* foi o primeiro a ser descrito como regulador da biossíntese de fumonisinas. WOLOSHUK e SHIM (2001) demonstraram que a interrupção desse gene resulta em não produção de FB₁ quando os mutantes são cultivados em milho. Trata-se, portanto, de um gene regulador positivo, que apresenta alta similaridade com ciclinas tipo C de *Saccharomyces cerevisiae*.

As ciclinas codificadas por *FCC1* participam na ativação/repressão transcricional de genes associados a respostas ao stress e ao desenvolvimento, e provavelmente atuam em conjunto com as quinases

dependentes de ciclina codificadas pelo gene *FCK1* (WOLOSHUK e SHIM, 2001; BLUHM e WOLOSHUK, 2006)

Outro gene regulador descrito, o *PAC1*, codifica para uma proteína que pode atuar como repressora da biossíntese de fumonisinas apenas em condições alcalinas, atuando independentemente do gene *FCC1* (FLAHERTY *et. al.*, 2003).

O gene *ZFR1* codifica para um regulador indireto da via biossintética das fumonisinas, sendo que os mutantes com este gene interrompido não deixaram de produzir as micotoxinas, mas passaram a produzi-las em menores concentrações (FLAHERTY e WOLOSHUK, 2004).

BLUHM *et al.* (2008) demonstraram que o gene *ZFR1* pode ser requerido para a expressão do gene *FST1*, que codifica para um transportador de açúcares, e possivelmente para a expressão de outros genes similares. Uma vez que a entrada de açúcares nas células fúngicas desempenha um papel importante para a colonização dos grãos, além de induzir a produção de fumonisinas, *ZFR1* poderia regular a biossíntese dessas micotoxinas indiretamente, através da disponibilidade de transportadores de açúcares.

O único gene descrito como regulador e presente dentro do *cluster* das fumonisinas é o *FUM21*. A presença de um domínio de ligação Zn(II)₂Cys₆ na proteína prevista para esse gene sugere que ele esteja envolvido na regulação transcricional. As pesquisas realizadas com esse gene demonstraram sua importância para a biossíntese de fumonisinas, uma vez que a sua deleção acarretou pouca ou nenhuma produção de toxina. Os mutantes complementados com o gene tiveram a capacidade de produzir fumonisinas restaurada (BROWN *et al.*, 2007).

3.6. Medidas de Controle e Minimização da Ocorrência de *Fusarium verticillioides* e Fumonisinas em Grãos de Milho

O milho não é somente um dos principais cereais cultivados em todo o mundo, mas é também uma das culturas mais sujeitas à contaminação por micotoxinas (MUNKVOLD, 2003).

A ocorrência de micotoxinas em milho é afetada principalmente pelo clima e pela geografia, mas também sofre influência de sistemas de plantio, práticas de cultivo, manejo pós-colheita dos grãos, dentre outros (MUNKVOLD, 2003; BAPTISTA *et al.*, 2004; REYNERI, 2006).

O efeito maléfico das micotoxinas e patologias causadas por *Fusarium verticillioides* em grãos de milho é reconhecido há bastante tempo, entretanto, o manejo e minimização de suas ocorrências permanece ainda oneroso e inadequado (MUNKVOLD, 2003).

Diversas estratégias têm sido estudadas como possíveis soluções para esse problema. A minimização da ocorrência de fumonisinas e *F. verticillioides* pode ser alcançada por meio de práticas de cultivo pré e pós-colheita, controle durante a colheita, ou ainda por meio de estratégias genéticas e de descontaminação (DUVICK, 2001; MUNKVOLD, 2003; BAPTISTA *et al.*, 2004; SORIANO e DRAGACCI, 2004; REYNERI, 2006).

Diversos métodos de descontaminação físicos, químicos e biológicos são descritos na literatura. Muitos desses métodos apresentam resultados promissores em relação à ocorrência de fumonisinas, entretanto, não existe ainda um método que seja eficaz para a grande gama de micotoxinas que co-ocorrem em grãos de milho, o que torna os processos de descontaminação onerosos e, portanto, inaplicáveis em sua maioria. Além disso, a maioria dos métodos de descontaminação foi estudada apenas *in vitro*, sendo que seus resultados e sua eficácia não necessariamente se aplicam *in vivo* (MUNKVOLD, 2003; SORIANO e DRAGACCI, 2004).

Além dos métodos de descontaminação, algumas estratégias genéticas têm sido pesquisadas para minimizar a ocorrência de fumonisinas em milho. Algumas dessas estratégias baseiam-se na utilização de híbridos de milho resistentes a *F. verticillioides*; e embora certo progresso tenha sido atingido, híbridos altamente resistentes ainda não se encontram disponíveis para

utilização. O desenvolvimento de transgênicos também tem sido amplamente pesquisado, mas os resultados desses estudos não são ainda aplicáveis, e muitos anos podem ser necessários para que um resultado satisfatório seja atingido (DUVICK, 2001; MUNKVOLD, 2003).

Portanto, atualmente as estratégias mais eficazes e utilizadas para o controle e minimização da ocorrência de fumonisinas em milho são práticas de cultivo. Dentre essas estratégias, pode-se citar o manejo da infestação por insetos e dos resíduos de cultivos anteriores, a rotação de culturas, manejo do tempo de colheita e de condições de armazenamento dos grãos, fertilização do solo, aplicação de fungicidas, dentre outros (MUNKVOLD, 2003; REYNERI, 2006).

Devido ao escopo desta pesquisa, enfoque especial será dado à fertilização nitrogenada e utilização de fungicidas como medidas de controle e minimização da ocorrência de fumonisinas e *F. verticillioides* em milho.

3.6.1. Fertilização Nitrogenada

O nitrogênio é o macronutriente mais importante para cultura de milho, sendo componente de diversas proteínas, enzimas, co-enzimas, ácidos nucléicos e citocromos (BÜLL, 1993). O emprego adequado do fertilizante pode aumentar significativamente a área foliar e a produção de matéria seca, acarretando em maior produtividade, e conseqüentemente, maiores lucros (ARAÚJO *et al.*, 2004).

A uréia é um dos fertilizantes nitrogenados mais utilizados no Brasil (corresponde a 60% dos fertilizantes nitrogenados empregados na agricultura brasileira), apresentando diversas vantagens, como alta concentração de nitrogênio (45%), baixo custo de transporte, alta solubilidade, baixa corrosividade e facilidade de mistura com outras fontes. Entretanto, a uréia apresenta como desvantagem alta higroscopicidade e facilidade de perda por volatilização de $N-NH_3$ quando aplicada à superfície do solo, em decorrência da presença da enzima urease produzida por microrganismos do solo (RAIJ, 1991; OVERREIN e MOE, 1967).

A incorporação de inibidores de urease é uma alternativa para prevenir a perda de nitrogênio devido à hidrólise por urease. O inibidor inativa a urease, retardando o início da reação de hidrólise e diminuindo, portanto, as perdas por volatilização (CARMONA *et al.*, 1990; MOBLEY e HAUSINGER, 1989; KORNDORFER e MARTINS, 1992).

Em relação a doses de fertilizante nitrogenado aplicadas, apesar de o excesso de nitrogênio geralmente promover maiores produtividades, as condições para infestação fúngica podem também ser favorecidas em decorrência de um crescimento vegetativo mais prolongado, que aumentaria a exposição das folhas a patógenos, e de maior expansão foliar, que tornaria as paredes celulares mais delgadas e, portanto, mais vulneráveis à penetração fúngica (HASSEGAWA *et al.*, 2008; BLANDINO *et al.*, 2008).

Por outro lado, plantas de milho expostas ao estresse por falta de fertilidade do solo também são altamente susceptíveis à infecção por microrganismos. Diversos autores relataram alta incidência de patologias causadas por fungos toxigênicos no milho associadas a condições de estresse durante o cultivo (MILLER, 2001; WIDSTROM, 1996; BLANDINO *et al.*, 2008;).

LISKER e LILLEHOJ (1991) demonstraram que altos níveis de aflatoxinas podem estar relacionados a estresses por deficiência de nutrientes, em especial nitrogênio.

A aplicação de doses mais altas de nitrogênio (aproximadamente 200 Kg/ha) em geral reduz a ocorrência de aflatoxinas e fumonisinas (JONES e DUNCAN, 1981; HASSEGAWA *et al.*, 2008; BLANDINO *et al.*, 2004).

A repressão da síntese de fumonisinas em altas doses de nitrogênio foi também observada em estudos *in vitro* em meios de cultivo líquidos por SHIM e WOLOSHUK (1999). A pesquisa desses autores foi executada em meio líquido contendo fosfato de amônio em concentrações de 1,25, 2,5, 10 e 20 mM, sendo constatado que nos meios com menores concentrações de nitrogênio, a síntese de fumonisinas iniciou antes de 18 horas após a inoculação, enquanto que nos meios contendo 10 e 20 mM de fosfato de amônio, a síntese de fumonisinas ocorreu 75 e 125 horas após a inoculação, respectivamente. Além disso, a adição de fosfato de amônio em concentrações de 10 e 20 mM em cultivos de meio sólido constituídos de milho triturado reprimiu a síntese de

fumonisinias em 97% e 99%, respectivamente, após uma semana, sendo que a repressão foi observada durante as três semanas totais do experimento.

Os dados desses autores demonstram que a biossíntese de fumonisinias é regulada por mecanismos que envolvem a repressão metabólica por nitrogênio, sugerindo que estratégias de controle que visem os elementos regulatórios do metabolismo do nitrogênio podem ser eficientes para reduzir a contaminação de alimentos por fumonisinias (SHIM e WOLOSHUK, 1999).

BLANDINO *et al.* (2008) avaliaram a influência de diferentes doses (100, 200, 300 e 400 Kg/ha) e fontes de nitrogênio (uréia e fertilizante de liberação lenta) na ocorrência de micotoxinas em safras de 2000, 2001 e 2002. Os resultados demonstraram que mais de 80% da contaminação por fumonisinias ocorreu em situações de deficiência de nitrogênio. Entretanto, doses muito elevadas de fertilizante nitrogenado também favoreceram a contaminação por fumonisinias. Portanto, uma aplicação balanceada de fertilizante nitrogenado seria a melhor solução para prevenir a contaminação de grãos de milho por fumonisinias.

Além disso, foi demonstrado que a fonte de nitrogênio também influencia na contaminação por micotoxinas. Para fumonisinias, a utilização de uréia (200 Kg/ha) está relacionada à menor ocorrência destas micotoxinas, enquanto que a utilização na mesma concentração de fertilizante de liberação lenta favoreceu a ocorrência de fumonisinias, em todos os anos avaliados. Esse fenômeno ocorre porque o fertilizante de liberação lenta pode promover um prolongamento da fase vegetativa (*staygreen*) nas plantas de milho, até mesmo no último período de amadurecimento, fornecendo melhores condições para o desenvolvimento fúngico (BLANDINO *et al.*, 2008).

Desta maneira, o suprimento adequado de nutrientes em culturas de milho deve fornecer boa produtividade e ao mesmo tempo diminuir o risco de contaminação por micotoxinas. Entretanto, a quantidade de fertilizante nitrogenado que deve ser aplicado com esse objetivo não é fácil de definir, uma vez que tanto a produtividade, quanto a contaminação por micotoxinas podem ser também influenciadas por outros fatores e técnicas de cultivo, como época de plantio, densidade de plantas, híbridos utilizados, microclima, interação com outros nutrientes (BLANDINO *et al.*, 2008; HASSEGAWA *et al.*, 2008).

A fertilização nitrogenada, em geral, mostra-se como um fator de extrema importância para a contaminação por fumonisinas em grãos de milho, podendo ser utilizada para diminuir os riscos de contaminação por micotoxinas. Ressalta-se, no entanto, que além da concentração, a fonte de nitrogênio parece estar correlacionada à produção de micotoxinas em milho, e deve ser também explorada a fim de minimizar a ocorrência dessas toxinas e dos fungos que as produzem, proporcionando maior segurança alimentar (BLANDINO *et al.*, 2008; HASSEGAWA *et al.*, 2008).

3.6.2. Fungicidas

Atualmente, uma das maneiras consideradas como mais eficazes para reduzir os danos causados por *F. verticillioides* no milho é o tratamento químico de sementes. Uma vez que os defensivos agrícolas são amplamente utilizados para o controle de doenças provocadas por fungos toxigênicos em milho, muitos estudos procuram investigar a eficácia dos princípios ativos dos fungicidas no controle e ocorrência desses fungos, bem como a sua influência na produção de micotoxinas pelos mesmos (MORAES *et al.*, 2003; D'MELLO *et al.*, 1998).

Contudo, tanto os estudos conduzidos em laboratórios com culturas puras de patógenos, quanto aqueles conduzidos em testes de campo com culturas de milho, apresentam resultados muitas vezes contraditórios no que diz respeito à eficiência dos fungicidas no controle de ocorrência de fungos e micotoxinas (D'MELLO *et al.*, 1998).

MUSS e FRANK (1985) demonstraram que diferentes concentrações de tridemorfe influenciaram o crescimento e a produção de toxinas T-2 por *F. sporotrichioides*. Baixas concentrações, variando de 6 a 8 µg/mL, não foram suficientes para controlar o crescimento do fungo, porém reduziram a produção de toxina T-2 e diacetoxiscirpenol (DAS). Concentrações mais elevadas (30 a 50 µg/mL) inibiram o crescimento fúngico em mais de 50%, mas aumentaram a produção de toxina T-2 em 5 vezes.

Em contraste, o tratamento de sementes de milho com 50 µg/mL de maneb para infecções provocadas por *Fusarium graminearum* proporcionou

boa qualidade de controle tanto do crescimento fúngico quanto da produção de zearalenona (ZEA), *in vivo* e *in situ* (DRAUGHTON e CHURCHVILLE, 1985).

MATTHIES e BUCHENAUER (1996) testaram uma ampla gama de fungicidas utilizados comumente na Alemanha, e constataram que tridemorfe e fenopropimorfe não surtiram efeito na produção de desoxinivalenol (DON), enquanto que benomyl, tiabendazole, procloraz e tebuconazole inibiram a incidência da toxina, quando utilizados em concentrações de 0,5 a 1,0 µg/mL. Por outro lado, tubiconazole (0,1 µg/mL) induziu a produção da micotoxina em aproximadamente 4 vezes.

Estudos realizados com *Fusarium culmorum* demonstraram que a presença de procloraz e tebuconazole em concentrações de 2 e 8 µg/mL no meio de cultivo, promoveram aumento da expressão do gene *Tri5*, que codifica para a tricodieno sintase, enzima que catalisa a primeira reação na biossíntese de tricotecenos, podendo induzir a produção dessa micotoxina (DOOHAN *et al.*, 1999).

Por outro lado, SIRANIDOU e BUCHENAUER (2001) demonstraram que a aplicação de tebuconazole e metconazole reduziu a incidência de doenças provocadas por *F. culmorum* no trigo em 60 a 70%, e o conteúdo de DON em 50 a 70%. Em contraste, os fungicidas clorotalonil, procloraz e benomyl não surtiram efeito no controle de doenças provocadas pelo fungo no trigo.

A eficiência da proteção química sobre plantas agriculturáveis depende, portanto, do tipo de fungicida aplicado, e do fungo patogênico que deve ser controlado. Além disso, a eficiência dos fungicidas pode estar relacionada à dose aplicada, e a fatores ambientais, como disponibilidade de água e temperatura (KOLOMBET *et al.*, 2006; MAGAN *et al.*, 2002).

O fato da aplicação de fungicidas poder estimular a produção de micotoxinas é de extrema importância, uma vez que, atualmente, o controle de *F. verticillioides* no milho é realizado principalmente com a utilização de fungicidas. Muitos são os fungicidas utilizados no Brasil, e regulamentados pela ANVISA, entretanto, um dos fungicidas mais utilizados é o fludioxonil + metalaxyl – M.

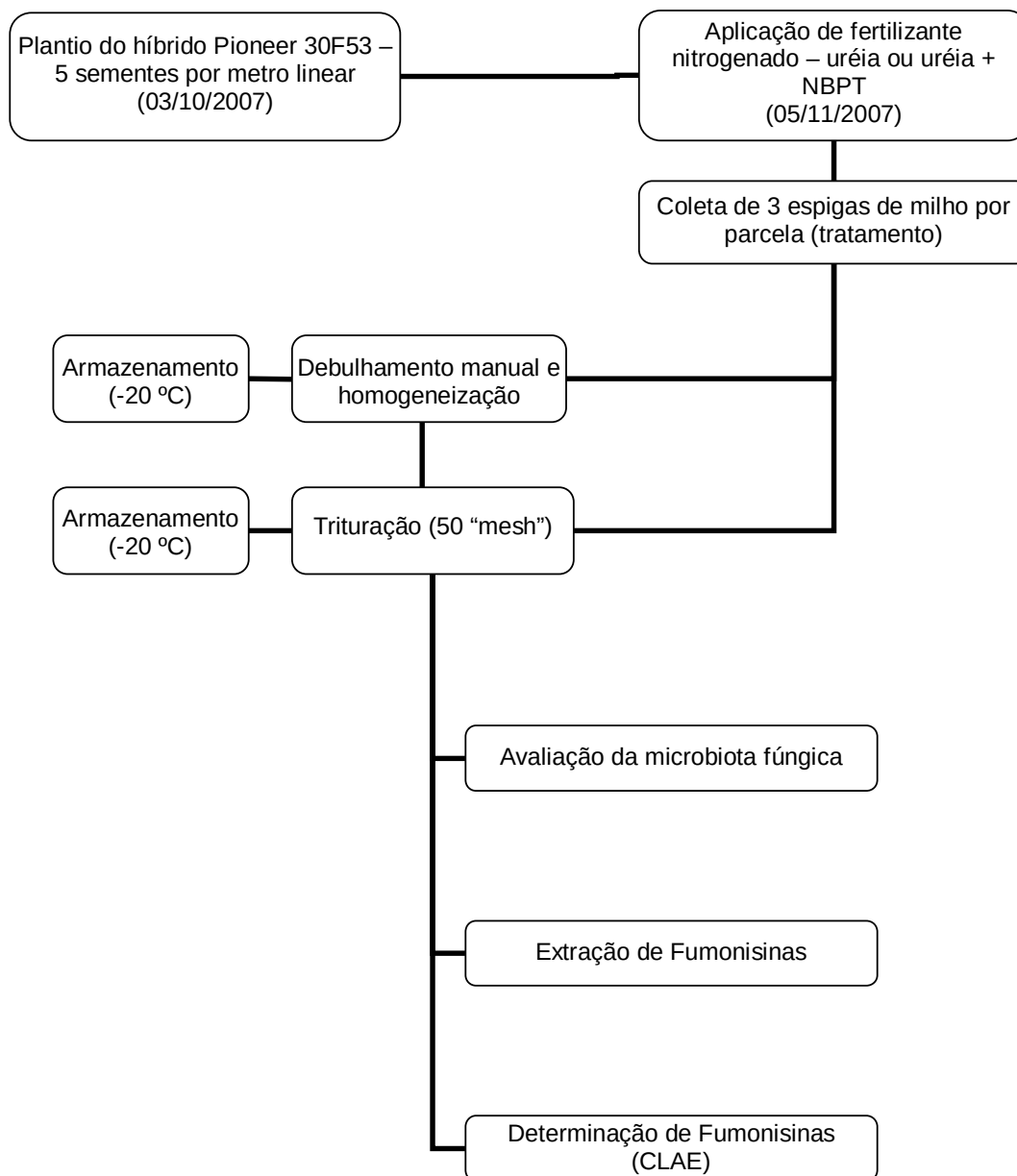
Fludioxonil é um fungicida de contato, com amplo espectro, que atua sobre histidinas quinases denominadas MAP (*Mitogen Activated Protein*). As

MAP quinases estão envolvidas na transdução de sinais extracelulares, sendo importantes para a manutenção, regulação do crescimento e diferenciação celular, crescimento invasivo de hifas e virulência, conidiação e germinação de conídios (XU, 2000). Fludioxonil apresenta limitada absorção pela semente e pequena translocação dentro da plântula. O metalaxyl – M atua sobre a RNA polimerase I, afetando diversos processos metabólicos; penetra no tegumento da semente, sendo sistemicamente translocado a todas as partes da planta durante a germinação.

De acordo com GOULART e FIALHO (2001), fludioxonil + metalaxyl – M proporcionou acréscimo de 56% no rendimento de grãos. MORAES *et al.* (2003) também demonstraram que os princípios ativos mais eficazes para o controle do crescimento de *F. verticillioides in vitro* foram captan + tiabendazole, seguidos de fludioxonil + metalaxyl – M. No entanto, apesar de promoverem maior controle no crescimento e incidência de *F. verticillioides*, não há estudos evidenciando o efeito destes fungicidas em relação à produção de fumonisinas. É, portanto, necessária uma melhor compreensão dos efeitos de fungicidas sobre a produção de fumonisinas por *F. verticillioides*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Delineamento Experimental para Avaliação do Efeito da Fertilização Nitrogenada sobre a Contaminação de Milho por Fungos e Fumonisinias



4.1.1. Caracterização da Área Experimental

O experimento foi conduzido no município de Mauá da Serra (latossolo vermelho, cultivado por 30 anos sob sistema de semeadura direta), região norte do Paraná (23°58' S e 51°19' W, altitude média de 847 m). O clima é do tipo subtropical Cfb (C – clima temperado; f – clima úmido, com precipitação durante todos os meses do ano e inexistência de estação seca definida; b – verão temperado), segundo a classificação de Köppen, com [temperaturas](#) médias entre 16 °C e 22 °C, [amplitude térmica](#) anual entre 5 °C e 9 °C, e precipitação de 1300 a 1500 mm/ano.

4.1.2. Sistema de Plantio e Fertilização Nitrogenada

O híbrido de milho simples Pioneer 30F53 foi cultivado semeando cinco sementes por metro linear, em sistema de semeadura direta, no dia 03 de Outubro de 2007.

As unidades experimentais (parcelas) constituíram-se de 6 linhas com 8,0 m de comprimento e 0,70 m de espaçamento, considerando-se como área útil as 4 linhas centrais, desprezando-se 1,5 m em cada extremidade (Anexo 1).

O experimento foi constituído de 8 tratamentos com 5 repetições cada (Anexo 2), envolvendo duas fontes de nitrogênio (Uréia e Uréia + NBPT – [N-(n-butil) triamida tiofosfórica]) e 3 doses de nitrogênio em cobertura (40, 120 e 200 Kg/ha).

A aplicação das fontes de nitrogênio foi realizada no dia 05 de Novembro de 2007, sendo que todos os tratamentos receberam 40 Kg/ha de nitrogênio na linha de semeadura, com exceção de um tratamento controle, que foi executado sem aplicação de nitrogênio tanto na semeadura quanto em cobertura. Um outro tratamento controle recebeu somente 40 Kg/ha na semeadura, não sendo submetido à aplicação de fontes de nitrogênio em cobertura.

