

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
BIOLOGIA DE FUNGOS

SUSANE CAVALCANTI CHANG

**IDENTIFICAÇÃO DE ISOLADOS DE *Fusarium verticillioides*
MICOTOXIGÊNICOS EM GRÃOS DE MILHO NO ESTADO DE PERNAMBUCO**

RECIFE
2014

SUSANE CAVALCANTI CHANG

**IDENTIFICAÇÃO DE ISOLADOS DE *Fusarium verticillioides*
MICOTOXIGÊNICOS EM GRÃOS DE MILHO NO ESTADO DE PERNAMBUCO**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Biologia de Fungos.

Orientadora: Profa. Dra. Neiva Tinti de Oliveira.

Coorientador: Cledir Santos

RECIFE
2014

SUSANE CAVALCANTI CHANG

**IDENTIFICAÇÃO DE ISOLADOS DE *Fusarium verticillioides*
MICOTOXIGÊNICOS EM GRÃOS DE MILHO NO ESTADO DE PERNAMBUCO**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Biologia de Fungos.

Aprovada em: 27/02/2014

COMISSÃO EXAMINADORA

Dra. Neiva Tinti de Oliveira /UFPE

Dra. Norma Gusmão /UFPE

Dr. Nelson Lima /UMINHO-Portugal

Dra. Janete Magali de Araújo /UFPE

Dr. Antônio Félix da Costa / IPA-PE

Dra. Mariele Porto Carneiro Leão/ UFPE

Dra. Cristina Maria de Souza Motta / UFPE

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Chang, Susane Cavalcanti

Identificação de isolados de *Fusarium verticillioides* micotoxigênicos em grãos de milho no Estado de Pernambuco / Susane Cavalcanti Chang- Recife: O Autor, 2014.

144 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Neiva Tinti de Oliveira

Coorientador: Cledir Santos

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Biociências. Biologia de Fungos, 2014.

Inclui referências e anexos

1. *Fusarium* 2. Milho- doenças e pragas 3. Pernambuco I. Oliveira, Neiva Tinti de (orient.) II. Santos, Cledir (coorient.) III. Título

579.5677

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2017- 435

*Ao meu querido Juan, ao meu pai, Chang, que onde estiver está feliz com esta conquista
e a todos que torceram por mim na conclusão desta importante etapa na minha vida*



AGRADECIMENTOS

A Deus, que me protege e me ama infinitamente, me proporcionando inúmeros momentos de alegria e realizações, e me fortalece perante os obstáculos, me fazendo enxergá-los como oportunidade de crescimento e me ajudando a transpor os mesmos com sucesso;

A minha mãe, Geisa, pelo amor e incentivo em todos os momentos;

Ao meu mais que especial Juan, por todo amor, cuidado, compreensão, admiração, incentivo e por me fazer feliz sempre (!);

A minha família: tios, tias, primos e minha madrinha Lia, que sempre vibram por cada conquista minha e por mim tem enorme carinho;

A minha querida orientadora, Neiva Tinti de Oliveira, e meu querido co-orientador e anfitrião Cledir Santos, pela orientação, incentivo, amizade, carinho e pelo exemplo de pessoas generosas e competentes;

A todos os professores do Programa de Pós Graduação em Biologia de Fungos, pela contribuição na minha formação e pelo carinho e amizade;

A todos os meus amigos ao longo dos cursos de Mestrado e Doutorado;

Aos queridos amigos e companheiros de laboratório de Fitopatologia e Biologia Molecular: Mariele Porto, Patricia Tiago, Fabíola, Emanuelle, Bárbara, Sérgio Ramos, Renan Nascimento, Felipe, Ricardo, Ana e minha querida estagiária Benny, por toda ajuda e ótimo convívio dentro e fora do laboratório;

Aos amigos e companheiros da Micoteca da Universidade do Minho, Braga – Portugal: Marta Simões, Lúcia Diogo, Leonel Pereira, André Antunes e Dr. Nelson Lima pela por tornar minha estada uma experiência de vida maravilhosa (!);

Aos queridos amigos do curso de Pós Graduação em Biologia de Fungos: Georgea Santos, Tatianne Leite, Heloiza Oliveira, Thaís Feijó,

Araeska Carenna, Nelson Lima, Phelipe Oller e ao meu amigo Paul Gamboa, pelo carinho e amizade;

As minhas queridas amigas de sempre: Paula Vieira, Clarissa Sobral, Cecília Soares, Mariana Bandeira, Talita Nascimento, Pauliana Galvão por todo apoio em tudo, sempre (!);

Aos amigos e colegas que torceram por mim ao longo destes anos;

Aos meus mais novos amigos Deivid William, Adele Aud, Cíntia Sargo, Rafaela Coelho e Joseana Rocha pela amizade e momentos mágicos durante nossa “estada portuguesa”;

Ao Dpto. de Micologia da UFPE e CAPES, pelo suporte estrutural e financeiro no decorrer deste trabalho.