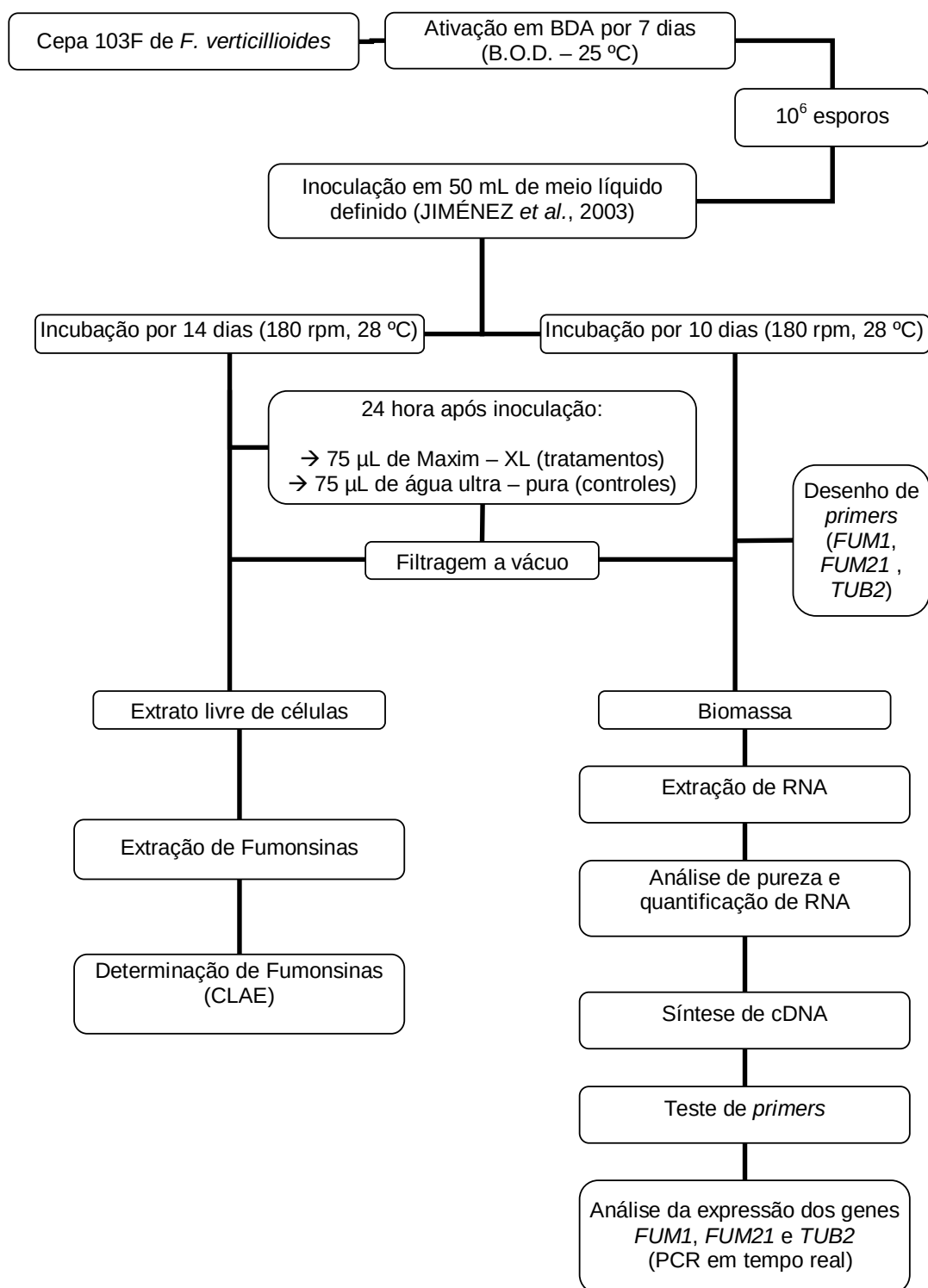
A amostragem constituiu na coleta de 3 espigas de milho por parcela, que foram debulhadas manualmente, homogeneizadas e armazenadas em pacotes de polipropileno a -20 °C. Posteriormente, as

amostras foram trituradas até granulometria de 50 “mesh”, sendo estocadas em pacotes de polipropileno a -20 °C para análises posteriores de microbiota fúngica e determinação de fumonisinas.

4.1.3. Avaliação da Microbiota Fúngica

Uma alíquota de 10 g de milho triturado (50 “mesh”) foi homogeneizada em 90 mL de água peptonada estéril 0,1% (v/v) e submetida a diluições seriadas em tubos contendo 9,0 mL do mesmo diluente até 10^{-5} . Uma alíquota de 1 mL de cada diluição foi transferida para placas de Petri (em duplicata) contendo ágar batata dextrosado (BDA - pH 4,0) adicionado de 50 µg/mL de cloranfenicol. As placas foram incubadas a 25 °C por 6 dias, procedendo-se à contagem e identificação dos gêneros de acordo com os métodos preconizados por NELSON *et al.* (1983), SINGH *et al.* (1991) e SAMSON *et al.* (1995). Uma representação esquemática da metodologia utilizada para análise da microbiota fúngica é mostrada no Anexo 3.

4.2. Delineamento Experimental para Experimentos com Fungicida



4.2.1. Cepa de *Fusarium verticillioides*

Foi utilizada a cepa 103 F de *Fusarium verticillioides*, gentilmente cedida pela Prof^a. Dr^a. Elisa Yoko Hirooka, do Departamento de Ciências e Tecnologia de Alimentos (DCTA) – Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Londrina.

4.2.2. Cultivo de *Fusarium verticillioides*

Foi utilizado meio líquido definido (JIMÉNEZ *et al.*, 2003), com a seguinte composição em 1 litro:

- 0,5 g de extrato de malte; 1 g de extrato de levedura; 1 g de peptona micológica; 1 g de KH_2PO_4 ; 0,3 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,3 g de KCl ; 1 ml de solução de $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ a 0,05 g/L e 1 ml de solução de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a 0,01 g/L, 20 g/L de frutose.

O meio de cultura foi autoclavado a 120 °C por 20 minutos, com exceção da frutose, que foi esterilizada separadamente em vapor fluente por 40 minutos, e posteriormente adicionada assepticamente aos outros componentes do meio de cultivo.

Uma suspensão de esporos (10^6 esporos/mL) de *F. verticillioides* 103 F cultivada em ágar batata dextrose (BDA) por 7 dias a 25 °C foi inoculada em frascos Erlenmeyer contendo 50 mL de meio líquido definido (JIMÉNEZ *et al.*, 2003).

Nos tratamentos foi adicionado o fungicida Maxim – XL 24 horas após a inoculação, na dose recomendada (D.R.) pelo fabricante (150 mL de fungicida para cada 100 kg de sementes – proporcionalmente, 75 µL de fungicida em 50 mL de meio líquido definido).

Aos cultivos controle foram adicionados 75 µL de água ultra-pura estéril 24 horas após a inoculação. Todos os cultivos foram incubados em *shaker* (180 rpm, 28 °C) por 10 dias para análises de expressão gênica, e por 14 dias para determinação de fumonisinas.

4.2.3. Extração e Purificação de RNA

A biomassa obtida por meio de filtração a vácuo foi macerada em nitrogênio líquido e 10 mg de micélio triturado foram utilizados para extrair o RNA total com 750 µL de reagente TRIzol-LS® (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante, com algumas modificações. O RNA extraído foi tratado com clorofórmio, clorofane (fenol:clorofórmio:álcool isoamílico; 25:24:1, v/v) e clorofil (clorofórmio:álcool isoamílico; 24:1, v/v), respectivamente, e centrifugado.

O sobrenadante resultante (80 µL) foi tratado com DNase (5 U) por 15 minutos a 37 °C. O RNA foi então tratado com clorofane e clorofil, e precipitado com isopropanol, seguindo incubação (1 hora a -20 °C), centrifugação e posterior descarte do sobrenadante. O precipitado foi lavado com etanol 70%, e em seguida o RNA mantido em gelo até secagem total.

O RNA extraído foi solubilizado em água DEPC (água tratada com dietil pirocarbonato), e mantido a -20 °C para posterior análise da pureza, quantificação e utilização para transcrição reversa e PCR em tempo real.

4.2.4. Análise de Pureza e Quantificação de RNA

O RNA extraído foi diluído (1:100) em tampão TE pH 8,0 (Tampão Tris-EDTA – 10 mM Tris, 1 mM EDTA), e a absorvância medida a 260 e 280 nm em espectrofotômetro Shimadzu (UV – 1650PC), acoplado a software de análise da mesma marca, através do qual o RNA foi quantificado utilizando-se a absorvância obtida em 260 nm (considerando-se que uma unidade de absorvância a 260 nm equivale a 40 µg de RNA). A pureza em relação a proteínas estimada a partir da relação entre as leituras efetuadas em 260 e 280 nm. O RNA foi considerado livre de proteínas quando a razão entre 260 e 280 nm resultou em valores de 1,9 a 2,1.

4.2.5. Síntese de DNA Complementar

A reação de transcrição reversa foi realizada com 1 µL de RNA total (500 ng/µL), 4 µL de *primer* oligo [dT] 2,5 mM, acrescentados de 2 µL de dNTP 2,5 mM e 6 µL de água DEPC. As amostras foram incubadas no termociclador por 5 minutos a 65 °C, seguido de incubação em gelo para acréscimo de 1 µL de transcriptase reversa (MMLV RT – 5000 U) e tampão de RT – PCR 5X (Tris – HCl 250 mM, pH 8,3; KCl 375 mM; MgCl₂ 15mM e ditioneitol 100 mM), e outra incubação a 37 °C por 50 minutos, finalizando com um ciclo de 70 °C durante 15 minutos. Todos os cDNA sintetizados foram armazenados a -20 °C, e posteriormente utilizados para PCR em tempo real.

4.2.6. Primers

Os *primers* utilizados para a amplificação de uma região dos genes *FUM21*, *FUM1* e *TUB2* foram desenhados pela Prof^a. D^{ra}. Maria Helena Pelegrinelli Fungaro, com auxílio do *software Gene Runner* versão 3.05, a partir das seqüências disponíveis no *GenBank*. As seqüências dos *primers* utilizados para os experimentos de PCR em tempo real são mostradas a seguir:

- *FUM21* (*GenBank*: AF155773); *amplicon* 110 pb
 - FUM21FP: 5' – CGACTAATACTGAGGCAACAG – 3'
 - FUM21RP: 5' – GCGGTATCTGCTGGGTTGAC – 3'
- *FUM1* (*GenBank*: AF155773) ; *amplicon* 206 pb
 - FUM1FP: 5' – CACCGCCCTTCCTATCACAC – 3'
 - FUM1RP: 5' – GGTTCAGACATCGCCCCG – 3'
- *TUB2* (*GenBank*: U27303) ; *amplicon* 193 pb
 - TUB2FP: 5' – CTGCTCATTTCCAAGATCCGC – 3'
 - TUB2RP: 5' – GTAGTTGAGGTCACCGTAGG – 3'

As reações em cadeia da polimerase (PCR) para o teste dos *primers* foram realizadas em termociclador *MJ Research* (PTC – 100TM), utilizando-se

2,5 µL de tampão 1X (10X concentrado – Tris – HCL pH 8.4 200 mM; KCl 500 mM), 1,0 µL de MgCl₂ 50 mM, 2,0 µL de dNTP 2,5 mM, 0,2 µL de *Taq* polimerase (1U), 1 µL de cada *primer* (10 pmol/µL) e 1 µL de cDNA obtido a partir de 500 ng de RNA total do controle (sem fungicida) e do tratamento (com fungicida). Foram realizadas reações de PCR padrão para estabelecer a temperatura de anelamento a ser utilizada (posteriormente estabelecida em 60 °C). Em seguida, os *primers* foram testados (anelamento em 60 °C), e os fragmentos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, e visualizados sob luz ultravioleta (Anexo 5).

4.2.7. PCR em Tempo Real

As reações de PCR em tempo real foram realizadas em termociclador *MJ Research* PTC – 200™ acoplado ao detector de fluorescência *Chromo4* (*MJ Research*), seguindo as condições: 5 minutos a 95 °C, 40 ciclos de 20 segundos a 95 °C (desnaturação), 30 segundos a 60°C (anelamento) e 20 segundos a 72 °C (síntese), e finalmente 72 °C por 5 minutos, com curva de *melting* de 50 °C a 95 °C (leitura a cada 0,5 °C, *hold* 2 segundos).

As misturas de reação continham 9,5 µL de água DEPC, 0,5 µL de cada *primer* (10 pmol/µL), 12,5 µL de *mix* SYBR Green® (*Invitrogen*) e 2 µL de cDNA do controle (sem fungicida) ou do tratamento (com fungicida), totalizando um volume de 25 µL. Controles negativos (branco), aos quais não foi adicionado cDNA, foram utilizados para a detecção de possíveis contaminações.

Os resultados foram analisados utilizando o *software* *Opticon Monitor* versão 3.1, e normalizados aos resultados obtidos para o gene *TUB2*, cuja expressão é constitutiva em *F. verticillioides*. A quantificação da expressão gênica baseou-se na fórmula determinada por PFAFFL (2001):

$$E_{\text{target}}^{\Delta Ct \text{ target (control – sample)}} / E_{\text{reference}}^{\Delta Ct \text{ reference (control – sample)}}$$

Onde E_{target} e $E_{\text{reference}}$ são as eficiências obtidas para os genes alvo e controle, respectivamente, e $\Delta\text{Ct target}$ e $\Delta\text{Ct reference}$ são os valores de Ct (*cycle threshold*) obtidos para os genes alvo e controle, respectivamente.

4.3. Determinação de Fumonisinas

4.3.1. Extração de Fumonisinas

Para a extração de fumonisinas produzidas em meio líquido, 1 mL do extrato livre de células foi misturado a 1 mL de metanol:água (3:1, v/v), sendo a mistura agitada em *vortex* por 1 minuto.

Para a extração de fumonisinas das amostras de milho, 10 g de milho triturado foram adicionados de 30 mL de metanol:água (3:1, v/v), sendo a mistura mantida em repouso por 10 minutos a temperatura ambiente, em seguida agitada em *shaker* (150 rpm, 11 °C) por 30 minutos, e filtrada.

Um mililitro das amostras tratadas com metanol:água (3:1, v/v) foi submetido à pré-limpeza utilizando minicoluna de troca aniônica (Sep Pack Accel Plus QMA – Waters), pré – condicionada com 5 mL de metanol e 5 mL de metanol:água (3:1; v/v).

A minicoluna foi tratada em seguida com 6 mL de metanol/água (3:1; v/v), seguidos de 3 mL de metanol, a fim de eliminar possíveis interferentes. As fumonisinas foram eluídas com 10 mL de metanol:ácido acético 0,5%, posteriormente secos a 45 °C. O resíduo resultante foi dissolvido em 800 µL de metanol:água (3:1, v/v), a seguir fracionado em alíquotas de 200 µL e novamente secos sob fluxo de gás N₂ a 45 °C, procedendo-se ao acondicionamento em freezer (-20 °C) para posterior determinação de fumonisinas por cromatografia líquida de alta eficiência. Uma representação esquemática do processo de extração de fumonisinas é mostrada no Anexo 4.

4.3.2. Quantificação de Fumonisin

As fumonisin foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), de acordo com a metodologia descrita por SHEPHARD *et al.* (1990), modificada por UENO *et al.* (1993). As alíquotas de 200 µL foram redissolvidas em acetonitrila/água (1:1; v/v) e derivatizadas com o-ftaldialdeído (OPA), composto por 40 mg de OPA, 1 mL de metanol, 5 mL de tetraborato de sódio 0.1 M e 50 µL de 2-mercaptoetanol.

A análise foi realizada por sistema isocrático de fase reversa (bomba Shimadzu LC-10 AD e detector de fluorescência RF-10A XL), utilizando coluna C₁₈ Nucleosil 100-5 (4,6 x 250 mm, Macherey-Nagel GmbH & Co).

Os comprimentos de onda de excitação e emissão foram 335 e 450 nm, respectivamente. A fase móvel consistiu de metanol/tampão fosfato de sódio (CH₃OH:NaH₂PO₄) 0,1 M (80:20, v/v), com pH ajustado para 3,3 com ácido o – fosfórico. O fluxo foi mantido em 1 mL/min, e a temperatura em 25 °C.

4.4. Análise Estatística

A contagem de *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp. foi submetida a análise de variância (ANOVA) com formação de contrastes para diferenciar os tratamentos. As diferenças nas médias das concentrações de fumonisin em relação às doses e tipos de fertilizante nitrogenado foram submetidas à análise de variância (ANOVA) seguida de teste de Tukey (p<0,05). A correlação entre as doses de nitrogênio e os níveis de contaminação por fumonisin foi avaliada pelo teste de correlação de Pearson.

As diferenças nas médias da produção de FB₁ em meios sem fungicida (controle) e com fungicida (tratamento) foram submetidas à análise de variância (ANOVA) seguida de teste de Tukey.

Todas as análises foram realizadas utilizando o programa Statistica versão 6.0.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão foram redigidos sob forma de artigos a serem submetidos para publicação, os quais se encontram listados abaixo:

- I. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA FERTILIZAÇÃO NITROGENADA (URÉIA E URÉIA + NBPT) NA CONTAMINAÇÃO DE MILHO POR FUNGOS E FUMONISINAS.
- II. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO FUNGICIDA MAXIM – XL NA EXPRESSÃO GÊNICA E NA PRODUÇÃO DE FUMONISINA B₁ POR *Fusarium verticillioides*.

O primeiro artigo (Avaliação dos Efeitos de Fertilização Nitrogenada na Contaminação de Milho por Fungos e Fumonisinas) teve como objetivo avaliar a contaminação fúngica e os níveis de fumonisinas em milho cultivado na região Norte do Paraná sob diferentes concentrações de duas fontes de fertilizantes nitrogenados (uréia e uréia + NBPT).

O segundo artigo (Avaliação dos Efeitos de Fungicida na Expressão Gênica e na Produção de Fumonisina B₁ por *Fusarium verticillioides*) teve como objetivo avaliar a influência *in vitro* do fungicida Maxim-XL (Syngenta) sobre a expressão de genes relacionados à biossíntese de fumonisinas (*FUM1* e *FUM21*), e sobre a produção de fumonisina B₁ por *Fusarium verticillioides*.

O Anexo 8 mostra as instruções normativas para a publicação de artigos conforme estabelecido pela *Food Additives and Contaminants*. Ressalta-se que a tradução dos artigos para o inglês será efetuada antes da submissão para a *Food Additives and Contaminants*.

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA FERTILIZAÇÃO NITROGENADA (URÉIA E URÉIA + NBPT) NA CONTAMINAÇÃO DE MILHO POR FUNGOS E FUMONISINAS

Resumo

A ocorrência natural de fungos toxigênicos e fumonisinas (B_1 e B_2) foi avaliada em amostras de milho recém-colhido da Região Norte do Paraná, tratado com diferentes tipos (uréia e uréia + inibidor de urease) e doses (80, 160 e 240 Kg/ha) de fertilizante nitrogenado. Os gêneros fúngicos mais freqüentes foram *Fusarium* e *Penicillium* (83,33% e 98,61%, respectivamente), sendo o gênero *Aspergillus* encontrado em baixa freqüência (4,17%). As freqüências de *Penicillium* spp., *Fusarium* spp. e *Aspergillus* spp. não parecem ter relação com a dose e/ou com o tipo de fertilizante nitrogenado utilizado. As fumonisinas foram detectadas em 100% das amostras analisadas, sendo que altas concentrações de fumonisinas (19,49 µg/g) foram encontradas no tratamento ao qual não foi aplicado fertilizante nitrogenado. Embora não tenha havido diferença estatística significativa entre as médias das concentrações de fumonisinas em relação à dose de nitrogênio aplicada, níveis menores de fumonisinas (3,13 µg/g) foram detectados no tratamento 2 (160 Kg/ha de uréia), enquanto que em tratamentos com doses superiores ou inferiores a 160 kg/ha de uréia, houve uma tendência de aumento nos níveis dessas micotoxinas. Além disso, houve correlação negativa significativa (-0,3780; $p < 0,05$) entre dosagens de fertilizantes nitrogenados e contaminação por fumonisinas. Os níveis de fumonisinas detectados em relação ao tipo de fertilizante nitrogenado utilizado não apresentaram diferença estatística significativa. Entretanto houve uma tendência de maior contaminação quando uréia + NBPT foi utilizada. Esses resultados ratificam a importância da fertilização nitrogenada como ferramenta para minimização da ocorrência de fumonisinas, proporcionando maior segurança alimentar para animais e humanos.

Palavras – chave: Milho, Fumonisinas, *Fusarium* spp., Fertilização nitrogenada, Uréia, NBPT.

Introdução

O milho (*Zea mays* L.) é um cereal de importância econômica mundial, constituindo alimento básico em diversos países (DUARTE *et al.*, 2006; MAGALHÃES *et al.*, 2003). O Brasil é o terceiro produtor mundial de milho, tendo produzido aproximadamente 51,4 milhões de toneladas no ano de 2007. O maior produtor nacional é o Estado do Paraná, responsável por 22 a 24% da produção de milho, dependendo do ano (CONAB, 2007).

Este cereal está sujeito à contaminação por fungos toxigênicos, sendo os de maior ocorrência *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. e *Aspergillus* spp. (CHULZE, *et al.*, 1996; CARDWELL, *et al.* 2000). *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg é endêmico de milho, sendo considerado um dos principais responsáveis pela podridão de colmo, raiz e espigas (TANAKA, 2001; MUNKVOLD *et al.*, 1997), além de produzir micotoxinas denominadas fumonisinas (GELDERBLOM *et al.*, 1988; BEZUIDENHOUT *et al.*, 1988).

Embora 28 análogos de fumonisinas tenham sido caracterizados desde 1988, os de maior ocorrência em milho e derivados são fumonisinas B₁ (FB₁), B₂ (FB₂) e B₃ (FB₃). A FB₁ é a mais abundante, representando 70% a 80% da concentração total em alimentos e sementes naturalmente contaminadas, enquanto FB₂ e FB₃ constituem de 15 a 25% e 3 a 8%, respectivamente (RHEEDER *et al.*, 2002).

Estas toxinas causam leucoencefalomalácia em equinos (MARASAS *et al.*, 1988), edema pulmonar em suínos (HARRISON *et al.*, 1990); efeitos hepatóxicos, diarreia, perda de peso e desenvolvimento reduzido em aves (LEDoux *et al.*, 1992; WEIBKING *et al.*, 1993), e efeito hepatocarcinogênico em ratos (GELDERBLOM *et al.*, 1996). Além disso, estudos epidemiológicos sugerem uma correlação entre a ocorrência de fumonisinas em milho e câncer esofágico em humanos nas regiões de Transkei, na África do Sul (GELDERBLOM *et al.* 1988, 1992, THIEL *et al.* 1992,

MARASAS 1995) e Linxian, China (CHU e LI 1994); bem como câncer hepático em Huaian, Fusui e Huantai na China (SUN *et al.*, 2007).

A incidência de *F. verticillioides* e fumonisinas em milho é determinada em parte pelas condições climáticas e geográficas, sistemas de plantio, práticas de cultivo e manejo pós-colheita (MUNKVOLD, 2003; BAPTISTA *et al.*, 2004; REYNERI, 2006).

A fertilização nitrogenada constitui uma das alternativas para minimizar a ocorrência de fumonisinas, uma vez que a biossíntese dessas micotoxinas está relacionada à limitação de nitrogênio (SHIM e WOLOSHUK, 1999). A aplicação de doses mais elevadas de nitrogênio durante o cultivo de milho, em geral reduz a ocorrência de fumonisinas (JONES e DUNCAN, 1981; HASSEGAWA *et al.*, 2008; BLANDINO *et al.*, 2004). Entretanto, o excesso de nitrogênio pode favorecer a contaminação fúngica, em decorrência de um crescimento vegetativo mais prolongado, que aumentaria a exposição das folhas a patógenos, e de maior expansão foliar, que tornaria as paredes celulares mais delgadas e, portanto, mais vulneráveis à penetração fúngica (BLANDINO *et al.*, 2008). Por outro lado, plantas de milho expostas ao estresse por falta de fertilidade do solo também são altamente susceptíveis à infecção por fungos toxigênicos (MILLER, 2001; WIDSTROM, 1996; BLANDINO, 2008;).