.

RESUMO

Fusarium verticillioides Sacc. Nirenberg (= *Fusarium moniliforme* Sheldon) é um fungo parasita não obrigatório, micotoxigênico em potencial, de ocorrência comum em culturas de milho, causando podridão da raiz, colmo, espiga e deterioração de grãos armazenados. É considerado mundialmente um dos mais importantes produtores de fumonisina em cereais utilizados na dieta humana e em rações animais, que uma vez contaminados, são prejudiciais aos homens e animais que os ingerem. Sendo o milho uma das principais fontes de carboidratos nas culturas ocidentais, este estudo propôs a identificação polifásica de isolados de *F. verticillioides* micotoxigênicos em grãos de milho de diferentes regiões de Pernambuco (Brasil), um importante produtor de milho da Região Nordeste do Brasil, a análise da variabilidade genética por marcadores moleculares ISSR e a detecção da presença de fumonisinas B₁ e B₂ pelo uso da técnica de MALDI-TOF MS. Foram analisados 60 isolados de *F. verticillioides* obtidos de três diferentes regiões de Pernambuco, identificados pela taxonomia clássica, biologia molecular, bioquímica (análise de fumonisinas B₁ e B₂ por MALDI-TOF MS) e por perfis proteômicos por MALDI-TOF ICMS. Todos os isolados apresentaram amplificação para o gene *FUM1*, demonstrando a capacidade para produzir fumonisina, sendo a detecção das fumonisinas B₁ e B₂ confirmadas posteriormente pela técnica de MALDI-TOF MS. As amplificações com os *primers* (GTG)₅ e (GACA)₄ não evidenciaram agrupamento dos isolados quanto a região de origem e também evidenciaram baixa variabilidade genética intraespecífica. Isto foi confirmado mais tarde pelo uso da técnica de MALDI-TOF ICMS, que se mostrou eficiente quanto à identificação de fungos filamentosos e à detecção de micotoxinas, embora haja necessidade de ampliação das informações no banco de dados para este tipo de micro-organismo.

Palavras-chave: ISSR, MALDI-TOF ICMS, micotoxinas, fumonisina.

ABSTRACT

Fusarium verticillioides Sacc. Nirenberg (= *Fusarium moniliforme* Sheldon) is a potential mycotoxigenic and non-obligatory parasite fungus that commonly infects corn, causing damage to the roots, stem, and cobs and deterioration of stored seeds. It is considered one of the most important global producer of fumonisin in grains used for food or feed production. It makes them as potential prejudicial to both humans and animals. Corn is one of the principal source of carbohydrates in the western cultures. The present study established a polyphasic approach to identify 60 isolates of potential mycotoxigenic strains of *F. verticillioides* in corn kernels from different regions of Pernambuco State (Brazil), an important corn producer in the northeast region of Brazil. All isolates were obtained from three different regions of Pernambuco State and identified by classical taxonomy, biochemical assays (fumonisins B₁ and B₂ analysis by MALDI-TOF MS), proteomic profiles by MALDI-TOF ICMS and molecular biology, using ISSR molecular markers. For all isolates it was possible to amplify the *FUM1* gene from, demonstrating their capacity to produce fumonisin, which was later confirmed by MALDI-TOF MS analysis. Amplifications using the primers (GTG)₅ and (GACA)₄ did not demonstrate any differences between isolates from different regions, indicating little intraspecific genetic variability. It was later confirmed through the fungal proteomic profiles by MALDI-TOF ICMS. MALDI-TOF ICMS was effective for mycotoxin detection and for the fungal identification at species level, although there is need to expand the information in the database for this fungal species.