A fonte de nitrogênio também influencia na contaminação de milho por micotoxinas. A utilização de uréia está relacionada à menor ocorrência de fumonisinas, enquanto que a utilização de fertilizante de liberação lenta favorece a incidência, uma vez que o fertilizante de liberação lenta pode promover um prolongamento da fase vegetativa (*staygreen*) nas plantas de milho, fornecendo melhores condições para o desenvolvimento fúngico (BLANDINO *et al.*, 2008).

Portanto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a influência de diferentes fontes de nitrogênio (uréia e uréia + inibidor de uréase) e dosagens de fertilizante na contaminação de milho por fungos toxigênicos e fumonisinas.

Material e Métodos

Caracterização da área experimental

O experimento foi conduzido no município de Mauá da Serra (latossolo vermelho, cultivado por 30 anos sob sistema de semeadura direta), região norte do Paraná (23°58' S e 51°19' W, altitude média de 847 m). O clima é do tipo subtropical Cfb (C – clima temperado; f – clima úmido, com precipitação durante todos os meses do ano e inexistência de estação seca definida; b – verão temperado), segundo a classificação de Köppen, com [temperaturas](#) médias entre 16°C e 22°C, [amplitude térmica](#) anual entre 5° C e 9° C, e precipitação de 1300 a 1500 mm/ano.

Sistema de Plantio e Fertilização Nitrogenada

O híbrido de milho simples Pioneer 30F53 foi cultivado semeando cinco sementes por metro linear, em sistema de semeadura direta, no dia 03 de Outubro de 2007. As unidades experimentais (parcelas) constituíram-se de 6 linhas com 8,0 m de comprimento e 0,70 m de espaçamento, considerando-se como área útil as 4 linhas centrais, desprezando-se 1,5 m em cada extremidade. O experimento foi constituído de 8 tratamentos com 5 repetições cada (Tabela 1), envolvendo duas fontes de nitrogênio (Uréia e Ureia + NBPT – [N-(n-butil) triamida tiofosfórica]) e 3 doses de nitrogênio em cobertura (40, 120 e 200 Kg/ha). A aplicação das fontes de nitrogênio foi realizada no dia 05 de Novembro de 2007, sendo que todos os tratamentos receberam 40 Kg/ha de nitrogênio na linha de semeadura, com exceção de um tratamento controle, que foi executado sem aplicação de nitrogênio tanto na semeadura quanto em cobertura. Um outro tratamento controle recebeu somente 40 Kg/ha na semeadura, não sendo submetido à aplicação de fontes de nitrogênio em cobertura.

Amostragem

A amostragem consistiu na coleta de 3 espigas de milho por parcela. As espigas foram debulhadas manualmente, homogeneizadas e armazenadas a -20 °C. Posteriormente, as amostras foram trituradas até granulometria de 50 “mesh”, sendo estocadas a -20 °C para análises posteriores de microbiota fúngica e determinação de fumonisinas.

Avaliação da microbiota fúngica

Uma alíquota de 10 g de milho triturado (50 “mesh”) foi homogeneizada em 90 mL de água peptonada estéril 0,1% (v/v) e submetida a diluições seriadas em tubos contendo 9,0 mL do mesmo diluente até 10^{-5} . Uma alíquota de 1 mL de cada diluição foi transferida para placas de Petri (em duplicata) contendo ágar batata dextrosado (BDA - pH 4,0) adicionado de 50 µg/mL de cloranfenicol. As placas foram incubadas a 25 °C por 6 dias, procedendo-se à contagem e identificação dos gêneros de acordo com os métodos preconizados por NELSON *et al.* (1983), SINGH *et al.* (1991) e SAMSON *et al.* (1995).

Determinação de Fumonisinas

Dez gramas de milho triturado foram adicionados de 30 mL de metanol:água (3:1, v/v), sendo a mistura mantida em repouso por 10 minutos a temperatura ambiente, em seguida agitada em *shaker* (150 rpm, 11 °C) por 30 minutos, e filtrada. Um mililitro das amostras tratadas com metanol:água (3:1, v/v) foi submetido à pré-limpeza utilizando minicoluna de troca aniônica (Sep Pack Accel Plus QMA – Waters), pré – condicionada com 5 mL de metanol e 5 mL de metanol:água (3:1; v/v). A minicoluna foi tratada em seguida com 6 mL de metanol/água (3:1; v/v), seguidos de 3 mL de metanol, a fim de eliminar possíveis interferentes. As fumonisinas foram eluídas

com 10 mL de metanol:ácido acético 5%, posteriormente secos a 45 °C. O resíduo resultante foi dissolvido em 800 µL de metanol:água (3:1, v/v), a seguir fracionado em alíquotas de 200 µL e novamente secos sob fluxo de gás N₂ a 45 °C, procedendo-se ao acondicionamento em freezer (-20 °C) para posterior determinação de fumonisinas.

As fumonisinas foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), de acordo com a metodologia descrita por SHEPHARD *et al.* (1990), modificada por UENO *et al.* (1993). As alíquotas de 200 µL foram redissolvidas em acetonitrila/água (1:1; v/v) e derivatizadas com o-ftaldialdeído (OPA), composto por 40 mg de OPA, 1 mL de metanol, 5 mL de borato de sódio 0.1 M e 50 µL de 2-mercaptoetanol. A análise foi realizada por sistema isocrático de fase reversa (bomba Shimadzu LC-10 AD e detector de fluorescência RF-10A XL), utilizando coluna C₁₈ Nucleosil 100-5 (4,6 x 250 mm, Macherey-Nagel GmbH & Co). Os comprimentos de onda de excitação e emissão utilizados foram 335 e 450nm, respectivamente. A fase móvel consistiu de metanol/tampão fosfato de sódio (CH₃OH:NaH₂PO₄) 0,1 M (80:20, v/v), com pH ajustado para 3,3 com ácido o – fosfórico. O fluxo foi mantido em 1 mL/min, e a temperatura em 25°C.

Análise Estatística

A contagem de *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp. foi submetida à análise de variância (ANOVA) com formação de contrastes para diferenciar os tratamentos. As diferenças nas médias das concentrações de fumonisinas em relação às doses e tipos de fertilizante nitrogenado foram submetidas à análise de variância (ANOVA) seguida de teste de Tukey (p<0,05). A correlação entre as doses de nitrogênio e os níveis de contaminação por fumonisinas foi avaliada pelo teste de correlação de Pearson. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa Statistica versão 6.0.

Resultados e discussão

Na Figura 2 está apresentada a frequência relativa dos principais gêneros fúngicos em 72 amostras de milho provenientes da região Norte do Paraná. Os gêneros *Fusarium* e *Penicillium* foram os gêneros de maior ocorrência com 83,33% e 98,61%, respectivamente, em relação ao gênero *Aspergillus* com 4,17%.

A alta frequência de *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp. está de acordo com os dados relatados por ONO *et al.* (2008), que analisando 615 amostras de milho recém-colhido de duas safras (2003 e 2004) da região norte do Estado do Paraná, detectaram 100% de *Fusarium* spp. em ambas as safras, *Penicillium* spp. em 91,9 a 95,3%, na safra de 2003, e 84,1% na safra de 2004. *Aspergillus* spp. ocorreu em 19,3 a 19,8%, em 2003, e 5,6% das amostras em 2004.

ALMEIDA *et al.* (2002) também demonstraram a predominância de *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp. em 90 amostras de milho em diferentes estágios de maturação em duas regiões do Estado de São Paulo, Capão Bonito (35% e 32%) e Ribeirão Preto (49% e 21%), respectivamente. A baixa frequência observada para o gênero *Aspergillus* pode estar relacionada à competição com outros microrganismos, principalmente os fungos do gênero *Fusarium* (ONO *et al.*, 1999; MARÍN *et al.*, 1999; ZUMMO e SCOTT, 1992).

Os dados de contagem e as frequências absoluta e relativa dos principais gêneros fúngicos detectados em milho, de acordo com o tratamento experimental estão apresentados na Tabela 2. Em geral, as frequências de *Penicillium* spp., *Fusarium* spp. (Figura 3) e *Aspergillus* spp. não parecem ter relação com a dose e/ou com o tipo de fertilizante nitrogenado. Estes resultados contrastam com BLANDINO *et al.* (2008), que, analisando amostras de milho colhidas em três anos (2000, 2001 e 2002) no nordeste da Itália, detectaram um aumento significativo da infecção assintomática por *Fusarium verticillioides* quando o fertilizante de liberação lenta foi utilizado, nas safras de 2000 e 2002. Os autores também demonstraram que a

contaminação por este fungo é menor quando doses balanceadas (100 e 200 kg/ha) de uréia são utilizadas, sendo que a ausência total e o excesso de nitrogênio podem aumentar significativamente a incidência de *F. verticillioides*.

As fumonisinas foram detectadas em 100% das amostras analisadas, sendo que a concentração mostrou tendência de ser influenciada pela fertilização nitrogenada (Tabela 3).

Altos níveis de fumonisinas (19,49 µg/g) foram detectados no Controle 1 (C1), o qual não foi tratado com fertilizante nitrogenado. De modo similar, BLANDINO *et al.* (2008) relataram que o *stress* por falta de nitrogênio aumenta significativamente a contaminação de milho por FB₁. Diversos outros autores também relataram alta incidência de doenças causadas por fungos toxigênicos em milho devido ao *stress* por falta de fertilizante (SHELBY *et al.*, 1994; RODRIGUEZ – DEL – BOSQUE, 1996; MILLER, 2001; MUNKVOLD, 2003).

Apesar de a diferença na concentração de fumonisinas não ser estatisticamente significativa em relação à dose de nitrogênio aplicada, níveis menores de fumonisinas (3,13 µg/g) foram detectados no tratamento 2 (160 Kg/ha de uréia), e tratamentos com doses maiores ou menores que 160 kg/ha de uréia aumentaram os níveis das micotoxinas. Além disso, foi observada uma correlação negativa significativa (-0,3780; $p < 0,05$) entre as dosagens de fertilizantes nitrogenados e a contaminação por fumonisinas (Figura 4).

Diversos autores relatam que a aplicação de doses moderadas de nitrogênio (aproximadamente 200 Kg/ha) em geral reduz a ocorrência de aflatoxinas e fumonisinas (JONES e DUNCAN, 1981; HASSEGAWA *et al.*, 2008; BLANDINO *et al.*, 2004). BLANDINO *et al.* (2008) também demonstraram uma redução nos níveis de fumonisinas em milho com aplicação de doses moderadas de uréia, e que a concentração da micotoxina aumenta não apenas quando há *stress* por falta de nitrogênio, mas também quando o fertilizante nitrogenado é aplicado em excesso (300 a 400 Kg/ha).

A repressão da síntese de fumonisinas em decorrência de nitrogênio foi também observada em estudos *in vitro* em meios de cultivo líquidos por SHIM e WOLOSHUK (1999). A pesquisa desses autores foi executada em meio líquido contendo fosfato de amônio em concentrações de 1,25, 2,5, 10 e 20 mM, sendo constatado que nos meios com menores concentrações de nitrogênio, a síntese de fumonisinas iniciou antes de 18 horas após a inoculação, enquanto que nos meios contendo 10 e 20 mM de fosfato de amônio, a síntese de fumonisinas ocorreu 75 e 125 horas após a inoculação, respectivamente. Além disso, a adição de fosfato de amônio em concentrações de 10 e 20 mM em cultivos de meio sólido constituídos de milho triturado reprimiu a síntese de fumonisinas em 97% e 99%, respectivamente, após uma semana, sendo que a repressão foi observada durante as três semanas totais do experimento. Os dados desses autores demonstram que a biossíntese de fumonisinas é regulada por mecanismos que envolvem a repressão metabólica por nitrogênio, sugerindo que estratégias de controle que visem os elementos regulatórios do metabolismo do nitrogênio podem ser eficientes para reduzir a contaminação de alimentos por fumonisinas.

Os níveis médios de fumonisinas nos tratamentos aos quais foi aplicada uréia foram similares aos daqueles tratamentos onde uréia + NBPT foi utilizada (Tabela 3), sendo que não houve diferença estatística pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Entretanto, os níveis de fumonisinas mostraram uma tendência de serem maiores nos tratamentos em que foi aplicada uréia + NBPT, quando comparados aos níveis dos tratamentos em que apenas uréia foi aplicada (Tabela 3). BLANDINO *et al.* (2008) detectaram aumento nos níveis de FB₁ de 327 µg/g para 1249 µg/g quando utilizado fertilizante de liberação lenta (safra de 2002), fenômeno este que pode ser explicado pelo fato de que o fertilizante de liberação lenta pode promover prolongamento da fase vegetativa (*staygreen*) nas plantas de milho, fornecendo melhores condições para o desenvolvimento de fungos toxigênicos, e conseqüentemente, aumentando os níveis de micotoxinas encontradas em grãos (BLANDINO *et al.*, 2008).

Em suma, os resultados obtidos neste trabalho mostram que o suprimento adequado de nitrogênio em culturas de milho pode ser utilizado para diminuir o risco de contaminação por fumonisinas. Entretanto, não é fácil definir a dose de fertilizante nitrogenado que deve ser aplicado com esse objetivo, uma vez que tanto a produtividade, quanto a contaminação por micotoxinas podem ser também influenciadas por outros fatores e técnicas de cultivo, como tempo de plantio, densidade de plantas, híbridos utilizados, microclima, interação com outros nutrientes, etc. (OTTO e EVERETT, 1956; YOUNTS e MUSGRAVE, 1958; BLANDINO *et al.*, 2008; HASSEGAWA *et al.*, 2008).

A fertilização nitrogenada, em geral, mostra-se como um fator de extrema importância para a contaminação por fumonisinas em grãos de milho, podendo ser utilizada para minimizar os riscos de contaminação por esta micotoxina, proporcionando maior segurança alimentar para animais e seres humanos.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Fundo Paraná/SETI, a Fundação Araucária, CNPq, PPSUS/Ministério da Saúde e CAPES pelo apoio financeiro e pela concessão de bolsa de mestrado a Tatiana de Ávila Miguel.

Referências

- ALMEIDA, P.A.; FONSECA, H.; FANCELLI, A.L.; DIREITO, G.M.; ORTEGA, E.M.; CORREA, B. 2002. Mycoflora and Fumonisin Contamination in Brazilian Corn from Sowing to Harvest. *J. Agric. Food Chem.* 50:3877-3882.
- BAPTISTA, A.S.; HORII, J.; BAPTISTA, A.S. 2004. Fatores Físico – Químicos e Biológicos Ligados à Produção de Micotoxinas. *B.CEPPA – Curitiba.* 22(1):1 – 14.
- BEZUIDENHOUT, S.C.; GELDERBLOM, W.C.A.; GORST-ALLMAN, C.P.; HORAK, R.M.; MARASAS, W.F.O.; SPITELLER, G.; VLEGGAR R. 1988. Structure Elucidation of the Fumonisin, Mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1988:743 – 745.
- BLANDINO, M.; ALMA, A.; MATTA, A.; REYNERY, A. 2004. Best Management Practices to Assure Low Mycotoxin Content of Corn Kernel During Production. *Intern. Qual. Grains Conf. Proc., Indianápolis, Indiana, USA.*
- BLANDINO, M.; REYNERI, A.; VANARA, F. 2008. Influence of Nitrogen Fertilization on Mycotoxin Contamination of Maize Kernels. *Crop Protec.* 27:222 – 230.
- CARDWELL, K.F.; KING, J.G.; MAZIYA-DIXON, B.; BOSQUE-PEREZ, N.A. 2000. Interactions Between *Fusarium verticillioides*, *Aspergillus flavus*, and Insect Infestation in Four Maize Genotypes in Lowland Africa. *Phytopathol.* 90:276–284.
- CHU, F. S.; LI, G.Y. 1994. Simultaneous Occurrence of Fumonisin B₁ and Other Mycotoxins in Moldy Corn Collected from the Peoples' Republic of China in Regions with High Incidences of Esophageal Cancer. *Appl. Environm. Microbiol.* 60:847 – 852.
- CHULZE, S.N.; RAMIREZ, M.L.; FARNOCHI, M.; PASCALE, M.; VISCONTI, A.; MARCH, G. 1996. *Fusarium* and Fumonisin Occurrence in Argentinian Corn at Different Ear Maturity Stages. *J. Agric. Food Chem.* 44:2797–2801.
- CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO: Safras de grãos: Brasil/produtores [Internet]. 2007. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>.

DUARTE, J.O.; CRUZ, J.C.; GARCIA, J.C.; MATTOSO, M.J: Cultivo do Milho. EMBRAPA Milho e Sorgo – Sistema de Produção 1, versão eletrônica – 2ª edição [Internet], 2006. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br>>.

GELDERBLOM, W. C. A., SAMPLE, E., MARASAS, W. F. O. 1992. The Cancer Initiating Potential of the Fumonisin B Mycotoxins. *Carcinogen*. 13:433 – 437.

GELDERBLOM, W. C. A., SNYMAN, S. D., ABEL, S., LEBEPE-MAZUR, S., SMUTS, C. M., VAN DER WESTHUIZEN, L., MARASAS, W. F. O., VICTOR, T. C., KNASMÜLLER, S., HUBER, W. 1996. Hepatotoxicity and Carcinogenicity of the Fumonisin in Rats: a Review Regarding Mechanistic Implications for Establishing Risk in Humans. *Fumonisin in Food*, edited by L. S. Jackson, J. W. De Vries and L. B. Bullerman (NY Plen. Press). 279 – 296.

GELDERBLOM, W.C.A.; JASKIEWICZ, K.; MARASAS, W.F.O.; THIEL, P.G.; HORAK, R.M.; VLEGGAR R.; KRIEK, N.P.J. 1988. Fumonisin – Novel Mycotoxins With Cancer-Promoting Activity Produced by *Fusarium moniliforme*. *Appl. Environm. Microbiol.* 54:1806 – 1811.

HARRISON, L. R., COLVIN, B.M., GREENE, J. T., NEWMAN, L.E., COLE, J.R. 1990. Pulmonary Edema and Hydrothorax in Swine Produced by Fumonisin B₁, a Toxic Metabolite of *Fusarium moniliforme*. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2:217 – 221.

HASSEGAWA, R.H.; FONSECA, H.; FANCELLI, A.L.; SILVA, V.N.; SCHAMMASS, E.A.; REIS, T.A.; CORREA, B. 2008. Influence of Macro and Micronutrient Fertilization on Fungal Contamination and Fumonisin Production in Corn Grains. *Food Control*. 19:36 – 43.

JONES, R.K.; DUNCAN, H.E. 1981. Effect of Nitrogen Fertilizer, Planting Date and Harvest Date on Aflatoxin Production in Corn Inoculated with *Aspergillus flavus*. *Plant Dis.* 65:741 – 747.

LEDOUX, D. R., BROWN, T. P., WEIBKING, T. S., ROTTINGHAUS, G. E. 1992. Fumonisin Toxicity in Broiler Chicks. *J. Vet. Diagn. Invest.* 4:330 – 333.

MAGALHÃES, P.C.; DURÃES, F.O.M.; CARNEIRO, N.P.; PAIVA, E. 2003. Fisiologia do Milho. *Min. Agric. Pec. Abastec. – Circ. Téc.* 22:65.

MARASAS, W. F. O. 1995. Fumonisin: Their Implications for Human and Animal Health. *Nat. Toxins*. 3:193 – 198.

MARASAS, W. F. O., KELLERMAN, T. S., GELDERBLOM, W. C. A., THIEL, P. G., COETZER, J. A. W. 1988. Leukoencephalomalacia in a Horse Induced by Fumonisin B₁, Isolated from *Fusarium moniliforme*. *J.Vet.Res.* 55:197 – 203.

MARÍN, S.; MAGAN, N.; BELLI, N.; RAMOS, A.J.; CANELA, R.; SANCHIS, V. 1999. Two Dimensional Profiles of Fumonisin B₁ Production by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* in Relation to Environmental Factors and Potential for Modeling Toxin Formation in Maize Grain. *Intern. J. Food Microbiol.* 51:159–167.

MILLER, J.D. 2001. Factors that Affect the Occurrence of Fumonisin. *Environmental Health Persp.* 109(2):321 – 324.

MUNKVOLD, G.P. 2003. Cultural and Genetic Approaches to Managing Mycotoxins in Maize. *Annual Rev. Phytopathol.* 41:99–116.

MUNKVOLD, G.P.; McGEE, D.C.; CARLTON, W.M. 1997. Importance of Different Pathways for Maize Kernel Infection by *Fusarium moniliforme*. *Phytopathol.* 87(2):209 – 217.

NELSON, P.E., TOUSSON, T.A., MARASAS, W.F.O. 1983. *Fusarium Species – An Illustrated Manual for Identification*. Penns. St. Univ. Press.

ONO, E.Y.S.; SUGIURA, Y.; HOMECHIM, M.; KAMOGAE, M.; VIZZONI, E.; UENO, Y.; HIROOKA, E.Y. 1999. Effect of Climatic Conditions on Natural Mycoflora and Fumonisin in Freshly Harvested Corn of the State of Paraná, Brazil. *Mycopathol.* 147:139-148.

ONO, E.Y.S.; SILVA, M.; HASHIMOTO, E.H.; VIZONI, E.; KAWAMURA, O.; SUGIURA, Y.; HIROOKA, E.Y. 2008. Mycotoxicological Quality Evaluation of Corn Samples Used by Processing Industries in the Northern region of Paraná State, Brazil. *Food Add. Cont.* 25(11):1392–1399.

OTTO, H.J.; EVERETT, H.L. 1956. Influence of Nitrogen and Potassium Fertilization on the Incidence of Stalk Rot of Corn. *Agron. J.* 48:301 – 305.

REYNERI, A. 2006. The Role of Climatic Condition on Micotoxin Production in Cereal. Vet. Res. Commun. 30(1):87–92.

RHEEDER, J.P.; MARASAS, W.F.O.; VISMER, H.F. 2002. Production of Fumonisin Analogs by *Fusarium* Species. Applied and Environm. Microbiol. 68(5):2101-2105.

RODRIGUEZ – DEL – BOSQUE, L.A. 1996. Impact of Agronomic Factors on Aflatoxin Contamination in Preharvest Field Corn in Northeastern Mexico. Plant Dis. 80:988 – 993.

SAMSON, R.A., HOESKSTRA, E.S., FRISVAD, J.C., FILTENBORG, O. 1995. Introduction to Food-Borne Fungi. 4.ed. The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures.

SHELBY, R.A.; WHITE, D.G.; BAUSKE, E.M. 1994. Differential Fumonisin Production in Maize Hybrids. Plant Dis. 78:582 – 584.

SHEPHARD, G.S., SYDENHAM, E.W., THIEL, P.G., GELDERBLUM, W.C.A. 1990. Quantitative Determination of Fumonisin B₁ and B₂ by High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. J. Liq. Chromat. 13:2077-2087.

SHIM, W.B.; WOLOSHUK, C.P. 1999. Nitrogen Repression of Fumonisin B₁ Biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*. Fems Microbiol. Let. 177:109 – 116.

SINGH, K., FRISVAD, J.C., THRANE, U., MATHUR, S.B. 1991. An Illustrated Manual on Identification of Some Seed-Borne *Aspergilli*, *Fusaria*, *Penicillia* and Their Mycotoxins. Hellerup/Denmark/: Danish Government.

SUN, G.; WANG, S.; HU, X.; SU, J.; HUANG, T.; YU, J.; TANG, L.; GAO, W.; WANG, J.S. 2007. Fumonisin B₁ Contamination of Home-Grown Corn in High-Risk Areas for Esophageal and Liver Cancer in China. Food Add. Cont. 24(2):181 – 185.

TANAKA, M.A.S. 2001. Sobrevivência de *Fusarium moniliforme* em Sementes de Milho Mantidas em Duas Condições de Armazenamento. Fitopatol. Bras. 26:60-64.

THIEL, P. G., MARASAS, W. F. O., SYDENHAM, E. W., SHEPHARD, G. S., GELDERBLOM, W. C. A. 1992. The Implications of Naturally Occurring Levels of Fumonisin in Corn for Human and Animal Health. *Mycopathol.* 117:3 – 9.

UENO, Y., AOYAMA, S., SUGIURA, Y., WANG, D.S., LEE, U.S., HIROOKA, E.Y., HARA, S., KARKI, T., CHEN, G., YU, S.Z. 1993. A Limited Survey of Fumonisin in Corn and Corn-Based Products in Asian Countries. *Mycotox. Res.* 9:27-34.

WEIBKING, T. S., LEDOUX, D. R., BERMUDEZ, A. J., TURK, J. R., ROTTINGHAUS, G. E., WANF, E., MERRILL, A. H. 1993. Effects of Feeding *Fusarium moniliforme* Culture Material, Containing Known Levels of Fumonisin B₁ on the Young Broiler Chick. *Poultry Sci.*, 72:456 – 466.

WIDSTROM, N.W. 1996. The Aflatoxin Problem with Corn Grain. In: BLANDINO, M.; REYNERI, A.; VANARA, F. 2008. Influence of Nitrogen Fertilization on Mycotoxin Contamination of Maize Kernels. *Crop Protec* 27:222 – 230.

YOUNTS, S.E.; MUSGRAVE, R.B. 1958. Chemical Composition, Nutrient Absorption and Stalk Rot Incidence of Corn as Affected by Chloride in Potassium Fertilizer. *Agron. J.* 50:426 – 429.

ZUMMO, N.; SCOTT, G. E. 1992. Interaction of *Fusarium moniliforme* and *Aspergillus flavus* on Kernel Infection and Aflatoxin Contamination in Maize Ears. *Plant Dis.* 76:771 – 773.

Figures Captions

Figura 1 – Localização da área experimental, mostrando o Estado do Paraná e o Município de Mauá da Serra, local da área experimental.

Figura 2 – Análise da microbiota fúngica – frequência relativa de fungos isolados em amostras de milho ($n = 72$) recém colhido da região norte do Estado do Paraná.

Figura 3 – Análise da frequência relativa de *Fusarium* spp. em 72 amostras de milho tratado com dois tipos diferentes de fertilizantes nitrogenados (uréia e uréia + NBPT).

Figura 4 – Correlação entre níveis de fumonisinas totais (em $\mu\text{g/g}$) e doses de fertilizante nitrogenado (em Kg/ha). A equação $y = 14,771 - 0,0419x$ foi obtida com o coeficiente de correlação de $-0,3780$ ($p < 0,05$).

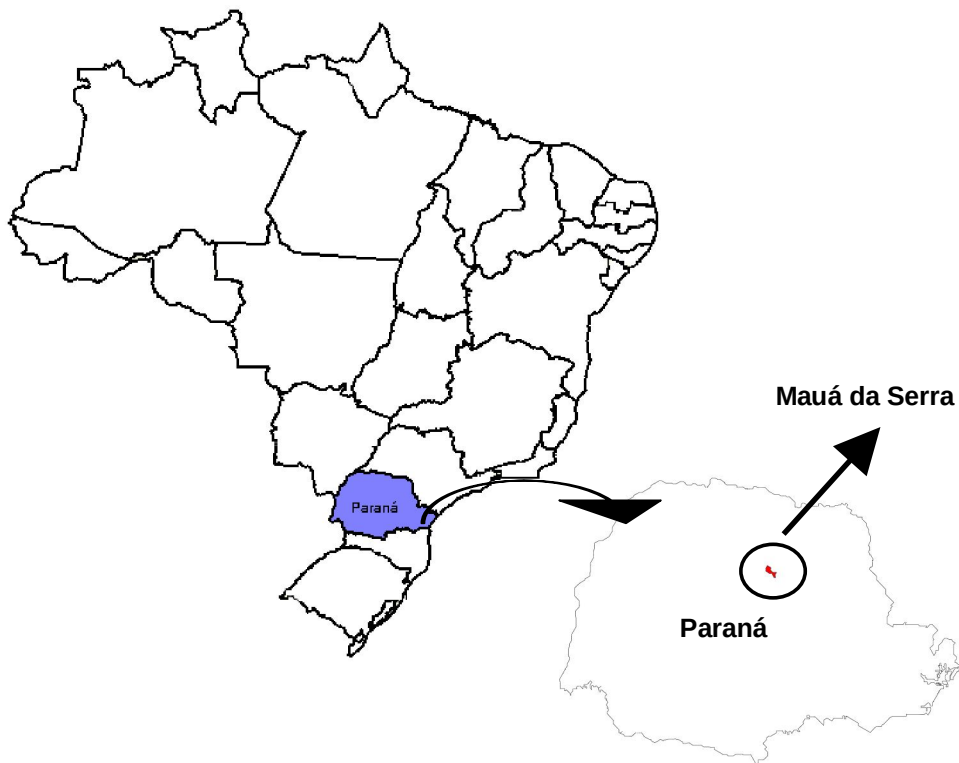


Figura 1

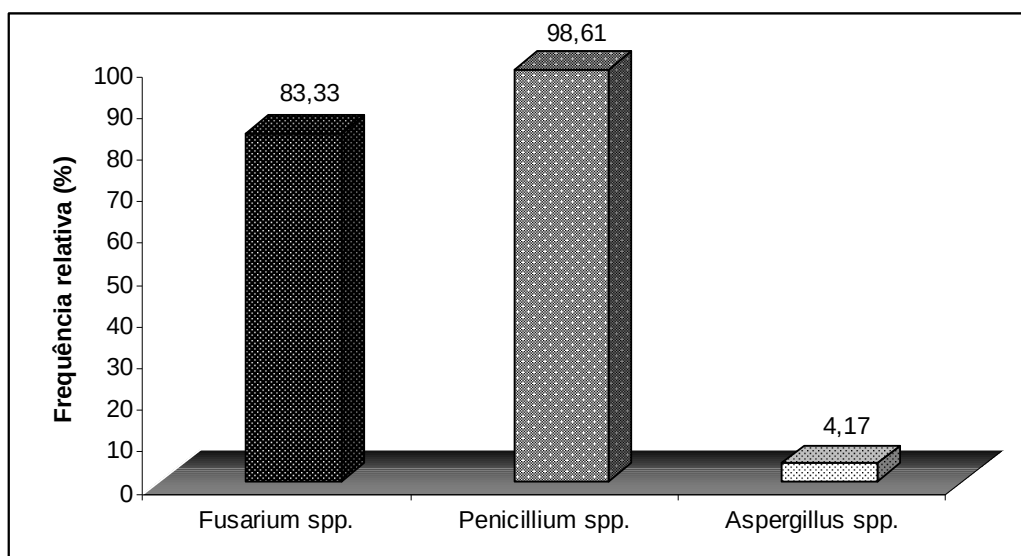


Figura 2

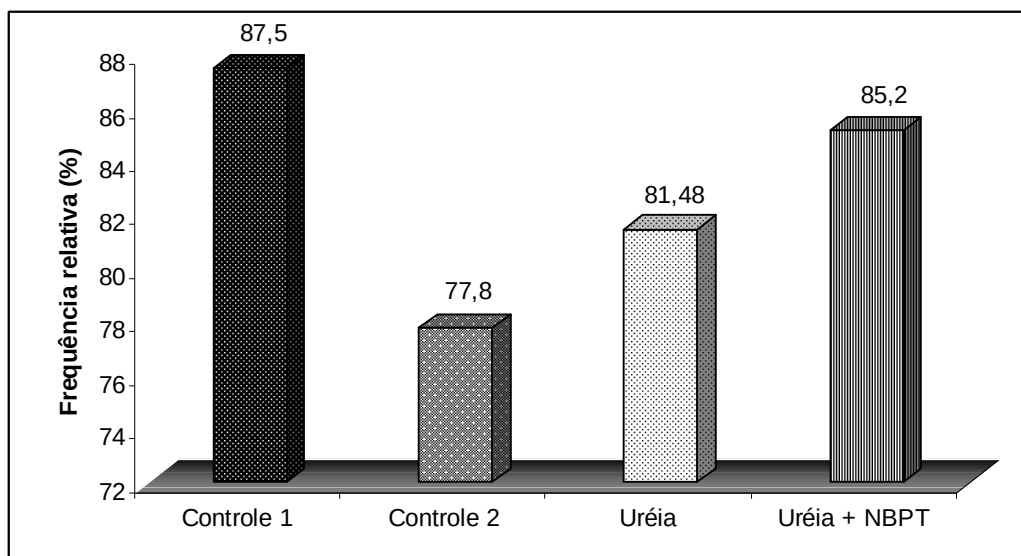


Figura 3

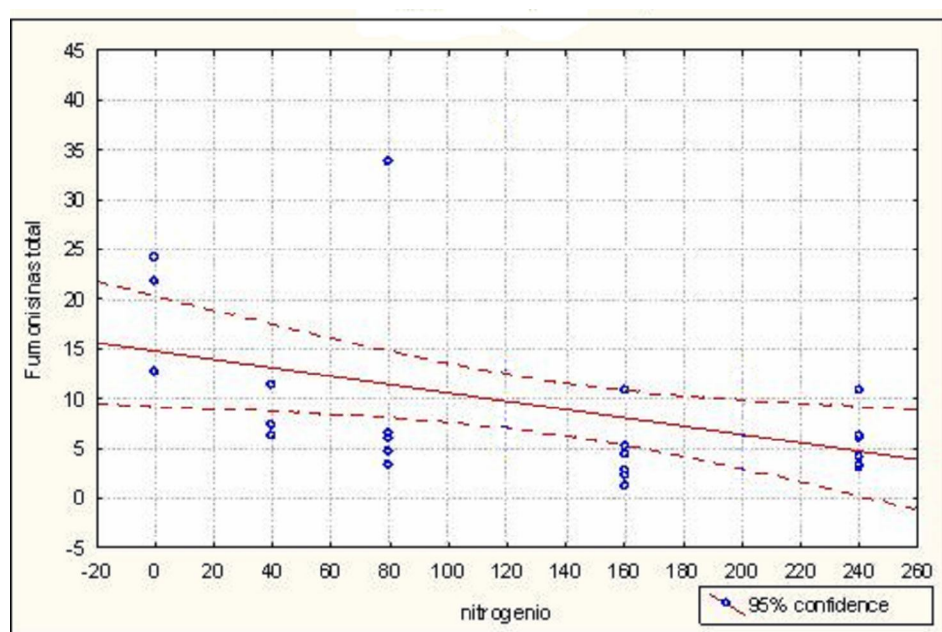


Figura 4

Tabela 1 – Fontes e doses de fertilizante nitrogenado

Tratamento	N Plantio	N Cobertura	N Total	Fonte de N
	Kg/ha			
Controle 1	0	0	0	---
Controle 2	40	0	40	---
1	40	40	80	Uréia
2	40	120	160	Uréia
3	40	200	240	Uréia
4	40	40	80	Uréia + NBPT
5	40	120	160	Uréia + NBPT
6	40	200	240	Uréia + NBPT

Tabela 2 – Perfil de contagem, frequência absoluta e relativa de *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. em amostras de milho submetido a diferentes tratamentos com fertilização nitrogenada na região norte do Paraná

Tratamento	Nitrogênio Total		<i>Fusarium</i> spp.			<i>Aspergillus</i> spp.			<i>Penicillium</i> spp.		
	Fonte	Kg/há	UFC/g*	FA	FR	UFC/g	FA	FR	UFC/g*	FA	FR
Controle 1 (n=9)	-----	-----	6,42x10 ⁴ a	8	88,89	ND	-----	-----	2,28x10 ⁵ a	9	100
Controle 2 (n=9)	-----	40	3,95x10 ³ a	7	77,78	1,52x10 ³	2	22,22	2,46x10 ⁴ a	9	100
1 (n=9)	Uréia	80	2,40x10 ⁴ a	7	77,78	4,2x10 ⁴	1	11,11	3,08x10 ⁴ a	9	100
2 (n=9)	Uréia	160	3,74x10 ⁴ a	7	77,78	ND	-----	-----	4,41x10 ⁵ a	9	100
3 (n=9)	Uréia	240	1,86x10 ⁴ a	8	88,89	ND	-----	-----	2,71x10 ⁵ a	9	100
4 (n=9)	Uréia + NBPT	80	8,86x10 ⁴ a	7	77,78	ND	-----	-----	2,53x10 ⁵ a	9	100
5 (n=9)	Uréia + NBPT	160	2,71x10 ⁵ a	8	88,89	ND	-----	-----	3,22x10 ⁵ a	9	100
6 (n=9)	Uréia + NBPT	240	2,14x10 ⁵ a	8	88,89	ND	-----	-----	1,15x10 ⁵ a	8	88,89
TOTAL (n=72)			10 ³ – 10 ⁵	60	83,33	10 ³ – 10 ⁴	3	4,17	10 ⁴ – 10 ⁵	71	98,61

FA = frequência absoluta

FR (%) = frequência relativa

UFC = unidades formadoras de colônia

ND = não detectado

* Médias seguidas da mesma letra não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

Tabela 3 – Níveis médios de fumonisinas em amostras de milho cultivadas no norte do Paraná de acordo com as doses e fontes de fertilização nitrogenada utilizadas nos tratamentos.

Tratamento*	Nitrogênio Total		FB ₁ (µg/g)	FB ₂ (µg/g)	FBT (µg/g)**
	Fonte	Kg/ha			
C1	-----	-----	11,10	8,39	19,49 ^a
C2	-----	40	4,10	4,17	8,27 ^a
1	Uréia	80	3,36	1,46	4,82 ^a
2	Uréia	160	2,19	0,94	3,13 ^a
3	Uréia	240	2,56	2,60	5,16 ^a
4	Uréia +NBPT	80	3,78	3,19	6,97 ^a
5	Uréia +NBPT	160	4,01	3,70	7,72 ^a
6	Uréia +NBPT	240	8,20	6,59	14,79 ^a

FBT = fumonisinas totais (FB₁ + FB₂)

* Média de três repetições

** Médias seguidas da mesma letra não apresentaram diferença significativa pelo teste de Tukey (p<0,05)

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO FUNGICIDA MAXIM – XL NA EXPRESSÃO GÊNICA E NA PRODUÇÃO DE FUMONISINA B₁ POR *Fusarium verticillioides*

Resumo

A influência do fungicida Maxim – XL na expressão de *FUM1* e *FUM21*, e na produção de fumonisina B₁ (FB₁) por *F. verticillioides* foi avaliada. Os cultivos sem fungicida apresentaram produção média de 0,71 µg/mL de FB₁, equivalente a 31% da produção média de FB₁ dos cultivos com adição de fungicida (2,31 µg/mL). Não foi observada correlação entre a produção de FB₁ e a expressão do gene *FUM1*, e a expressão do gene *FUM21* foi levemente estimulada pelo fungicida. *FUM21* é regulador da transcrição de *FUM1*, sendo esperado que as expressões de ambos os genes apresentassem correlação entre si e com a produção de FB₁. Uma vez que esta correlação não foi observada, algumas hipóteses são discutidas. Maxim – XL poderia influenciar na expressão de outros genes da via de biossíntese de fumonisinas. Além disso, *FUM21* apresenta formas alternativas de *splice*, e o transcrito detectado para esse gene pode não estimular a expressão de *FUM1*. Transportadores celulares ABC podem ter sua expressão e/ou atividade aumentada em meios tóxicos. *FUM19* codifica para um transportador ABC, que atua no efluxo de fumonisinas, e poderia atuar no efluxo de fungicida, aumentando os níveis da toxina no meio extracelular. A ação do fungicida sobre MAP quinases, poderia alterar a morfologia celular, que combinada à agitação utilizada durante o cultivo, propiciaria a lise celular e a liberação do conteúdo intracelular de fumonisinas. Os resultados apresentados fornecem evidências sobre a influência de Maxim – XL sobre a produção de FB₁ por *F. verticillioides*, e ratificam a importância da compreensão do mecanismo de ação de fungicidas sobre fungos toxigênicos e produção de micotoxinas para a minimização da sua ocorrência.

PALAVRAS – CHAVE: Fumonisina B₁, Fungicida, Maxim – XL, *Fusarium verticillioides*, *FUM1*, *FUM21*, Expressão gênica.

Introdução

As fumonisinas são micotoxinas produzidas principalmente por *F. verticillioides* em milho (MARASAS, 2001; RHEEDER *et al.*, 2002), e causam leucoencefalomalácia em equinos (MARASAS *et al.*, 1988), edema pulmonar em suínos (HARRISON *et al.*, 1990); efeitos hepatóxicos, diarreia, perda de peso e desenvolvimento reduzido em aves (LEDOUX *et al.*, 1992; WEIBKING *et al.*, 1993), e efeito hepatocarcinogênico em ratos (GELDERBLOM *et al.*, 1996). Além disso, estudos epidemiológicos sugerem uma correlação com a ocorrência de câncer esofágico em seres humanos nas regiões de Transkei, na África do Sul (GELDERBLOM *et al.* 1988, 1992, THIEL *et al.* 1992, MARASAS 1995) e Linxian, China (CHU e LI 1994); e com a ocorrência de câncer hepático em Huaian, Fusui e Huantai na China (SUN *et al.*, 2007).

Desde sua descoberta em 1988 por GELDERBOM *et al.*, 28 análogos foram descritos e caracterizados (séries A, B, C e P). Os da série B ocorrem naturalmente em concentrações significativas em milho e derivados, sendo que a fumonisina B₁ (FB₁) compreende de 70 a 80% do total de fumonisinas (RHEEDER *et al.*, 2002).

As fumonisinas da série B são sintetizadas pela via das policetidas, e as enzimas que catalisam as reações de síntese são codificadas pelos genes *FUM*, contidos em um *cluster* com 17 genes caracterizados. Onze destes genes são previstos como codificadores de enzimas (*FUM1* – *FUM3*; *FUM6* – *FUM8*; *FUM10*; *FUM13* – *FUM16*) (BUTCHKO *et al.*, 2006). *FUM1* codifica para a enzima (Fum1p) que catalisa o primeiro passo da biossíntese de fumonisinas, sendo essencial à produção das mesmas, uma vez que a interrupção deste gene provocou bloqueio na produção das toxinas (PROCTOR *et al.*, 1999; SEO *et al.*, 2001; BOJJA *et al.* 2004).

Apesar de o conhecimento a respeito da regulação da biossíntese de fumonisinas ser ainda limitado, alguns genes foram relatados como influentes no

processo, como *FCC1* (WOLOSHUK e SHIM, 2001), *PAC1* (FLAHERTY *et al.*, 2003), *ZFR1* (FLAHERTY e WOLOSHUK, 2004) e *FUM21* (BROWN *et al.*, 2007).

O único gene regulador que está presente dentro do *cluster* das fumonisinas é o *FUM21*. A presença de um domínio Zn(II)₂Cys₆ na proteína prevista para esse gene sugere que ele esteja envolvido na regulação transcricional, sendo que a sua deleção cessou a produção de fumonisinas (BROWN *et al.*, 2007).

A aplicação de fungicidas em culturas de milho visa minimizar os danos provocados por *F. verticillioides* e fumonisinas. Entretanto, alguns estudos demonstram que a aplicação de fungicidas pode aumentar a produção de micotoxinas por algumas espécies de fungos. MUSS e FRANK (1985) demonstraram que diferentes concentrações de tridemorfe influenciaram o crescimento e a produção de toxina T-2 por *F. sporotrichioides*. Baixas concentrações, variando de 6 a 8 µg/mL, não foram suficientes para controlar o crescimento do fungo, porém reduziram a produção de toxina T-2 e diacetoxiscirpenol (DAS). Concentrações mais elevadas (30 a 50 µg/mL) inibiram o crescimento fúngico em mais de 50%, mas aumentaram a produção de toxina T-2 em 5 vezes. Além disso, estudos realizados com *Fusarium culmorum* demonstraram que a presença de procloraz e tebuconazole, em concentrações de 2 e 8 µg/mL no meio de cultivo, promoveram aumento da expressão do gene *Tri5*, que codifica para a tricodieno sintase, enzima que catalisa a primeira reação na biossíntese de tricotecenos, podendo induzir a produção dessas micotoxinas (DOOHAN *et al.*, 1999).

Por outro lado, SIRANIDOU e BUCHENAUER (2001) demonstraram que a aplicação de tebuconazole e metconazole reduziu a incidência de doenças provocadas por *F. culmorum* no trigo em 60 a 70%, e o conteúdo de desoxinivalenol (DON) em 50 a 70%. DRAUGHTON e CHURCHVILLE (1983) demonstraram que o tratamento de sementes de milho com 50 µg/mL de maneb para infecções provocadas por *F. graminearum* proporcionou boa qualidade de controle tanto do crescimento fúngico quanto da produção de zearalenona (ZEA), *in vivo* e *in situ*.

A eficiência da proteção química depende, portanto, do tipo e dose de fungicida aplicado, e do fungo patogênico que deve ser controlado (KOLOMBET *et al.*, 2006; MAGAN *et al.*, 2002).

O fato da aplicação de fungicidas poder estimular a produção de micotoxinas é de extrema importância, uma vez que, atualmente, o controle de *F. verticillioides* em milho é realizado principalmente com a utilização de fungicidas. Muitos são os fungicidas utilizados no Brasil, e regulamentados pela ANVISA, entretanto, um dos fungicidas mais utilizados é o fludioxonil + metalaxyl – M, que de acordo com GOULART & FIALHO (2001), proporcionou acréscimo de 56% no rendimento de grãos. MORAES *et al.* (2003) também demonstraram que os princípios ativos mais eficazes para o controle de *F. verticillioides in vitro* foram captan + tiabendazole, seguidos de fludioxonil + metalaxyl – M.

Apesar de promoverem controle no crescimento e incidência de *F. verticillioides*, não há estudos evidenciando o efeito de fludioxonil + metalaxyl – M em relação à produção de fumonisinas. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a influência de Maxim – XL (Syngenta) na expressão dos genes *FUM1* e *FUM21*, e na produção de FB₁ por *F. verticillioides*.

Material e Métodos

Cepa de Fusarium verticillioides

Foi utilizada a cepa 103 F de *Fusarium verticillioides*, gentilmente cedida pela Prof^a. Dr^a. Elisa Yoko Hirooka, do Departamento de Ciências e Tecnologia de Alimentos (DCTA) – Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Londrina.