Keywords: ISSR, MALDI-TOF ICMS, mycotoxins, fumonisin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS MICROSCÓPICAS DO GÊNERO <i>FUSARIUM</i> . MACROCONÍDIOS DE <i>F. ACUMINATUM</i> (1), <i>F. EQUISETI</i> (2) E <i>F. GRAMINEARUM</i> (3). MICROCONÍDIOS DE <i>F. FUJIKUROI</i> (4), <i>F. PROLIFERATUM</i> (5) E <i>F. VERTICILLIOIDES</i> (6). CLAMIDOSPOROS DE <i>F. OXYSPORUM</i> (7), <i>F. EQUISETI</i> (8) E <i>F. SOLANI</i> (9).....	23
FIGURA 2 – CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS MICROSCÓPICAS DE <i>FUSARIUM VERTICILLIOIDES</i>	25
FIGURA 3 – ESTRUTURA QUÍMICA DAS FUMONISINAS FB1-FB4, A1 E A2. Erro! Indicador não definido.	
FIGURA 4 – ESQUEMA DO CLUSTER <i>FUM</i> DE <i>FUSARIUM VERTICILLIOIDES</i> . AS SETAS INDICAM A LOCALIZAÇÃO E A ORIENTAÇÃO DOS GENES. OS NÚMEROS 1 E 6-19 INDICAM OS GENES <i>FUM1</i> E <i>FUM6-19</i>	33
FIGURA 5 – COMPARAÇÃO ENTRE AS ESTRUTURAS DAS FUMONISINAS B1, B2, ESFINGOSINA E ESFINGANINA.	35
FIGURA 6 – LOCAIS DE AÇÃO DAS FUMONISINAS (FB) NA SÍNTESE DE ESFINGOLIPÍDEOS. ABREVIATURAS: SPTASE (SERINA PALMITOILTRANSFERASE, CER SINTASE (CERAMIDA SINTASE), DHC-DESSATURASE (DIIDROCERAMIDA DESSATURASE), SO-KINASE E -LIASE (ESFINGOSINA QUINASE E LIASE).	36
FIGURA 7 – ESQUEMA BÁSICO DE AMPLIFICAÇÃO DE UM SEGMENTO ESPECÍFICO DE DNA PELA TÉCNICA DA PCR.....	53
FIGURA 8 – PRINCIPAIS MATRIZES USADAS NA TÉCNICA DE MALDI-TOF ICMS	59
FIGURA 9 – ILUSTRAÇÃO DE ALGUMAS CULTURAS DE <i>FUSARIUM VERTICILLIOIDES</i> . CULTURAS INCUBADAS DURANTE 4 DIAS NO ESCURO, A 25°C EM MEIO DE CULTURA BATATA-DEXTROSE-ÁGAR (BDA). (A) E (B) VERSO E REVERSO, RESPECTIVAMENTE, DO ISOLADO N° 10; (C) E (D) VERSO E REVERSO, RESPECTIVAMENTE, DO ISOLADO N° 59; (E) E (F) VERSO E REVERSO, RESPECTIVAMENTE, DO ISOLADO N° 28; (G) E (H) VERSO E REVERSO, RESPECTIVAMENTE, DO ISOLADO N° 18; (I) E (J) VERSO E REVERSO, RESPECTIVAMENTE, DO ISOLADO N° 15; (K) E (L) VERSO E REVERSO, RESPECTIVAMENTE, DO ISOLADO N° 54; (M) E (N) VERSO E	