Cultivo de *Fusarium verticillioides*

Foi utilizado meio líquido definido (JIMÉNEZ *et al.*, 2003), com a seguinte composição em 1 litro: 0,5 g de extrato de malte; 1 g de extrato de levedura; 1 g de peptona micológica; 1 g de KH_2PO_4 ; 0,3 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,3 g de KCl; 1 ml de solução de $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ a 0,05 g/L e 1 ml de solução de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a 0,01 g/L, 20 g/L de frutose. O meio de cultura foi autoclavado a 120 °C por 20 minutos, com exceção da frutose, que foi esterilizada separadamente em vapor fluente por 40 minutos, e posteriormente adicionada assepticamente aos outros componentes do meio de cultivo.

Uma suspensão de esporos (10^6 esporos/mL) de *F. verticillioides* 103 F cultivada em ágar batata dextrose (BDA) por 7 dias a 25 °C foi inoculada em frascos Erlenmeyer contendo 50 mL de meio líquido definido (JIMÉNEZ *et al.*, 2003). Nos tratamentos foi adicionado o fungicida Maxim – XL (Syngenta) 24 horas após a inoculação, na dose recomendada (D.R.) pelo fabricante (150 mL de fungicida para cada 100 Kg de sementes – proporcionalmente, 75 µL de fungicida em 50 mL de meio líquido definido). Aos cultivos controle foram adicionados 75 µL de água ultra-pura estéril 24 horas após a inoculação. Todos os cultivos foram incubados em *shaker* (180 rpm, 28 °C) por 10 dias para análises de expressão gênica, e por 14 dias para determinação de fumonisinas. O tempo de incubação dos cultivos foi determinado por estudos prévios de cinética de crescimento e produção de fumonisina por *F. verticillioides*.

Extração e Purificação de RNA

A biomassa obtida por meio de filtração a vácuo foi macerada em nitrogênio líquido e 10 mg de micélio triturado foram utilizados para extrair o RNA total com 750 µL de reagente TRIzol-LS® (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante, com algumas modificações. O RNA extraído foi tratado com clorofórmio, clorofane

(fenol:clorofórmio:álcool isoamílico; 25:24:1, v/v) e clorofil (clorofórmio:álcool isoamílico; 24:1, v/v), respectivamente, e centrifugado. O sobrenadante resultante (80 μ L) foi tratado com DNase (5 U) por 15 minutos a 37 °C. O RNA foi então tratado com clorofane e clorofil, e precipitado com isopropanol, seguindo incubação (1 hora a -20 °C), centrifugação e posterior descarte do sobrenadante. O precipitado foi lavado com etanol 70%, e em seguida o RNA mantido em gelo até secagem total.

O RNA extraído foi solubilizado em água DEPC (água tratada com dietil pirocarbonato), e mantido a -20 °C para posterior análise da pureza, quantificação e utilização para transcrição reversa e PCR em tempo real.

Análise de Pureza e Quantificação de RNA

O RNA extraído foi diluído (1:100) em tampão TE pH 8,0 (Tampão Tris-EDTA – 10 mM Tris, 1 mM EDTA), e a absorvância medida a 260 e 280 nm em espectrofotômetro Shimadzu (UV – 1650PC), acoplado a software de análise da mesma marca, através do qual o RNA foi quantificado utilizando-se a absorvância obtida em 260 nm (considerando-se que uma unidade de absorvância a 260 nm equivale a 40 μ g de RNA). A pureza em relação a proteínas estimada a partir da relação entre as leituras efetuadas em 260 e 280 nm. O RNA foi considerado livre de proteínas quando a razão entre 260 e 280 nm resultou em valores de 1,9 a 2,1.

Síntese de DNA Complementar

A reação de transcrição reversa foi realizada com 1 μ L de RNA total (500 ng/ μ L), 4 μ L de *primer* oligo [dT] 2,5 mM, acrescentados de 2 μ L de dNTP 2,5 mM e 6 μ L de água DEPC. As amostras foram incubadas no termociclador por 5 minutos a 65 °C, seguido de incubação em gelo para acréscimo de 1 μ L de transcriptase reversa (MMLV RT – 5000 U) e tampão de RT – PCR 5X (Tris – HCl 250 mM, pH 8,3; KCl 375 mM; MgCl₂ 15 mM e ditiotreitol 100 mM), e outra incubação a 37 °C por 50 minutos,

finalizando com um ciclo de 70 °C durante 15 minutos. Todos os cDNA sintetizados foram armazenados a -20 °C, e posteriormente utilizados para PCR em tempo real.

Primers

Os *primers* utilizados para a amplificação de uma região dos genes *FUM21*, *FUM1* e *TUB2* foram desenhados pela Prof^a. D^{ra}. Maria Helena Pelegrinelli Fungaro, com auxílio do *software Gene Runner* versão 3.05, a partir das seqüências disponíveis no *GenBank*. As seqüências dos *primers* utilizados para os experimentos de PCR em tempo real são mostradas a seguir: *FUM21* (*GenBank*: AF155773), *amplicon* 110pb, FUM21FP: 5' – CGACTAATACTGAGGCAACAG – 3', FUM21RP: 5' – GCGGTATCTGCTGGGTTGAC – 3'; *FUM1* (*GenBank*: AF155773), *amplicon* 206 pb, FUM1FP: 5' – CACCGCCCTTCCTATCACAC – 3', FUM1RP: 5' – GGTTC AAGACATCGCCCCG – 3'; *TUB2* (*GenBank*: U27303), *amplicon* 193 pb, TUB2FP: 5' – CTGCTCATTTCCAAGATCCGC – 3', TUB2RP: 5' – GTAGTTGAGGTCACCGTAGG – 3'.

As reações em cadeia da polimerase (PCR) para o teste dos *primers* foram realizadas em termociclador *MJ Research* (PTC – 100TM), utilizando-se 2,5 µL de tampão 1X (10X concentrado – Tris – HCL pH 8.4 200 mM; KCl 500 mM), 1,0 µL de MgCl₂ 50 mM, 2,0 µL de dNTP 2,5 mM, 0,2 µL de *Taq polimerase* (1U), 1 µL de cada *primer* (10 pmol/µL) e 1 µL de cDNA obtido a partir de 500 ng de RNA total do controle (sem fungicida) e do tratamento (com fungicida). Foram realizadas reações de PCR padrão para estabelecer a temperatura de anelamento a ser utilizada (posteriormente estabelecida em 60 °C). Em seguida, os *primers* foram testados (anelamento em 60 °C), e os fragmentos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, e visualizados sob luz ultravioleta.

PCR em Tempo Real

As reações de PCR em tempo real foram realizadas em termociclador *MJ Research* PTC – 200™ acoplado ao detector de fluorescência *Chromo4* (*MJ Research*), seguindo as condições: 5 minutos a 95 °C, 40 ciclos de 20 segundos a 95 °C (desnaturação), 30 segundos a 60°C (anelamento) e 20 segundos a 72 °C (síntese), e finalmente 72 °C por 5 minutos, com curva de *melting* de 50 °C a 95 °C (leitura a cada 0,5 °C, *hold* 2 segundos).

As misturas de reação continham 9,5 µL de água DEPC, 0,5 µL de cada *primer* (10 pmol/µL), 12,5 µL de *mix* SYBR Green® (Invitrogen) e 2 µL de cDNA do controle (sem fungicida) ou do tratamento (com fungicida), totalizando um volume de 25 µL. Controles negativos (branco), aos quais não foi adicionado cDNA, foram utilizados para a detecção de possíveis contaminações. Os resultados foram analisados utilizando o *software* *Opticon Monitor* versão 3.1, e normalizados aos resultados obtidos para o gene *TUB2*, cuja expressão é constitutiva em *F. verticillioides*. A quantificação da expressão gênica baseou-se na fórmula determinada por PFAFFL (2001): $E_{\text{target}}^{\Delta\text{Ct target (control - sample)}} / E_{\text{reference}}^{\Delta\text{Ct reference (control - sample)}}$; onde E_{target} e $E_{\text{reference}}$ são as eficiências obtidas para os genes alvo e controle, respectivamente, e $\Delta\text{Ct target}$ e $\Delta\text{Ct reference}$ são os valores de *Ct (cycle threshold)* obtidos para os genes alvo e controle, respectivamente.

Extração de Fumonisinas

Um mililitro do extrato livre de células foi misturado a 1 mL de metanol:água (3:1, v/v), sendo a mistura agitada em *vortex* por 1 minuto. Um mililitro das amostras tratadas com metanol:água (3:1, v/v) foi submetido à pré-limpeza utilizando minicolumna de troca aniônica (Sep Pack Accel Plus QMA – Waters), pré – condicionada com 5 mL de metanol e 5 mL de metanol:água (3:1; v/v). A minicolumna foi tratada em seguida

com 6 mL de metanol/água (3:1; v/v), seguidos de 3 mL de metanol, a fim de eliminar possíveis interferentes. As fumonisinas foram eluídas com 10 mL de metanol:ácido acético 0,5%, posteriormente secos a 45°C. O resíduo resultante foi dissolvido em 800 µL de metanol:água (3:1, v/v), a seguir fracionado em alíquotas de 200 µL e novamente secos sob fluxo de gás N₂ a 45 °C, procedendo-se ao acondicionamento em freezer (-20 °C) para posterior determinação de fumonisinas por cromatografia líquida de alta eficiência.

Determinação de Fumonisinas

As fumonisinas foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), de acordo com a metodologia descrita por SHEPHARD *et al.* (1990), modificada por UENO *et al.* (1993). As alíquotas de 200 µL foram redissolvidas em acetonitrila/água (1:1; v/v) e derivatizadas com o-ftaldialdeído (OPA), composto por 40 mg de OPA, 1 mL de metanol, 5 mL de tetraborato de sódio 0.1 M e 50 µL de 2-mercaptoetanol. A análise foi realizada por sistema isocrático de fase reversa (bomba Shimadzu LC-10 AD e detector de fluorescência RF-10A XL), utilizando coluna C₁₈ Nucleosil 100-5 (4,6 x 250 mm, Macherey-Nagel GmbH & Co). Os comprimentos de onda de excitação e emissão foram 335 e 450 nm, respectivamente. A fase móvel consistiu de metanol/tampão fosfato de sódio (CH₃OH:NaH₂PO₄) 0,1 M (80:20, v/v), com pH ajustado para 3,3 com ácido o – fosfórico. O fluxo foi mantido em 1 mL/min, e a temperatura em 25 °C.

Análise Estatística

As diferenças nas médias da produção de FB₁ em meios sem fungicida (controle) e com fungicida (tratamento) foram submetidas à análise de variância (ANOVA) seguida de teste de Tukey (p<0,05). Todas as análises foram realizadas utilizando o programa Statistica versão 6.0.

Resultados e Discussão

As concentrações de FB₁ detectadas nos tratamentos com fungicida Maxim – XL e nos controles (sem fungicida) estão apresentadas na Tabela 1. Os cultivos controle apresentaram produção média de 0,71 µg/mL de FB₁, equivalente a 31% da produção média de FB₁ dos cultivos com adição de fungicida (2,31 µg/mL). A adição de fungicida ao meio de cultivo, portanto, aumentou a produção de FB₁ em aproximadamente 3,25 vezes.

Estes resultados são similares aos de MUSS e FRANK (1985), que demonstraram que a adição de 30 a 50 µg/mL de fungicida tridemorfe aumentaram a produção de toxina T-2 por *Fusarium sporotrichioides* em 5 vezes. MATTHIES e BUCHENAUER (1996) testaram uma ampla gama de fungicidas utilizados comumente na Alemanha, e constataram que a adição de tubiconazole (0,1 µg/mL) induziu a produção de desoxinivalenol (DON) em aproximadamente 4 vezes. Em contraste, tridemorfe e fenopropimorfe não afetaram a síntese de DON, enquanto que benomyl, tiabendazole, procloraz e tebuconazole inibiram a incidência da toxina, quando utilizados em concentrações de 0,5 a 1,0 µg/mL (MATTHIES e BUCHENAUER, 1996). O tratamento de sementes de milho com 50 µg/mL de maneb para infecções provocadas por *F. graminearum* proporcionou boa qualidade de controle tanto do crescimento fúngico quanto da produção de zearalenona (ZEA), *in vivo* e *in situ* (DRAUGHTON e CHURCHVILLE, 1983). Ressalta-se que a eficiência da proteção química depende, portanto, do tipo de fungicida aplicado, e do fungo patogênico que deve ser controlado, além da dose aplicada (KOLOMBET *et al.*, 2006; MAGAN *et al.*, 2002).

Não foi observada correlação entre a produção de FB₁ e a expressão de *FUM1* na presença do fungicida (Tabela 2). DOOHAN *et al.* (1999) demonstraram que a presença de fungicidas procloraz e tebuconazole (em concentrações de 2 e 8 µg/mL) no meio de cultivo de *Fusarium culmorum* aumentou a produção de DON e expressão

do gene *Tri5*, que codifica para a tricodieno sintase, enzima que catalisa a primeira reação na biossíntese de tricotecenos.

Os valores de R exprimem a diferença de expressão de cada um dos genes analisados em meios de cultivo sem e com adição de fungicida. Valores de R menores que 1,0 não exprimem diferença de expressão gênica relevante. Portanto, não foi observada diferença na expressão do gene *FUM1* em relação à presença ou ausência de fungicida no meio de cultivo. Entretanto, a expressão do gene *FUM21* foi ligeiramente estimulada na presença de fungicida (Tabela 2).

Uma vez que o gene *FUM21* é um regulador que estimula a transcrição dos genes que codificam para enzimas da via de síntese de fumonisinas, era esperado que a expressão do gene *FUM1* apresentasse correlação com a expressão de *FUM21*. Entretanto, o gene *FUM21* pode influenciar também a expressão de outros genes da via de biossíntese de fumonisinas, como o gene *FUM8* (BROWN *et al.*, 2007).

Além disso, *FUM21* apresenta pelo menos quatro formas alternativas de *splice* (FASs), que são expressas diferencialmente e podem atuar de maneiras distintas na regulação da transcrição dos genes para a biossíntese de fumonisinas. Uma destas FASs carece de um domínio carboxi – terminal, o qual provavelmente é necessário para ativar a transcrição (BROWN *et al.*, 2007). Portanto, o transcrito detectado para o gene *FUM21* pode não estimular a transcrição de *FUM1*.

O aumento na concentração de FB₁ detectado na presença do fungicida pode ser decorrente de outros fatores. Primeiramente, o fungicida Maxim – XL poderia influenciar na expressão de outros genes da via de biossíntese de fumonisinas, não influenciando diretamente na expressão de *FUM1*. Assim como *FUM1*, *FUM6* (BOJJA *et al.*, 2004) e *FUM8* (SEO *et al.*, 2001) são essenciais para a produção de fumonisinas, e poderiam ter sua expressão influenciada pelo fungicida, o que acarretaria em produção aumentada de FB₁. DOOHAN *et al.* (1999) demonstraram que fungicidas (procloraz e tebuconazole) podem exercer efeito positivo tanto na produção de DON quanto na expressão de um gene essencial para a síntese da toxina

(*Tri5* – codifica para a tricodieno sintase, que catalisa a primeira reação na biossíntese de tricotecenos) por *F. culmorum*.

Estudos da expressão de *FUM6* e/ou *FUM8* poderiam demonstrar esta possível correlação; entretanto, a expressão de qualquer outro gene da via de biossíntese de fumonisinas poderia sofrer influência do fungicida.

Em muitos fungos, transportadores celulares das famílias ABC (*ATP binding cassette*) e MFS (*major facilitator superfamily*) são essenciais para a sobrevivência em meio contendo agentes tóxicos. *Aspergillus nidulans*, por exemplo, codifica para um transportador celular do tipo ABC (cassete de ligação ao ATP), denominado AtrBp, que apresenta afinidade a diversas classes de fungicidas (anilino pirimidina, benzimidazol, fenilpirrol, fenilpiridilamina, estrobirulina e azole). O transportador AtrBp exporta as substâncias tóxicas constantemente, mantendo-as em nível sub-crítico no interior celular (ANDRADE *et al.*, 2000). *FUM19*, que está contido no *cluster* gênico das fumonisinas, codifica para um transportador celular do tipo ABC, responsável pelo transporte extracelular de micotoxinas (PROCTOR *et al.*, 2003), e poderia, em tese, atuar também no efluxo de outras substâncias citotóxicas, como Maxim – XL. Assim, a presença de fungicida no meio de cultivo poderia aumentar a expressão do gene *FUM19* e/ou a atividade do transportador por ele codificado, o que aumentaria os níveis extracelulares de fumonisinas.

Ainda, a influência de Maxim – XL sobre a produção de fumonisinas pode não apresentar relação com a expressão dos genes para a biossíntese da toxina. Fludioxonil é um fungicida de contato com amplo espectro, que atua sobre histidinas quinases denominadas MAP (*mitogen activated protein*). As MAP quinases estão envolvidas na transdução de muitos sinais extracelulares, sendo importantes para manutenção, regulação do crescimento e diferenciação celular, crescimento invasivo de hifas e virulência, conidiação e germinação de conídios (XU, 2000).

Uma vez que fludioxonil atua sobre MAP quinases, Maxim – XL poderia alterar a morfologia celular, que, combinada à agitação utilizada durante o cultivo de *F.*

verticillioides no presente trabalho, propiciaria a lise celular nas amostras tratadas com fungicida, e, portanto, liberação do conteúdo intracelular de fumonisinas, aumentando sua concentração no extrato livre de células. Os efeitos de fludioxonil sobre *Neurospora crassa* foram estudados por ZHANG *et al.* (2002), que demonstraram que o fungicida atua sobre uma MAP quinase cujo papel é relacionado à osmorregulação, super-estimulando a expressão desta enzima, e provocando *stress* hiperosmótico, com conseqüente acúmulo intracelular de glicerol, inchaço e rompimento de células. Em *Candida albicans*, a adição de fludioxonil ao meio de cultivo também afetou a osmorregulação, provocando acúmulo de glicerol intracelular e inibindo a formação de hifas (OCHIAI *et al.*, 2002).

O presente trabalho fornece evidências sobre a influência de Maxim – XL sobre a produção de fumonisina B₁, e demonstra a importância da compreensão do mecanismo de ação de fungicidas sobre fungos toxigênicos e produção de micotoxinas para a minimização da sua ocorrência. Entretanto, estudos posteriores são necessários para auxiliar a elucidar o mecanismo pelo qual Maxim – XL influencia positivamente na produção de FB₁ por *F. verticillioides*.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Fundo Paraná/SETI, a Fundação Araucária, CNPq, PPSUS/Ministério da Saúde e CAPES pelo apoio financeiro e pela concessão de bolsa de mestrado a Tatiana de Ávila Miguel.

Referências

ANDRADE, A.C.; DEL – SORBO, G.; VAN – NISTELROOY, J.G.; DE – WAARD, M.A. 2000. The ABC Transporter AtrB from *Aspergillus nidulans* Mediates Resistance to All Major Classes of Fungicides and Some Natural Toxic Compounds. *Microbiol.* 146:1987 – 1997.

ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE IGILÂNCIA SANITÁRIA, SIA – Sistema de Informações Sobre Agrotóxicos. 2007. Disponível em: < <http://www4.anvisa.gov.br>>.

BOJJA, R.S.; CERNY, R.L.; PROCTOR, R.H.; LIANGCHENG, D. 2004. Determining the Biosynthetic Sequence in the Early Steps of the Fumonisin Pathway by Use of Three Gene – Disruption Mutants of *Fusarium verticillioides*. *J. Agric.Food Chem.* 52:2855 – 2860.

BROWN, D.W.; BUTCHKO, R.A.E.; BUSMAN, M.; PROCTOR, R.H. 2007. The *Fusarium verticillioides* *FUM* Gene Cluster Encodes a Zn(II)2Cys6 Protein That Affects *FUM* Gene Expression and Fumonisin Production. *Eukar.Cell.* 6(7):1210–1218.

BUTCHKO, R.A.E.; PLATTNER, R.D.; PROCTOR, R.H. 2006. Deletion Analysis of *FUM* Genes Involved in Tricarballic Ester Formation During Fumonisin Biosynthesis. *J. Agric.Food Chem.* 54:9398 – 9404.

CHU, F. S.; LI, G.Y. 1994. Simultaneous Occurrence of Fumonisin B₁ and Other Mycotoxins in Moldy Corn Collected from the Peoples' Republic of China in Regions with High Incidences of Esophageal Cancer. *Appl. Environm. Microbiol.* 60:847 – 852.

DOOHAN, F.M.; WESTON, G.; REZANOOR, H.N.; PARRY, D.W. Development and Use of a Reverse Transcription – PCR Assay to Study Expression of *Tri5* by *Fusarium* Species in Vitro and in Planta. *Appl. Environm. Microbiol.* 65(9):3850 – 3854.

DRAUGHTON, F.A.; CHURCHVILLE, D.C. 1985. Effect of Pesticide on Zearalenone Production in Culture and in Corn Plants. *Phytopatol.* 75:553 – 556.

FLAHERTY, J.E.; PIRTTILA, A.M.; BLUHM, B.H.; WOLOSHUK, C.P. 2003. *PAC1*, a pH-Regulatory Gene from *Fusarium verticillioides* Appl.Environm.Microbiol. 69(9):5222–5227.

FLAHERTY, J.E.; WOLOSHUK, C.P. 2004. Regulation of Fumonisin Biosynthesis in *Fusarium verticillioides* by a Zinc Binuclear Cluster-Type Gene, *ZFR1*. Appl. Environm. Microbiol. 70(5):2653–2659.

GELDERBLOM, W. C. A., SAMPLE, E., MARASAS, W. F. O. 1992. The Cancer Initiating Potential of the Fumonisin B Mycotoxins. Carcinogen. 13:433 – 437.

GELDERBLOM, W. C. A., SNYMAN, S. D., ABEL, S., LEBEPE-MAZUR, S., SMUTS, C. M., VAN DER WESTHUIZEN, L., MARASAS, W. F. O., VICTOR, T. C., KNASMÜLLER, S., HUBER, W. 1996. Hepatotoxicity and Carcinogenicity of the Fumonisin in Rats: a Review Regarding Mechanistic Implications for Establishing Risk in Humans. Fumonisin in Food, edited by L. S. Jackson, J. W. De Vries and L. B. Bullerman (NY Plenum Press):279 – 296.

GELDERBLOM, W.C.A.; JASKIEWICZ, K.; MARASAS, W.F.O.; THIEL, P.G.; HORAK, R.M.; VLEGGAR R.; KRIEK, N.P.J. 1988. Fumonisin – Novel Mycotoxins With Cancer-Promoting Activity Produced by *Fusarium moniliforme*. Appl. Environm. Microbiol. 54:1806 – 1811.

GOULART, A.C.P.; FIALHO, W.F.B. 2001. Tratamento de Sementes de Milho com Fungicidas para o Controle de Patógenos. Summa Phytopathol. 27:414 – 420.

HARRISON, L. R., COLVIN, B.M., GREENE, J. T., NEWMAN, L.E., COLE, J.R. Pulmonary Edema and Hydrothorax in Swine Produced by Fumonisin B₁, a Toxic Metabolite of *Fusarium moniliforme*. J. Vet. Diagn. Invest. 2:217 – 221.

JIMÉNEZ, M.; MATEO, J.M.; HINOJO, M.J.; MATEO, R. 2003. Sugars and Aminoacids as Factors Affecting the Synthesis of Fumonisin in Liquid Cultures of isolates of the *Gibberella fujikuroi* Complex. Food Microbiol. 89:185 – 193.

KOLOBET, L.V.; KOLESOVA, D.A.; CHMYR, P.G. 2006. Diagnostics of Phytopathogen Infection in Agricultural Plants as a Necessary Condition for Optimizing Current Fungicide Application Technologies. J. Agric. Technol.

LEDOUX, D. R., BROWN, T. P., WEIBKING, T. S., ROTTINGHAUS, G. E. 1992. Fumonisin Toxicity in Broiler Chicks. *J. Vet. Diagn. Invest.* 4:330 – 333.

MAGAN, N.; HOPE, R.; COLLEATE, A.; BAXTER, E.S. 2002. Relationship Between Growth and Mycotoxin Production by *Fusarium* Species, Biocides and Environment. *Eur. J. Plant Pathol.* 108:685–690.

MARASAS, W. F. O. 1995. Fumonisin: Their Implications for Human and Animal Health. *Nat. Toxins.* 3:193 – 198.

MARASAS, W. F. O., KELLERMAN, T. S., GELDERBLOM, W. C. A., THIEL, P. G., COETZER, J. A. W. 1988. Leukoencephalomalacia in a Horse Induced by Fumonisin B₁, Isolated from *Fusarium moniliforme*. *J. Vet. Res.* 55:197 – 203.

MARASAS, W.F.O. 2001. Discovery and Occurrence of the Fumonisin: A Historical Perspective. *Environm. Health Perspec.* 109:239 – 243.

MATTHIES, A.; BUCHENAUER, H. 1996. Investigations on the Action of Different Active Ingredients on the Biosynthesis of Mycotoxins in *Fusarium culmorum* and *F. graminearum*. In: MAGAN, N.; HOPE, R.; COLLEATE, A.; BAXTER, E.S. 2002. Relationship Between Growth and Mycotoxin Production by *Fusarium* Species, Biocides and Environment. *Eur. J. Plant Pathol.* 108:685–690.

MORAES, M.H.D.; MENTEN, J.O.M.; GRAVENA, J.C.; ALVES, C.A. 2003. Controle Químico de *Fusarium moniliforme* em Sementes de Milho: Metodologia de Avaliação e Efeitos sobre a Qualidade Fisiológica. *Fitopatol. Bras.* 28(6):626 – 632.

MUSS, M.O.; FRANK, M. 1985. The influence of the fungicide tridemorph on T-2 toxin production by *Fusarium sporotrichioides*. *Trans. Brit. Micol. Soc.* 54:585 – 590.

OCHIAI, N.; FUJIMURA, M.; OSHIMA, M.; MOTOYAMA, T.; ICHIISHI, A.; YAMADA – OKABE, H.; YAMAGUCHI, I. 2002. Effects of Iprodione and Fludioxonil on Glycerol Synthesis and Hyphal Development in *Candida albicans*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66(10):2209 – 2215.

PFAFFL, M.W. 2001. A New Mathematical Model for Relative Quantification in Real Time RT – PCR. *Nucl. Acids Res.* 29(9):2002 – 2007.

PROCTOR, R.H.; BROWN, D.W.; PLATTNER, R.D.; DESJARDINS, A.E. 2003. Co – expression of 15 Contiguous Genes Delineates a Fumonisin Biosynthetic Gene Cluster in *Gibberella moniliformis*. Fung. Gen. Biol. 38:237 – 249.

PROCTOR, R.H.; DESJARDINS, A.E.; PLATTNER, R.D.; HOHN, T.M. 1999. A Polyketide Synthase Gene Required for Biosynthesis of Fumonisin Mycotoxins in *Gibberella fujikuroi* Mating Population A. Fung. Gen. Biol. 27:100 – 112.

RHEEDER, J.P.; MARASAS, W.F.O.; VISMER, H.F. Production of Fumonisin Analogs by *Fusarium* Species. 2002. Appl. Environm. Microbiol. 68(5): 2101-2105.

SEO, J.A.; PROCTOR, R.H.; PLATTNER, R.D. 2001. Characterization of Four Clustered and Coregulated Genes Associated with Fumonisin Biosynthesis in *Fusarium verticillioides*. Fung. Gen. Biol. 34:155 – 165.

SHEPHARD, G.S., SYDENHAM, E.W., THIEL, P.G., GELDERBLOM, W.C.A. 1990. Quantitative Determination of Fumonisin B₁ and B₂ by High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. J. Liq. Chromat. 13:2077-2087.

SIRANIDOU, E.; BUCHENAUER, H. 2001. Chemical Control of *Fusarium* Head Blight on Wheat. J. Plant Dis. Protec. 108: 231 – 243.

SUN, G.; WANG, S.; HU, X.; SU, J.; HUANG, T.; YU, J.; TANG, L.; GAO, W.; WANG, J.S. 2007. Fumonisin B₁ Contamination of Home-Grown Corn in High-Risk Areas for Esophageal and Liver Cancer in China. Food Add. Cont. 24(2):181 – 185.

THIEL, P. G., MARASAS, W. F. O., SYDENHAM, E. W., SHEPHARD, G. S., GELDERBLOM, W. C. A. 1992. The Implications of Naturally Occurring Levels of Fumonisin in Corn for Human and Animal Health. Mycopathol. 117:3 – 9.

UENO, Y., AOYAMA, S., SUGIURA, Y., WANG, D.S., LEE, U.S., HIROOKA, E.Y., HARA, S., KARKI, T., CHEN, G., YU, S.Z. 1993. A Limited Survey of Fumonisin in Corn and Corn-Based Products in Asian Countries. Mycotox. Res. 9:27-34.

WEIBKING, T. S., LEDOUX, D. R., BERMUDEZ, A. J., TURK, J. R., ROTTINGHAUS, G. E., WANF, E., MERRILL, A. H. 1993. Effects of Feeding *Fusarium moniliforme* Culture Material, Containing Known Levels of Fumonisin B₁ on the Young Broiler Chick. *Poultry Sci.* 72:456 – 466.

WOLOSHUK, C.P.; SHIM, W.B. 2001. Regulation of Fumonisin B₁ Biosynthesis and Conidiation in *Fusarium verticillioides* by a Cyclin-Like (C-Type) Gene, *FCC1*. *Appl. Environm. Microbiol.* 67(4):1607–1612.

XU, J.R. 2000. MAP Kinases in Fungal Pathogens. *Fung. Gen. Biol.* 31(3)137 – 152.

ZHANG, Y.; LAMM, R.; PILLONEL, C.; LAM, S.; XU, J.R. 2002. Osmoregulation and Fungicide Resistance: the *Neurospora crassa os – 2* Gene Encodes a *HOG1* Mitogen – Activated Protein Kinase Homologue. *Appl. Environm. Microbiol.* 68(2):532 – 538.

Tabela 1 – Produção de FB₁ por F. verticillioides em meio líquido definido na presença e na ausência de fungicida Maxim – XL.

Amostra [†]	Média FB ₁ (µg/mL)
* Controle	0,71 ^{b△}
** Tratamento	2,31 ^{a△}

* Controle = sem adição de fungicida

** Tratamento = adição de 75 µL de fungicida

[†] Média de três repetições

[△] Médias seguidas da mesma letra não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey (p<0,05)

Tabela 2 – Análise quantitativa da expressão do RNA mensageiro para os genes FUM1 e FUM21.

Gene	Valores de R
<i>FUM 1</i>	0,56
<i>FUM 21</i>	1,29

* A quantidade de RNA em cada amostra foi calculada pela metodologia estabelecida por Pfaffl (2001)

6. CONCLUSÕES

- O suprimento adequado de nitrogênio pode diminuir o risco de contaminação por fungos e fumonisinas.
- Existe uma correlação negativa entre a ocorrência de fumonisinas e a dose de fertilizante nitrogenado utilizada.
- Houve uma tendência de menor contaminação por fumonisinas quando utilizados 160 Kg/ha de uréia (tratamento 2).
- Houve uma tendência de menor contaminação por fumonisinas quando utilizada uréia ao invés de uréia + NBPT.
- A fertilização nitrogenada é importante para minimizar os riscos da contaminação de milho por fumonisinas, podendo ser utilizada a fim de proporcionar maior segurança alimentar para animais e seres humanos.
- Maxim – XL promoveu aumento na concentração extracelular de fumonisina B₁.
- Maxim – XL induz ligeiramente a expressão do gene *FUM21*. Entretanto, a expressão do gene *FUM1* não foi influenciada positivamente pelo fungicida.
- A compreensão do mecanismo de ação de fungicidas sobre *F. verticillioides* e produção de fumonsina B₁ é importante para fornecer subsídios para o controle e minimização da ocorrência de fumonisinas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABADO – BECOGNEÉ, K.; MOBIO, T.A.; ENNAMANY, R.; FLEURAT – LESSARD, F.; SHIER, W.T.; BADRIA, F.; CREPPY, E.E. Cytotoxicity of Fumonisin B₁: Implication of Lipid Peroxidation and Inhibition of Protein and DNA Synthesis. *Archives of Toxicology*, v. 72, p. 233 – 236, 1998.

ALMEIDA, P.A.; FONSECA, H.; FANCELLI, A.L.; DIREITO, G.M.; ORTEGA, E.M.; CORREA, B. Mycoflora and Fumonisin Contamination in Brazilian Corn from Sowing to Harvest. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, p.3877 – 3882, 2002.

ANDRADE, A.C.; DEL – SORBO, G.; VAN – NISTELROOY, J.G.; DE – WAARD, M.A. The ABC Transporter AtrB from *Aspergillus nidulans* Mediates Resistance to All Major Classes of Fungicides and Some Natural Toxic Compounds. *Microbiology*, v. 146, p. 1987 – 1997, 2000.

ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE IGILÂNCIA SANITÁRIA, SIA – Sistema de Informações Sobre Agrotóxicos. Disponível em: < http://www4.anvisa.gov.br/AGROSIA/asp/frm_pesquisa_agrotoxico.asp >. Acesso em 16 de Junho de 2007.

APSÍMON, J.W.; BLACKWELL, B.A.; EDWARDS, O.E.; FRUCHIER, A.; MILLER, J.D.; SAVARD, M.; YOUNG, J.C. The Chemistry of Fumonisin and related compounds. Fumonisin from *Fusarium moniliforme*: Chemistry, Structure and Biosynthesis. *Pure & Applied Chemistry*, v. 66, n. 10/11. p. 2315 – 2318, 1994.

ARAÚJO, L.A.N.; FERREIRA, M.E.; CRUZ, M.C.P. Adubação Nitrogenada na Cultura de Milho. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 39, n. 8, p. 771 – 777, 2004.

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.

BAPTISTA, A.S.; HORII, J.; BAPTISTA, A.S. Fatores Físico – Químicos e Biológicos Ligados à Produção de Micotoxinas. *B.CEPPA – Curitiba*, v. 22, n. 1, p. 1 – 14, 2004.

BEZUIDENHOUT, S.C.; GELDERBLUM, W.C.A.; GORST-ALLMAN, C.P.; HORAK, R.M.; MARASAS, W.F.O.; SPITELLER, G.; VLEGGAR R. Structure Elucidation of the Fumonisin, Mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 1988: p. 743 – 745, 1988.

BLACKWELL, B.A.; EDWARDS, O.E.; FRUCHIER, A.; APSIMON, J.W.; MILLER, J.D. NMR Structural Studies of Fumonisin B₁ and related compounds from *Fusarium moniliforme*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v. 392, p. 75 – 91, 1996.

BLANDINO, M.; ALMA, A.; MATTA, A.; REYNERY, A. Best Management Practices to Assure Low Mycotoxin Content of Corn Kernel During Production. *International Quality Grains Conference Proceedings*, Indianapolis, Indiana, USA, 2004.

BLANDINO, M.; REYNERI, A.; VANARA, F. Influence of Nitrogen Fertilization on Mycotoxin Contamination of Maize Kernels. *Crop Protection*, v. 27, p. 222 – 230, 2008.

BLUHM, B. H.; KIM, H.; BUTCHKO, R. A. E.; WOLOSHUK C. P. Involvement of *ZFR1* of *Fusarium verticillioides* in Kernel Colonization and the Regulation of *FST1*, a Putative Sugar Transporter Gene Required for Fumonisin Biosynthesis on Maize Kernels. *Molecular Plant Pathology*, v. 9, n. 2, p. 203 – 211, 2008.

BLUHM, B. H.; WOLOSHUK C. P. Fck1, a C-type Cyclin-Dependent Kinase, Interacts with Fcc1 to Regulate Development and Secondary Metabolism in *Fusarium verticillioides*. *Fungal Genetics and Biology*, v. 43, p. 146–154, 2006.

BOJJA, R.S.; CERNY, R.L.; PROCTOR, R.H.; LIANGCHENG, D. Determining the Biosynthetic Sequence in the Early Steps of the Fumonisin Pathway by Use of Three Gene – Disruption Mutants of *Fusarium verticillioides*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 52, p. 2855 – 2860, 2004.

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, 1993a.

BRANHAM, B.E.; PLATTNER, R.D. Isolation and Characterization of a New Fumonisin from Liquid Cultures of *Fusarium moniliforme*. *Journal of Natural Products*, v. 56, p. 1630 – 1633, 1993b.

BROWN, D.W.; BUTCHKO, R.A.E.; BUSMAN, M.; PROCTOR, R.H. The *Fusarium verticillioides* *FUM* Gene Cluster Encodes a Zn(II)2Cys6 Protein That Affects *FUM* Gene Expression and Fumonisin Production. *Eukaryotic Cell*, v. 6, n. 7, p. 1210–1218, 2007.

BROWN, D.W.; BUTCHKO, R.A.E.; PROCTOR, R.H. *Fusarium* Genomic Resources: Tools to Limit Crop Diseases and Mycotoxin Contamination. *Mycopathologia*, v. 162, p. 191 – 199, 2006.

BROWN, D.W.; CHEUNG, F.; PROCTOR, R.H.; BUTCHKO, R.A.E.; ZHENG, L.; LEE, Y.; UTTERBACK, T.; SMITH, S.; FELDBLYUM, T.; GLENN, A.E.; PLATTNER, R.D.; KENDRA, D.F.; TOWN, C.D.; WHITELAW, C.A. Comparative Analysis of 87,000 Expressed Sequence Tags from the Fumonisin – Producing Fungus *Fusarium verticillioides*. *Fungal Genetics and Biology*, v. 42, p. 848 – 861, 2005.

BROWN, D.W.; YU, J.H.; KELKAR, H.S.; FERNANDES, M.; NESBITT, T.C.; KELLER, N.P.; ADAMS, T.H.; LEONARD, T.J. Twenty – five Co – regulated

Transcripts Define a Sterigmatocystin Gene Cluster in *Aspergillus nidulans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 93; p. 1418 – 1422, 1996.

BÜLL, L.T. Nutrição Mineral do Milho, 1993. In: HASSEGAWA, R.H.; FONSECA, H.; FANCELLI, A.L.; SILVA, V.N.; SCHAMMASS, E.A.; REIS, T.A.; CORRÊA, B. Influence of Macro and Micronutrient Fertilization on Fungal Contamination and Fumonisin Production in Corn Grains. *Food Control*, v.19, p.36 – 43, 2008.

BUTCHKO, R.A.E.; PLATTNER, R.D.; PROCTOR, R.H. Deletion Analysis of *FUM* Genes Involved in Tricarballic Ester Formation During Fumonisin Biosynthesis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, p. 9398 – 9404, 2006.

BUTCHKO, R.A.E.; PLATTNER, R.D.; PROCTOR, R.H. *FUM13* Encodes a Short Chain Dehydrogenase/Reductase Required for C-3 Carbonyl Reduction During Fumonisin Biosynthesis in *Gibberella moniliformis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, p. 3000 – 3006, 2003a.

BUTCHKO, R.A.E.; PLATTNER, R.D.; PROCTOR, R.H. *FUM9* is Required for C-5 Hydroxylation of Fumonisin and Complements the Meiotically Defined *Fum3* Locus in *Gibberella moniliformis*. *Applied Environmental Microbiology*, v. 69, n.11, p. 6935 – 6937, 2003b.

CALDAS, E.D.; SADILKOVA, K.; WARD, B.L.; JONES, A.D.; WINTER, C.K.; GILCHRIST, D.G. Biosynthetic Studies of Fumonisin B₁ and AAL Toxins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 46, p. 4734 – 4743, 1998.

CARDWELL, K.F.; KING, J.G.; MAZIYA-DIXON, B.; BOSQUE-PEREZ, N.A. Interactions Between *Fusarium verticillioides*, *Aspergillus flavus*, and Insect Infestation in Four Maize Genotypes in Lowland Africa. *Phytopathology* v. 90, p. 276–284, 2000.

CARMONA G., CHRISTIANSON, C.B.; BYRNES, B.H. Temperature and Low Concentration Effects of the Urease Inhibitor N – n – butyl thiophosphoric triamide (NBPT) on Ammonia Volatilization from Urea. *Soil Biology & Biochemistry*, v. 7, p. 933 – 937, 1990.

CAWOOD, M.E.; GELDERBLOM, W.C.A.; VLEGGAAR, R. Isolation of the Fumonisin Mycotoxins: A Quantitative Approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 39, p. 1958 – 1962, 1991.

CHU, F. S.; LI, G.Y. Simultaneous Occurrence of Fumonisin B₁ and Other Mycotoxins in Moldy Corn Collected from the Peoples' Republic of China in Regions with High Incidences of Esophageal Cancer. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 60, p. 847 – 852, 1994.

CHULZE, S.N.; RAMIREZ, M.L.; FARNOCHI, M.; PASCALE, M.; VISCONTI, A.; MARCH, G. *Fusarium* and Fumonisin Occurrence in Argentinian Corn at

Different Ear Maturity Stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 44, p. 2797–2801, 1996.

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. *Safras de grãos: Brasil/produtores*. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/BrasilProdutoSerieHist.xls>> Acesso em 02 de Dezembro de 2007.

D'MELLO, J.P.F.; MACDONALD, A.M.C.; POSTEL, D.; DIJKSMA, W.T.P.; DUJARDIN, A.; PLACINTA, C.M. Pesticide Use and Mycotoxin Production in *Fusarium* and *Aspergillus* Phytopathogens. *European Journal of Plant Pathology*, v. 104, p. 741 – 751, 1998.

DESJARDINS, A.E.; HOHN, T.M.; McCORMICK, S.P. Trichothecenes Biosynthesis in *Fusarium* Species: Chemistry, Genetic, and Significance. *Microbiology and Molecular Biology*, v. 57, n.3, 1993.

DESJARDINS, A.E.; MUNKVOLD, G.P.; PLATTNER, R.D.; PROCTOR, R.H. *FUM1* – A Gene Required for Fumonisin Biosynthesis but not for Maize Ear Rot and Ear Infection by *Gibberella moniliformis* in Field Tests. *Molecular Plant – Microbe Interactions*, v. 15, n.11, p. 1157 – 1164, 2002.

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, n.1, p.79 – 86, 1995.

DESJARDINS, A.E.; PLATTNER, R.D.; PROCTOR, R.H. Linkage Among Genes Responsible for Fumonisin Biosynthesis in *Gibberella fujikuroi* Mating Population A. *Applied Environmental and Microbiology*, v. 62, n.7, p. 2571 – 2576, 1996.

DING, Y.; BOJJA, R.S.; LIANGCHENG, D. Fum3p, a 2 – Ketoglutarate – Dependent Dioxygenase Required for C-5 Hydroxylation of Fumonisin in *Fusarium verticillioides*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 70, n.4, p. 1931 – 1934, 2004.

DOOHAN, F.M.; WESTON, G.; REZANOOR, H.N.; PARRY, D.W. Development and Use of a Reverse Transcription – PCR Assay to Study Expression of *Tri5* by *Fusarium* Species in Vitro and in Planta. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 65, n. 9, p. 3850 – 3854, 1999.

DRAUGHTON, F.A.; CHURCHVILLE, D.C. Effect of Pesticide on Zearalenone Production in Culture and in Corn Plants. *Phytopathology*, v. 75, p. 553 – 556, 1985.

DUARTE, J.O.; CRUZ, J.C.; GARCIA, J.C.; MATTOSO, M.J. Cultivo do Milho. *EMBRAPA Milho e Sorgo – Sistema de Produção 1*, versão eletrônica – 2ª edição, 2006. Disponível em:

<<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Milho/CultivodoMilho/index.htm>>. Acesso em: 07/10/2007.

DUVICK, J. Prospects for Reducing Fumonisin Contamination of Maize through Genetic Modification. *Environmental Health Perspectives*, v. 109, n. 2, p. 337-342, 2001.

FLAHERTY, J.E.; PIRTTILA, A.M.; BLUHM, B.H.; WOLOSHUK, C.P. *PAC1*, a pH-Regulatory Gene from *Fusarium verticillioides* *Applied And Environmental Microbiology*, v. 69, n. 9, p. 5222–5227, 2003.

FLAHERTY, J.E.; WOLOSHUK, C.P. Regulation of Fumonisin Biosynthesis in *Fusarium verticillioides* by a Zinc Binuclear Cluster-Type Gene, *ZFR1*. *Applied And Environmental Microbiology*, v. 70, n. 5, p. 2653–2659, 2004.

GELDERBLOM, W. C. A., SAMPLE, E., MARASAS, W. F. O. The Cancer Initiating Potential of the Fumonisin B Mycotoxins. *Carcinogenesis*, v. 13, p. 433 – 437, 1992.

GELDERBLOM, W. C. A., SNYMAN, S. D., ABEL, S., LEBEPE-MAZUR, S., SMUTS, C. M., VAN DER WESTHUIZEN, L., MARASAS, W. F. O., VICTOR, T. C., KNASMÜLLER, S., HUBER, W. Hepatotoxicity and Carcinogenicity of the Fumonisin in Rats: a Review Regarding Mechanistic Implications for Establishing Risk in Humans. *Fumonisin in Food*, edited by L. S. Jackson, J. W. De Vries and L. B. Bullerman (New York: Plenum Press), p. 279 – 296, 1996.

GELDERBLOM, W.C.A.; JASKIEWICZ, K.; MARASAS, W.F.O.; THIEL, P.G.; HORAK, R.M.; VLEGGAAR R.; KRIEK, N.P.J. Fumonisin – Novel Mycotoxins With Cancer-Promoting Activity Produced by *Fusarium moniliforme*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 54, p. 1806 – 1811, 1988.

GOULART, A.C.P.; FIALHO, W.F.B. Tratamento de Sementes de Milho com Fungicidas para o Controle de Patógenos. *Summa Phytopathologica*, v. 27, p. 414 – 420, 2001.

GRIFFIN, D.H. *Fungal Physiology*. 2ª edição. New York: Wiley – Liss Inc.; 1994.

HARRISON, L. R., COLVIN, B.M., GREENE, J. T., NEWMAN, L.E., COLE, J.R. Pulmonary Edema and Hydrothorax in Swine Produced by Fumonisin B₁, a Toxic Metabolite of *Fusarium moniliforme*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 2, p. 217 – 221, 1990.

HASSEGAWA, R.H.; FONSECA, H.; FANCELLI, A.L.; SILVA, V.N.; SCHAMMASS, E.A.; REIS, T.A.; CORRÊA, B. Influence of Macro and Micronutrient Fertilization on Fungal Contamination and Fumonisin Production in Corn Grains. *Food Control*, v.19, p.36 – 43, 2008.

HIROOKA, E. Y.; YAMAGUCHI, M.M.; AOYAMA, S.; SUGIURA, Y.; UENO, Y. The Natural Occurrence of Fumonisin in Brazilian Corn Kernels. *Food Additives and Contaminants*, v. 13, p. 173 – 183, 1996.

IARC – INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. IARC Monographs of the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans – Overall Evaluations of Carcinogenicity to Humans. Disponível em: < <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/crthall.php>>. Acesso em 15 de Outubro de 2007.

JIMÉNEZ, M.; MATEO, J.M.; HINOJO, M.J.; MATEO, R. Sugars and Aminoacids as Factors Affecting the Synthesis of Fumonisin in Liquid Cultures of isolates of the *Gibberella fujikuroi* Complex. *Food Microbiology*, v. 89; p. 185 – 193, 2003.

JONES, R.K.; DUNCAN, H.E. Effect of Nitrogen Fertilizer, Planting Date and Harvest Date on Aflatoxin Production in Corn Inoculated with *Aspergillus flavus*. *Plant Disease*, v. 65, p. 741 – 747, 1981.

KAWASHIMA, L.M.; SOARES, L.M.V. Incidência de Fumonisin B₁, Aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, Ocratoxina A e Zearalenona em Produtos de Milho. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 26(3), p. 516 – 521, 2006.

KELLER, N.P.; HOHN, T.M. Metabolic Pathway Gene Clusters in Filamentous Fungi. *Fungal Genetics and Biology*, v. 21, p. 17 – 29, 1997.

KOLOBET, L.V.; KOLESOVA, D.A.; CHMYR, P.G. Diagnostics of Phytopathogen Infection in Agricultural Plants as a Necessary Condition for Optimizing Current Fungicide Application Technologies. *Journal of Agricultural Technology*, 2006.

KORNDORFER, G. H.; MARTINS, M. Importância da Adubação na Qualidade da cana-de-açúcar. *STAB. Açúcar, Alcool e Subprodutos*, Piracicaba, v. 10, n. 3, p. 26-31, 1992.

LEDOUX, D. R., BROWN, T. P., WEIBKING, T. S., ROTTINGHAUS, G. E. Fumonisin Toxicity in Broiler Chicks. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 4, p. 330 – 333, 1992.

LINO, C.M.; SILVA, L.J.; PENA, A.S. Fumonisin: Presença em Alimentos, Implicações na Saúde e Aspectos Legislativos. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, v. 90, p. 181 – 192, 2004.

LISKER, N.; LILLEHOJ, E.B. Prevention of Mycotoxin Contamination (Principally Aflatoxins and *Fusarium* Toxins) at the Preharvest Stage, 1991. In: BLANDINO, M.; REYNERI, A.; VANARA, F. Influence of Nitrogen Fertilization on Mycotoxin Contamination of Maize Kernels. *Crop Protection*, v. 27, p. 222 – 230, 2008.

LÓPEZ – ERRASQUÍN, E.; VÁSQUEZ, C.; JIMÉNEZ, M.; GONZÁLEZ – JAÉN, M.T. Real – Time RT – PCR Assay to Quantify the Expression of *FUM1* and *FUM19* Genes from the Fumonisin – Producing *Fusarium verticillioides*. *Journal of Microbiological Methods*, v. 68, p. 312 – 317, 2007.

MAGALHÃES, P.C.; DURÃES, F.O.M.; CARNEIRO, N.P.; PAIVA, E. Fisiologia do Milho. *Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – Circular Técnica*, v. 22 p65, 2003.

MAGAN, N.; HOPE, R.; COLLEATE, A.; BAXTER, E.S. Relationship Between Growth and Mycotoxin Production by *Fusarium* Species, Biocides and Environment. *European Journal of Plant Pathology*, v. 108, p. 685–690, 2002.

MARASAS, W.F.O.; NELSON, P.E.; TOUSSOUN, T.A. Toxigenic *Fusarium* Species: Identity and Mycotoxicology. *University Park: Pennsylvania State University Press*, 1984.

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., THIEL, P. G., COETZER, J. A. W. Leukoencephalomalacia in a Horse Induced by Fumonisin B₁, Isolated from *Fusarium moniliforme*. *Journal of Veterinary Research*, v. 55, p. 197 – 203, 1988.

MARASAS, W.F.O. Discovery and Occurrence of the Fumonisin: A Historical Perspective. *Environmental Health Perspectives*, v. 109, p. 239 – 243, 2001.

MARASAS, W.F.O.; NELSON, P.E. Mycotoxicology: Introduction to the Mycology, Plant Pathology, Chemistry, Toxicology, and Pathology of Naturally Occurring Micotoxins in Animals and Man. *Pennsylvania State University Press*, University Park, 1987.

MARÍN, S.; MAGAN, N.; BELLI, N.; RAMOS, A.J.; CANELA, R.; SANCHIS, V. Two Dimensional Profiles of Fumonisin B₁ Production by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* in Relation to Environmental Factors and Potential for Modeling Toxin Formation in Maize Grain. *International Journal of Food Microbiology*, v. 51, p. 159–167, 1999.

MATTHIES, A.; BUCHENAUER, H. Investigations on the Action of Different Active Ingredients on the Biosynthesis of Mycotoxins in *Fusarium culmorum* and *F. graminearum*, 1996. In: MAGAN, N.; HOPE, R.; COLLEATE, A.; BAXTER, E.S. Relationship Between Growth and Mycotoxin Production by *Fusarium* Species, Biocides and Environment. *European Journal of Plant Pathology*, v. 108, p. 685–690, 2002.

MERRIL, A.H., Jr. Cell Regulation by Sphingosine and More Complex Sphingolipids. *Journal Bioenergetics and Biomembranes*, v. 23, p. 83 – 104, 1991.

MILLER, J.D. Factors that Affect the Occurrence of Fumonisin. *Environmental Health Perspectives*, v. 109, n. 2, p. 321 – 324, 2001.

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*, Vol. 17, p 233 – 239, 1995.

MOBLEY, H.L.T.; HAUSINGER, R. P. Microbial Ureases: Significant, Regulation, and Molecular Characterization. *Microbiology Reviews*, v. 53, p. 85-108, 1989.

MORAES, M.H.D.; MENTEN, J.O.M.; GRAVENA, J.C.; ALVES, C.A. Controle Químico de *Fusarium moniliforme* em Sementes de Milho: Metodologia de Avaliação e Efeitos sobre a Qualidade Fisiológica. *Fitopatologia Brasileira*, v. 28, n. 6, p. 626 – 632, 2003.

MUNKVOLD, G.P. Cultural and Genetic Approaches to Managing Mycotoxins in Maize. *Annual Review of Phytopathology*, v. 41, p. 99–116, 2003.

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.

MUSS, M.O.; FRANK, M. The Influence of the Fungicide Tridemorph on T-2 Toxin Production by *Fusarium sporotrichioides*. *Transactions of British Mycology Society*, v.54, p. 585 – 590, 1985.

MUSSER, S.M.; GAY, M.L.; MAZZOLA, E.P.; PLATTNER, R.D. Identification of a New Series of Fumonisin Containing 3-Hidroxypyridine. *Journal of Natural Products*, v. 59, p. 970 – 972, 1996.

NELSON, P.E., TOUSSON, T.A., MARASAS, W.F.O. *Fusarium Species – An Illustrated Manual for Identification*. Pennsylvania: Pennsylvania State University Press, 1983.

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.; DIGNANI, M.C.; ANAÏSSIE, E.J. Taxonomy, Biology, and Clinical Aspects of *Fusarium* Species. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 7, n. 4, p. 479 – 504, 1994.

NORRED, W.P. Fumonisin – Mycotoxins Produced by *Fusarium moniliforme*. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, v. 38, p. 309 – 328, 1993.

OCHIAI, N.; FUJIMURA, M.; OSHIMA, M.; MOTOYAMA, T.; ICHIISHI, A.; YAMADA – OKABE, H.; YAMAGUCHI, I. Effects of Iprodione and Fludioxonil on Glycerol Synthesis and Hyphal Development in *Candida albicans*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 66, n. 10, p. 2209 – 2215, 2002.

ONO, E. Y. S.; KAWAMURA, O.; ONO, M. A.; UENO, Y.; HIROOKA, E.Y. A Comparative Study of Indirect Competitive ELISA and HPLC for Fumonisin Detection in Corn of the State of Paraná, Brazil. *Food and Agricultural Immunology*, v. 12, p. 5 – 14, 2000.

ONO, E.Y.S.; SILVA, M.; HASHIMOTO, E.H.; VIZONI, E.; KAWAMURA, O.; SUGIURA, Y.; HIROOKA, E.Y. Mycotoxicological Quality Evaluation of Corn Samples Used by Processing Industries in the Northern region of Paraná State, Brazil. *Food Additives and Contaminants*, v. 25, n. 11, p. 1392–1399, 2008.

ONO, E.Y.S.; SUGIURA, Y.; HOMECHIM, M.; KAMOGAE, M.; VIZZONI, E.; UENO, Y.; HIROOKA, E.Y. Effect of Climatic Conditions on Natural Mycoflora and Fumonisin in Freshly Harvested Corn of the State of Paraná, Brazil. *Mycopathologia*, v. 147, p. 139-148, 1999.

OTTO, H.J.; EVERETT, H.L. Influence of Nitrogen and Potassium Fertilization on the Incidence of Stalk Rot of Corn. *Agronomy Journal*, v. 48, p. 301 – 305, 1956.

OVERREIN, L.N; MOE, P.G. Factors Affecting Urea Hydrolysis and Ammonia Volatilization in Soil. *Soil Science Society of America Proceedings*, v.31, p. 57-61, 1967.

PFAFFL, M.W. A New Mathematical Model for Relative Quantification in Real Time RT – PCR. *Nucleic Acids Research*, v. 29, n. 9, p. 2002 – 2007, 2001.

PIPERINO, 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.

PLATTNER, R.D.; SHACKELFORD, D.D. Biosynthesis of Labeled Fumonisin in Liquid Cultures of *Fusarium verticillioides*. *Mycopathologia*, v. 117, p. 17 – 22, 1992.

PROCTOR, R.H.; BROWN, D.W.; PLATTNER, R.D.; DESJARDINS, A.E. Co – expression of 15 Contiguous Genes Delineates a Fumonisin Biosynthetic Gene Cluster in *Gibberella moniliformis*. *Fungal Genetics and Biology*, v.38, p.237 – 249, 2003.

PROCTOR, R.H.; DESJARDINS, A.E.; PLATTNER, R.D.; HOHN, T.M. A Polyketide Synthase Gene Required for Biosynthesis of Fumonisin Mycotoxins in *Gibberella fujikuroi* Mating Population A. *Fungal Genetics and Biology*, v. 27, p. 100 – 112, 1999.

PROCTOR, R.H.; PLATTNER, R.D.; DESJARDINS, A.E.; BUSMAN, M.; BUTCHKO, A.E. Fumonisin Production in the Maize Pathogen *Fusarium verticillioides*: Genetic Basis of Naturally Occurring Chemical Variation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, n.6, p. 2424 – 2430, 2006.

RAIJ, B. V. Fertilidade do solo e adubação. Piracicaba: Potafos/Ceres, 285 p.,1991.

REYNERI, A. The Role of Climatic Condition on Micotoxin Production in Cereal. *Veterinary Research Communications*, v. 30, n. 1, p. 87–92, 2006.

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

RILEY, R.T.; AN, N.H.; SHOWKER, J.L.; YOO, H.S.; NORRED, W.P.; CHAMBERLAIN, W.J.; WANG, E.; MERRIL, A.H.; MOTELIN, G.; BEASLY, V.R.; HASCHEK, V.M. Alteration of Tissue and Seum 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.

RODRIGUEZ – DEL – BOSQUE, L.A. Impact of Agronomic Factors on Aflatoxin Contamination in Preharvest Field Corn in Northeastern Mexico. *Plant Disease*, v. 80, p. 988 – 993, 1996.

SAMSON, R.A., HOESKSTRA, E.S., FRISVAD, J.C., FILTENBORG, O. *Introduction to Food-Borne Fungi*. 4.ed. The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 1995.

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

SEO, J.A.; LEE, Y.W. Natural occurrence of the C Series of Fumonisin in Moldy Corn. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 65, n. 3, p. 1331 – 1334, 1998.

SEO, J.A.; PROCTOR, R.H.; PLATTNER, R.D. Characterization of Four Clustered and Coregulated Genes Associated with Fumonisin Biosynthesis in *Fusarium verticillioides*. *Fungal Genetics and Biology*, v. 34, p. 155 – 165, 2001.

SHELBY, R.A.; WHITE, D.G.; BAUSKE, E.M. Differential Fumonisin Production in Maize Hybrids. *Plant Disease*, v. 78, p. 582 – 584, 1994.

SHEPHARD, G.S., SYDENHAM, E.W., THIEL, P.G., GELDERBLUM, W.C.A. Quantitative Determination of Fumonisin B₁ and B₂ by High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. *Journal of Liquid Chromatography*, v. 13., p. 2077-2087, 1990.

SHIM, W.B.; WOLOSHUK, C.P. Nitrogen Repression of Fumonisin B₁ Biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*. *Fems Microbiology Letters*, v. 177, p. 109 – 116, 1999.

SINGH, K., FRISVAD, J.C., THRANE, U., MATHUR, S.B. An Illustrated Manual on Identification of Some Seed-Borne *Aspergilli*, *Fusaria*, *Penicillia* and Their Mycotoxins. *Hellerup/Denmark/: Danish Government*, 1991.

SIRANIDOU, E.; BUCHENAUER, H. Chemical Control of *Fusarium* Head Blight on Wheat. *Journal of Plant Diseases and Protection*, v. 108, p. 231 – 243, 2001.

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.

SORIANO, J.M.; DRAGACCI, S. Intake, Decontamination and Legislation of Fumonisin in Foods. *Food Research International*, v. 37, p. 367–374, 2004.

SUN, G.; WANG, S.; HU, X.; SU, J.; HUANG, T.; YU, J.; TANG, L.; GAO, W.; WANG, J.S. Fumonisin B₁ Contamination of Home-Grown Corn in High-Risk Areas for Esophageal and Liver Cancer in China. *Food Additives and Contaminants*, v. 24, n. 2, p. 181 – 185, 2007.

SWEENEY, M.J.; DOBSON, A.D.W. Mycotoxin Production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* Species. *International Journal of Food Microbiology*, v. 43, p. 141 – 158, 1998.

TANAKA, M.A.S. Sobrevivência de *Fusarium moniliforme* em Sementes de Milho Mantidas em Duas Condições de Armazenamento. *Fitopatologia Brasileira*, v. 26, p. 60-64, 2001.

THIEL, P. G., MARASAS, W. F. O., SYDENHAM, E. W., SHEPHARD, G. S., GELDERBLUM, W. C. A. The Implications of Naturally Occurring Levels of Fumonisin in Corn for Human and Animal Health. *Mycopathologia*, v. 117, 3 – 9, 1992.

TUDZYNSKI, B.; HOLTER, K. Gibberellin Biosynthetic Pathway in *Gibberella fujikuroi*: Evidence for a Gene Cluster. *Fungal Genetics and Biology*, v. 25, p. 157 – 170, 1998.

UENO, Y., AOYAMA, S., SUGIURA, Y., WANG, D.S., LEE, U.S., HIROOKA, E.Y., HARA, S., KARKI, T., CHEN, G., YU, S.Z. A Limited Survey of Fumonisin in Corn and Corn-Based Products in Asian Countries. *Mycotoxin Research*, v. 9, p. 27-34, 1993.

WANG, E.; NORRED, W.P.; BACON, C.P., RILEY, R.T.; MERILL JR, A.H. Inhibition of Sphingolipid Biosynthesis by Fumonisin: Implications for Diseases Associated with *Fusarium moniliforme*. *Journal of Biological Chemistry*, v. 266, p. 14486-14490, 1991.

WANG, E.; ROSS, P.F.; WILSON, T.M.; RILEY, R.T.; MERRILL, A.H. Increases in Serum Sphingosine and Sphinganine and Decreases in Complex Sphingolipids in Ponies Given Feed Containing Fumonisin, Mycotoxins Produced by *Fusarium moniliforme*. *Journal of Nutrition*, v. 122, n. 8, p. 1706 – 1716, 1992.

WANG, E.; STEC, A.; HEY, J.; LUKENS, L.; DOEBLEY, J. The Limits of Selection During Maize Domestication. *Nature*, v. 398, p. 236 – 239, 1999.

WEIBKING, T. S., LEDOUX, D. R., BERMUDEZ, A. J., TURK, J. R., ROTTINGHAUS, G. E., WANF, E., MERRILL, A. H. Effects of Feeding *Fusarium moniliforme* Culture Material, Containing Known Levels of Fumonisin B₁ on the Young Broiler Chick. *Poultry Science*, v. 72, p. 456 – 466, 1993.

WEIDENBÖRNER, M. Food and Fumonisin. *Europe Food Research Technology*, v. 212, p. 262 – 273, 2001.

WIDSTROM, N.W. The Aflatoxin Problem with Corn Grain, 1996. In: BLANDINO, M.; REYNERI, A.; VANARA, F. Influence of Nitrogen Fertilization on Mycotoxin Contamination of Maize Kernels. *Crop Protection*, v. 27, p. 222 – 230, 2008.

WILSON, T.M.; NELSON, P.E.; RYAN, T.B.; ROUSE, C.D.; PITTMAN, C.W.; NEAL, T.P.; PORTERFIELD, M.L.; SAUNDERS, G.K. Linking Leukoencephalomalacia to Commercial Horse Rations. *Veterinary Medicine*, v. 80, p. 63 – 69, 1985.

WOLOSHUK, C.P.; SHIM, W.B. Regulation of Fumonisin B₁ Biosynthesis and Conidiation in *Fusarium verticillioides* by a Cyclin-Like (C-Type) Gene, *FCC1*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 67, n.4, p. 1607–1612, 2001.

XU, J.R. MAP Kinases in Fungal Pathogens. *Fungal Genetics and Biology*, v. 31, n. 3, p. 137 – 152, 2000.

YANG, C.S. Research on Esophageal Cancer in China: A Review. *Cancer Research*, v. 40, p. 2633 – 2644, 1980.

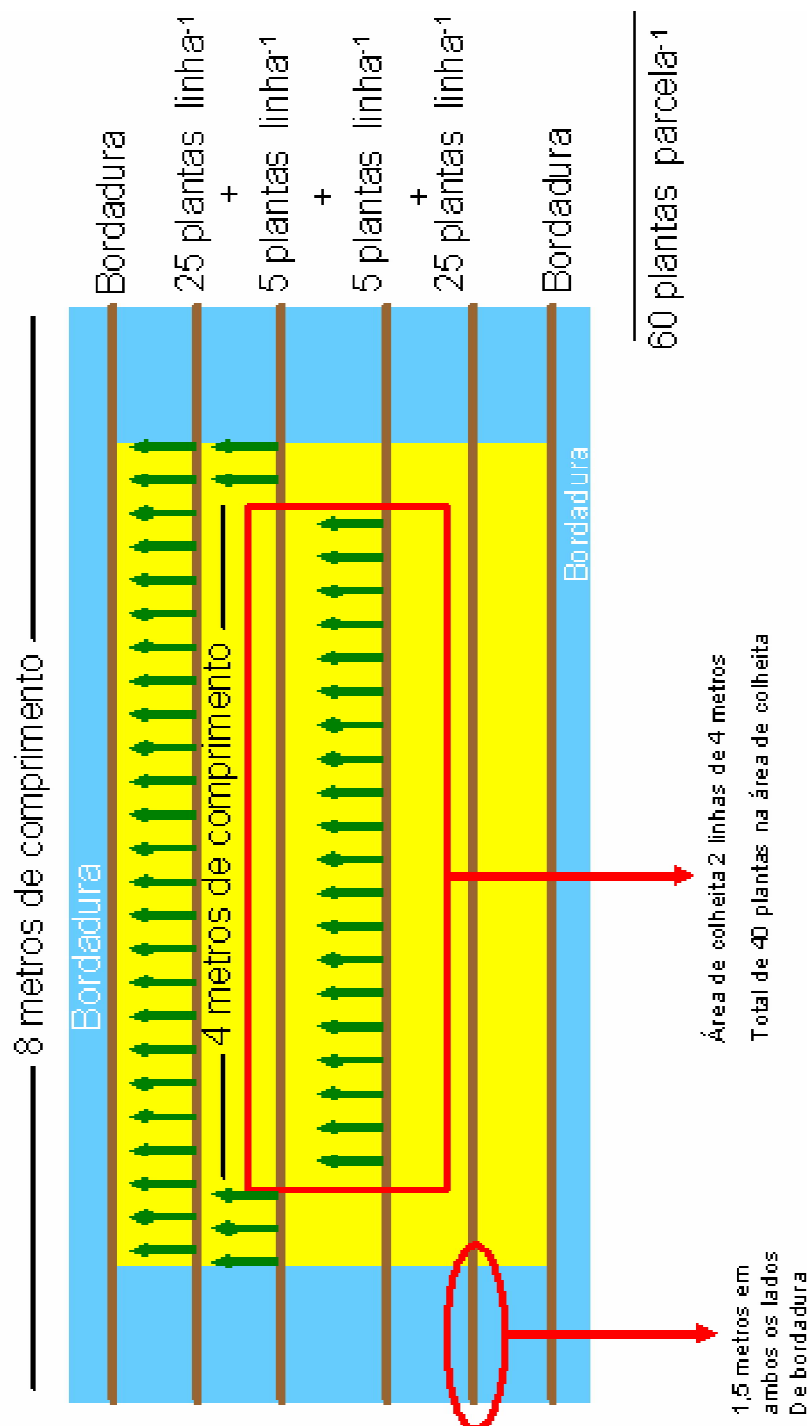
YI, H.; BOJJA, R.V.; FU, J.; LIANGCHENG, D. Direct Evidence for the Function of *FUM13* in 3 – Ketoreduction of Mycotoxin Fumonisin in *Fusarium verticillioides*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, p. 5456 – 5460, 2005.

YOUNTS, S.E.; MUSGRAVE, R.B. Chemical Composition, Nutrient Absorption and Stalk Rot Incidence of Corn as Affected by Chloride in Potassium Fertilizer. *Agronomy Journal*, v. 50, p. 426 – 429, 1958.

ZHANG, Y.; LAMM, R.; PILLONEL, C.; LAM, S.; XU, J.R. Osmoregulation and Fungicide Resistance: the *Neurospora crassa* *os – 2* Gene Encodes a *HOG1* Mitogen – Activated Protein Kinase Homologue. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 68, n. 2, p. 532 – 538, 2002.

ZUMMO, N.; SCOTT, G. E. Interaction of *Fusarium moniliforme* and *Aspergillus flavus* on Kernel Infection and Aflatoxin Contamination in Maize Ears. *Plant Disease*, v. 76, p. 771 – 773, 1992.

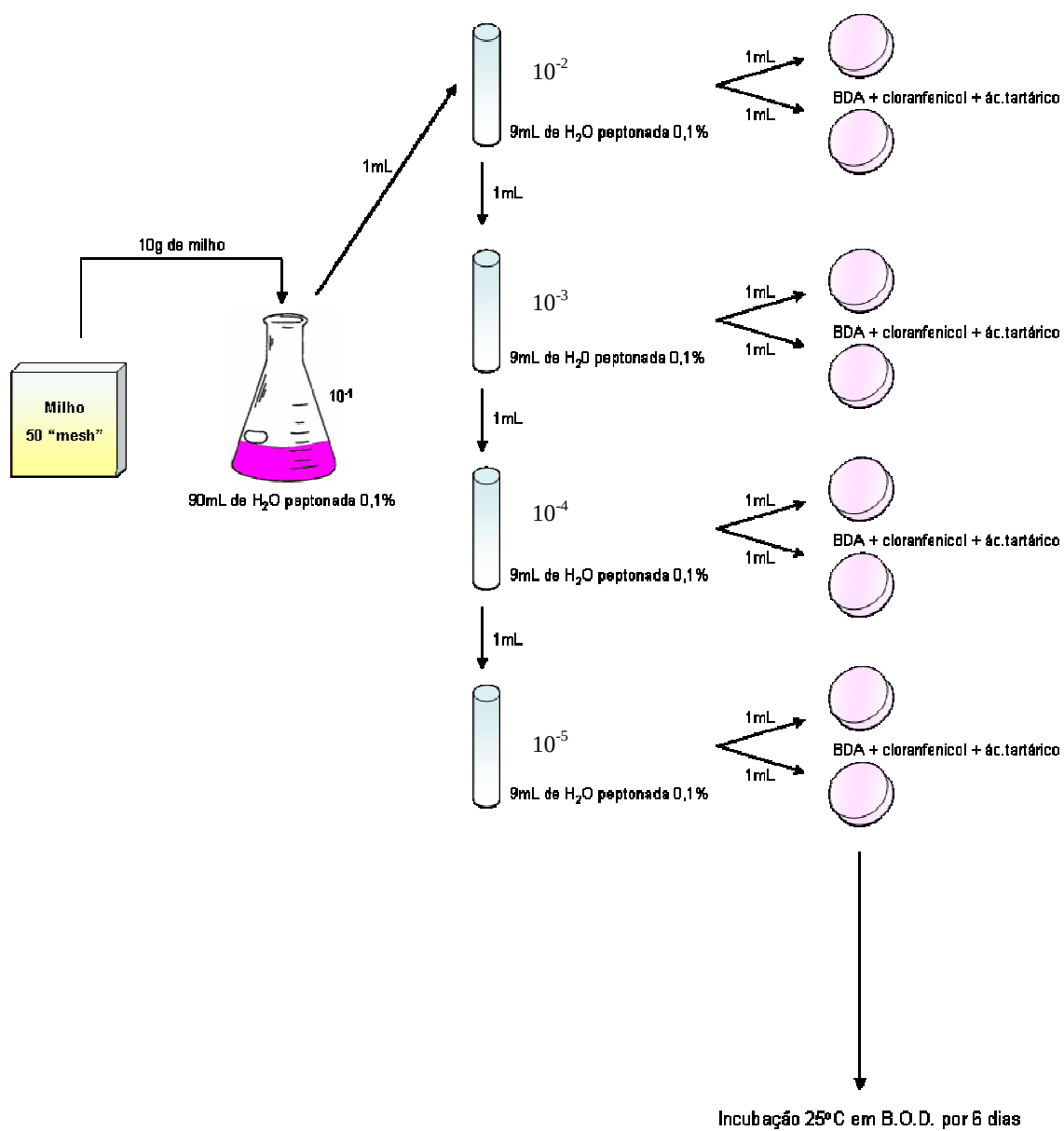
ANEXO 1 – Parcelas dos Experimentos com Milho

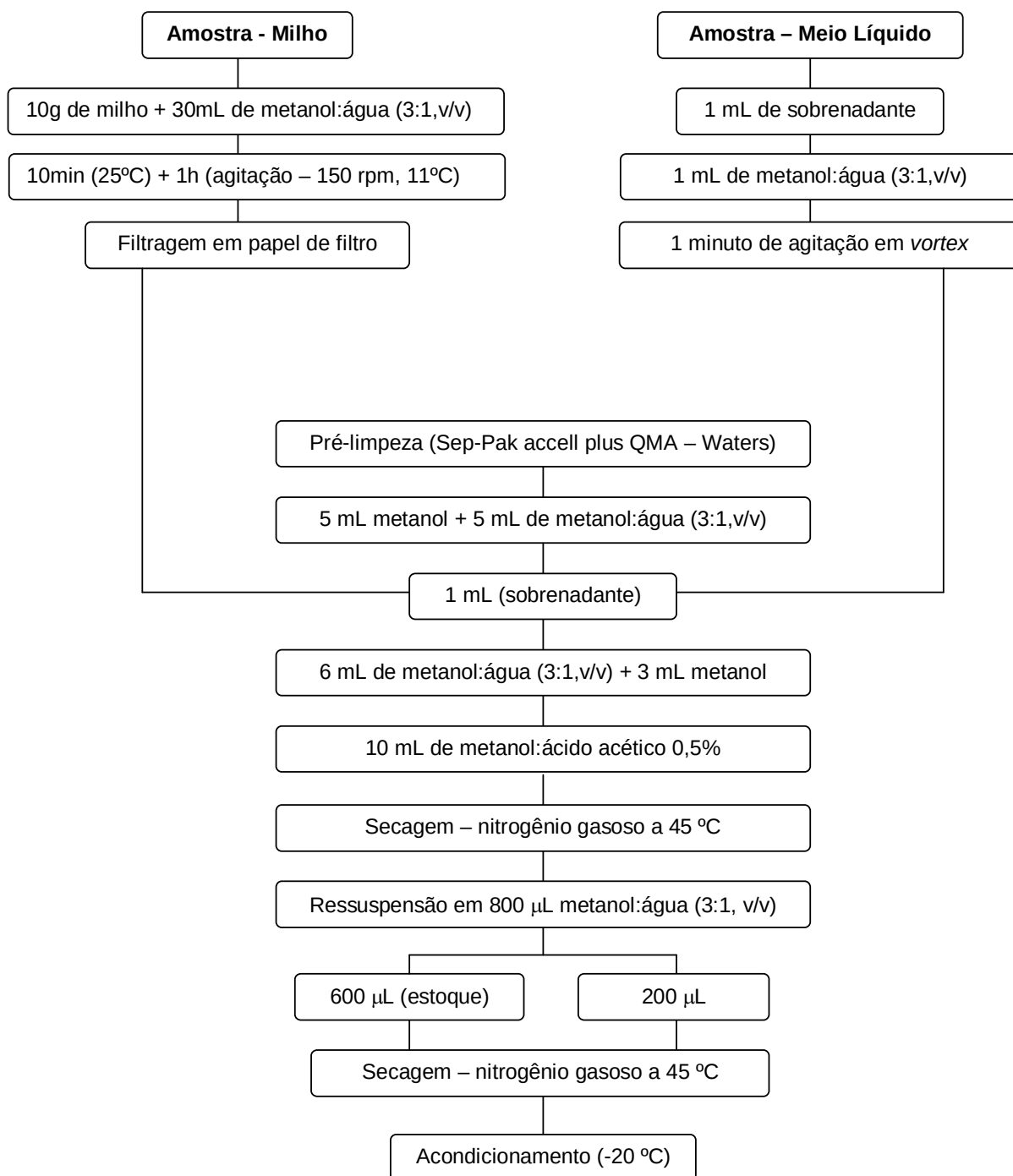


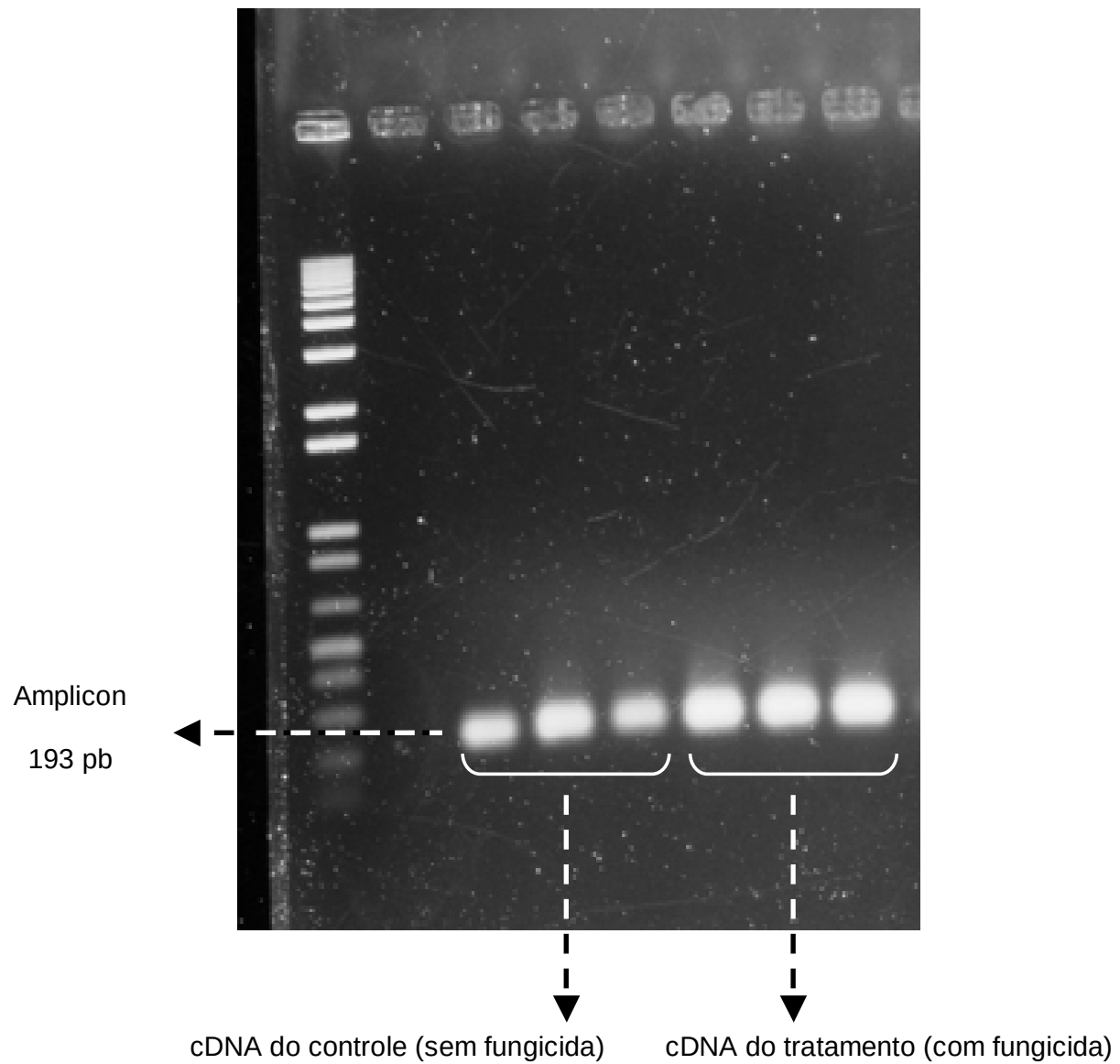
ANEXO 2 – Tratamentos dos Experimentos com Milho

Tratamento	N Plantio	N Cobertura	N Total	Fonte de N
	Kg/ha			
Controle 1	0	0	0	---
Controle 2	40	0	40	---
1	40	40	80	Uréia
2	40	120	160	Uréia
3	40	200	240	Uréia
4	40	40	80	Uréia + NBPT
5	40	120	160	Uréia + NBPT
6	40	200	240	Uréia + NBPT

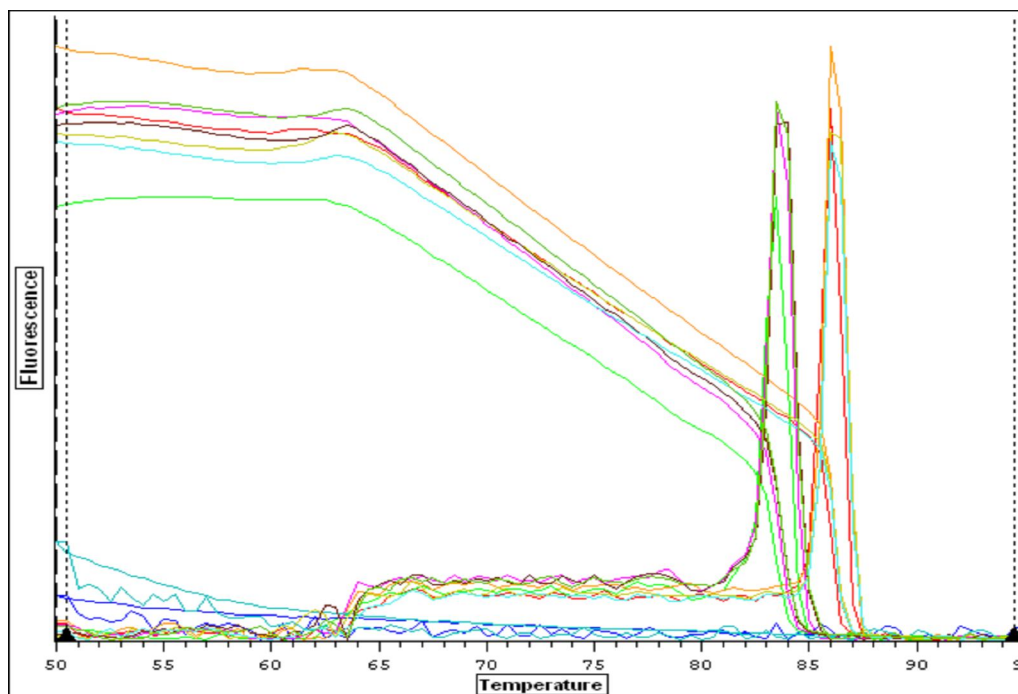
ANEXO 3 – Avaliação da Microbiota Fúngica



ANEXO 4 – Extração de Fumonisinhas

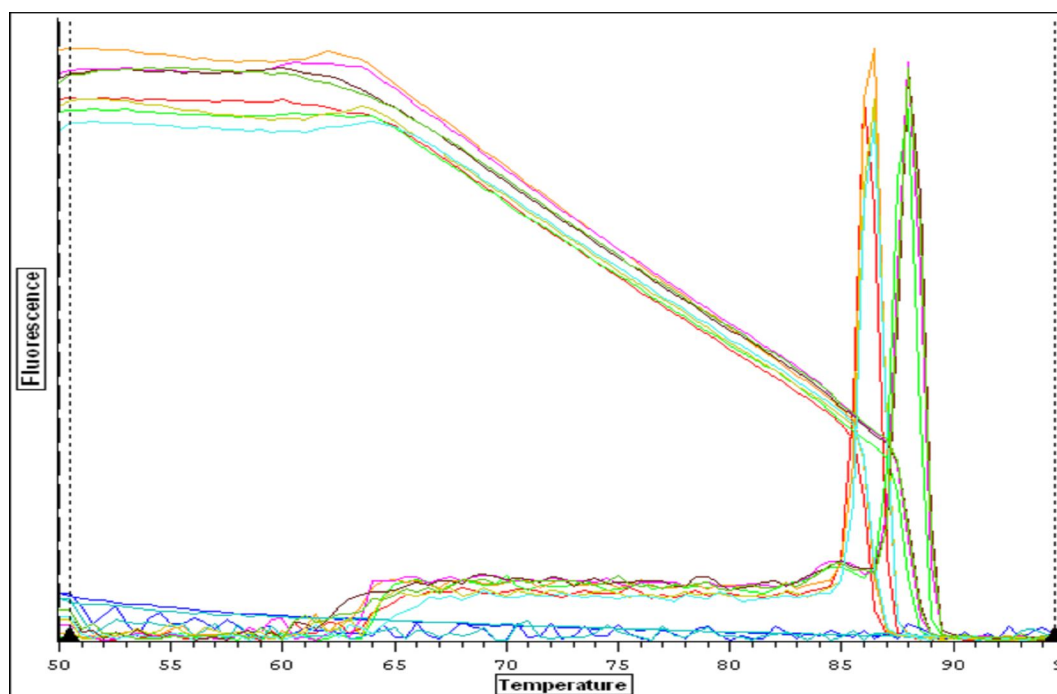
ANEXO 5 – Gel de cDNA e Teste de *Primers* para o gene *TUB2*

ANEXO 6 – Curvas de *Melting* dos Experimentos de PCR em Tempo Real para o Gene *FUM21*



Amostra	Eficiência	C(t)	Tm (°C)
Tub C1	1.90	23.09	86
Fum 21 C1	1.79	28.51	83.5
Branco Tub	N/A	N/A	50.5
Tub C2	1.81	22.87	86
Fum 21 C2	1.76	27.85	83.5
Branco Fum21	N/A	N/A	50.5
Tub T1	1.87	20.54	86
Fum 21 T1	1.89	25.22	84
Tub T2	1.98	20.69	86
Fum 21 T2	1.84	25.20	83.5

ANEXO 7 – Curvas de *Melting* dos Experimentos de PCR em Tempo Real para o Gene *FUM1*



Amostra	Eficiência	C(t)	Tm (°C)
Tub C1	1.88	22.38	86
Fum 1 C1	1.87	22.92	88
Branco Tub	N/A	N/A	50.5
Tub C2	1.87	22.48	86.5
Fum 1 C2	1.93	22.90	88
Branco Fum1	N/A	N/A	50.5
Tub T1	1.91	19.92	86.5
Fum 1 T1	1.90	21.37	88
Tub T2	1.99	19.79	86.5
Fum 1 T2	1.98	21.14	88

ANEXO 8 – Instruções Normativas da *Food Additives and Contaminants*

Food Additives and Contaminants: Part A publishes original research papers and critical reviews covering analytical methodology, occurrence, persistence, safety evaluation, detoxification and regulatory control of natural and man-made additives and contaminants in the food and animal feed chain. Papers are published in the areas of pesticide and veterinary drug residues, environmental contaminants, natural toxicants, mycotoxins, trace elements, migration from food packaging, food processing contaminants, authenticity and allergenicity of foods. Papers are published on animal feeds where residues and contaminants can give rise to food safety concerns. Contributions cover chemistry, biochemistry and bioavailability of these substances, factors affecting levels during production, processing, packaging and storage; the development of novel foods and processes; exposure and risk assessment.

Manuscript Preparation

1. General guidelines

- Papers are accepted only in English.
- Manuscripts should be compiled in the following order: title page; abstract; keywords; main text; acknowledgments; appendices (as appropriate); references; table(s) with caption(s) (on individual pages); figure caption(s) (as a list). A word count should be included and authors should indicate if the paper is for a special issue.
- Abstracts are required for all papers submitted.
- Each paper should have two to twelve keywords taken only from designated listing available on Manuscript Central.
- Section headings should be concise.
- For all manuscripts non-discriminatory language is mandatory. Sexist or racist terms should not be used.
- Authors must adhere to SI units. Units are not italicised.
- When using a word which is or is asserted to be a proprietary term or trade mark, authors must use the symbol ® or TM.
- Authors should NOT use ppb or ppm as units of concentration but should use ng g⁻¹ and mg kg⁻¹ respectively
- **References are cited by author and year in the text and listed alphabetically - for a full description see Complete Style Guide.**

2. Figures

- It is in the author's interest to provide the highest quality figure format possible. Please be sure that all imported scanned material is scanned at the appropriate resolution: 1200 dpi for line art, 600 dpi for grayscale and 300 dpi for colour.
- Figures must be saved separate to text. Please do not embed figures in the paper file.
- Files should be saved as one of the following formats: TIFF (tagged image file format), PostScript or EPS (encapsulated PostScript), and should contain all the necessary font information and the source file of the application (e.g. CorelDraw/Mac, CorelDraw/PC).
- All figures must be numbered in the order in which they appear in the paper (e.g. figure 1, figure 2). In multi-part figures, each part should be labelled (e.g. figure 1(a), figure 1(b)).
- Figure captions must be saved separately, as part of the file containing the complete text of the paper, and numbered correspondingly.
- Figures should be produced as near to the finished size as possible.
- The filename for a graphic should be descriptive of the graphic, e.g. Figure1, Figure2a.

3. Style guidelines

- Description of the Journal's article style Please note that sections should not be numbered.

Journal title and acronym	Studies on Neotropical Fauna and Environment (nNFE)
Catchline	<i>Journal Title</i> Vol. X, No. X, Month 2008, 1–3 top of page 1, ranged left
Running heads	(verso) <i>J. Smith and P. Jones</i> or <i>J. Smith et al.</i> if 3 or more authors. If J.B. Smith then initials are closed up (recto) <i>Journal Title</i> position left and right of pages
Article type (when needed)	RESEARCH ARTICLE bold caps, ranged left
Title	Bold, first word and proper nouns cap only ranged left
Authors	An Author and Another Author (initials closed up if J.B. Smith) ranged left
Affiliation	^a Department, University, City, Country; ^b Department, University, City, Country ranged left
Received dates	(Received 20 July 2005; final version received 17 August 2006) After affiliation, ranged left
Abstract	Text smaller, indented both sides ranged left
Keywords	Keywords: word; another word; lower case except names Position aligned with abstract, same size as abstract
Correspondence details	Given as footnote on page 1* *Corresponding author. Email: xxxxxx ranged left, no indent. Postal address not needed. If there is only one author, use *Email: xxxxxx
Headings	A. Bold initial cap only B. <i>Bold italic initial cap only</i> C. <i>Italic initial cap only</i> D. <i>Italic initial cap only</i> . Text runs on All ranged left, numbers to be included if supplied, no indent below.
Paragraphs	Indented
Tables	(Table 1) in text. Table 1. Title initial cap only. (ranged left above table) Note: This is a note. (ranged left under table)
Figures	(Figure 1) in text. Figure 1. Caption initial cap only. (ranged left under figure) Note: This is a note. (ranged left under figure)
Acknowledgements	A heading. Goes before notes, bio notes and refs

- Description of the Journal's reference styles. Please note that references are cited by author and year in the text and listed alphabetically - for a full description see Complete Style Guide.

Journal Article	Author AA, Author BB. Year. Article title. Abbr J Title. Volume: pages.
	Smart N, Fang ZY, Marwick TH. 2003. A practical guide to exercise training for heart failure patients. <i>J Card Fail.</i> 9(1):49–58.
Book	Author AA, Author BB. Year. Title of book. Edition. Place of publication: publisher. Extent. Notes.
	Schott J, Priest J. 2002. Leading antenatal classes: a practical guide. 2nd ed. Boston (MA): Books for Midwives.
Chapter	Author AA. Year. Title of book. Place of publication: Publisher. Chapter X, Title of chapter; extent.
	Shakelford RT. 1978. Surgery of the alimentary tract. Philadelphia (PA): W.B. Saunders. Chapter 2, Esophagoscopy; p. 29–40.
Internet document	Author. Title of document [Internet]. Date of publication. Place (State): Publisher; [cited Year Mon date]. Available from: URL
	APSnet: plant pathology online [Internet]. c1994–2005. St Paul (MN): American Phytopathological Association; [cited 2005 Jun 20]. Available from: http://www.apsnet.org/
Newspaper article	Author A. Year Mon date. Title of article. Title of Newspaper (edition). section:beginning page of article (col. X).
	Weiss R. 2003 Apr 11. Study shows problems in cloning people. <i>Washington Post</i> (Home Ed.). Sect. A:12 (col. 1).
Thesis	Author A. Year. Title of thesis [degree and type of thesis]. [Place of publication]: Name of University.
	Lutz M. 1989. 1903: American nervousness and the economy of cultural change [dissertation]. [Stanford (CA)]: Stanford University.
Conference paper	Author A. Year. Title of paper. Paper presented at: Title of conference. Number and name of conference; date; Place.
	Antani S, Long SR. 2003. Anatomical shape representation in spine x-ray images. Paper presented at: VIIP 2003. Proceedings of the 3rd IASTED International Conference on Visualization; Benalmadena, Spain.

4. Colour

There are a limited number of colour pages within the annual page allowance. Authors should restrict their use of colour to situations where it is necessary on scientific, and not merely cosmetic, grounds.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)