REVERSO, RESPECTIVAMENTE, DO ISOLADO N° 36; (O) E (P) VERSO E REVERSO, RESPECTIVAMENTE, DO ISOLADO N° 45.....	71
FIGURA 10 – MICROCONÍDIOS (A) E MACROCONÍDIOS (B) DE <i>F. VERTICILLIOIDES</i>	72
FIGURA 11 (a) E (b) – PERFIS DE AMPLIFICAÇÃO DE 60 ISOLADOS DE <i>F. VERTICILLIOIDES</i> OBTIDOS COM OS <i>PRIMERS</i> VERT-1 E VERT-2. PISTA M: MARCADOR DE PESO MOLECULAR 1KB PLUS; PISTAS 1-17: ISOLADOS DE <i>F. VERTICILLIOIDES</i> DA ZONA DA MATA, GOIANA (ITAPIREMA); PISTA 18: ISOLADO DE <i>F. VERTICILLIOIDES</i> DO SÃO FRANCISCO, PETROLINA (PEDRINHAS- CATINGUEIRO); PISTAS 19-30: ISOLADOS DE <i>F. VERTICILLIOIDES</i> DO SERTÃO, ARARIPINA XB 8030; PISTAS 31-39: ISOLADOS DE <i>F. VERTICILLIOIDES</i> DO SERTÃO, ARARIPINA BRF 5036-1; PISTAS 40-45: ISOLADOS DE <i>F. VERTICILLIOIDES</i> DO SERTÃO, ARARIPINA BRF 50361 CMS 36; PISTAS 46-52: ISOLADOS DE <i>F. VERTICILLIOIDES</i> DO SERTÃO, ARARIPINA BRF 5036; PISTAS 53-60: ISOLADOS DE <i>F. VERTICILLIOIDES</i> DO SÃO FRANCISCO, BELÉM DE SÃO FRANCISCO; PISTA 61: <i>PENICILLIUM GLABRUM</i>	73
FIGURA 12 (a) E (b) – AMPLIFICAÇÃO DO GENE FUM1 EM 60 ISOLADOS DE <i>F. VERTICILLIOIDES</i> OBTIDA COM OS <i>PRIMERS</i> VERTF-1 E VERTF-2. PISTA M: MARCADOR DE PESO MOLECULAR 1KB PLUS; PISTAS 1-17: ISOLADOS DE <i>F. VERTICILLIOIDES</i> DA ZONA DA MATA, GOIANA (ITAPIREMA); PISTA 18: ISOLADO DE <i>F. VERTICILLIOIDES</i> DO SÃO FRANCISCO, PETROLINA (PEDRINHAS- CATINGUEIRO); PISTAS 19-30: ISOLADOS DE <i>F. VERTICILLIOIDES</i> DO SERTÃO, ARARIPINA XB 8030; PISTAS 31-39: ISOLADOS DE <i>F. VERTICILLIOIDES</i> DO SERTÃO, ARARIPINA BRF 5036-1; PISTAS 40-45: ISOLADOS DE <i>F. VERTICILLIOIDES</i> DO SERTÃO, ARARIPINA BRF 50361 CMS 36; PISTAS 46-52: ISOLADOS DE <i>F. VERTICILLIOIDES</i> DO SERTÃO, ARARIPINA BRF 5036; PISTAS 53-60: ISOLADOS DE <i>F. VERTICILLIOIDES</i> DO SÃO FRANCISCO, BELÉM DE SÃO FRANCISCO; PISTA 61: <i>PENICILLIUM GLABRUM</i>	76
FIGURA 13 (A) E (B) – PERFIS DE AMPLIFICAÇÃO DE ISSR OBTIDOS COM O <i>PRIMER</i> (GTG) ₅ . PISTA M: MARCADOR DE PESO MOLECULAR 1KB PLUS; PISTAS 1-17: ISOLADOS DE <i>F. VERTICILLIOIDES</i> DA ZONA DA MATA, GOIANA (ITAPIREMA); PISTA 18: ISOLADO DE <i>F. VERTICILLIOIDES</i> DO SÃO	

FRANCISCO, PETROLINA (PEDRINHAS- CATINGUEIRO); PISTAS 19-30: ISOLADOS DE *F. VERTICILLIOIDES* DO SERTÃO, ARARIPINA XB 8030; PISTAS 31-39: ISOLADOS DE *F. VERTICILLIOIDES* DO SERTÃO, ARARIPINA BRF 5036-1; PISTAS 40-45: ISOLADOS DE *F. VERTICILLIOIDES* DO SERTÃO, ARARIPINA BRF 50361 CMS 36; PISTAS 46-52: ISOLADOS DE *F. VERTICILLIOIDES* DO SERTÃO, ARARIPINA BRF 5036; PISTAS 53-60: ISOLADOS DE *F. VERTICILLIOIDES* DO SÃO FRANCISCO, BELÉM DE SÃO FRANCISCO; PISTA 61: *PENICILLIUM GLABRUM*.79

FIGURA 14 – DENDROGRAMA CONSTRUÍDO PELO MÉTODO DE UPGMA, UTILIZANDO O COEFICIENTE DE JACCARD (J) A PARTIR DOS PERFIS DE AMPLIFICAÇÃO DAS REGIÕES ISSR COM O *PRIMER* (GTG)⁵, OBTIDOS DE 60 ISOLADOS DE *F. VERTICILLIOIDES*. NÚMEROS 1-17: ISOLADOS DE *F. VERTICILLIOIDES* DA ZONA DA MATA, GOIANA (ITAPIREMA); NÚMERO 18: ISOLADO DE *F. VERTICILLIOIDES* DO SÃO FRANCISCO, PETROLINA (PEDRINHAS- CATINGUEIRO); NÚMEROS 19-30: ISOLADOS DE *F. VERTICILLIOIDES* DO SERTÃO, ARARIPINA XB 8030; NÚMEROS 31-39: ISOLADOS DE *F. VERTICILLIOIDES* DO SERTÃO, ARARIPINA BRF 5036-1; NÚMEROS 40-45: ISOLADOS DE *F. VERTICILLIOIDES* DO SERTÃO, ARARIPINA BRF 50361 CMS 36; NÚMEROS 46-52: ISOLADOS DE *F. VERTICILLIOIDES* DO SERTÃO, ARARIPINA BRF 5036; NÚMEROS 53-60: ISOLADOS DE *F. VERTICILLIOIDES* DO SÃO FRANCISCO, BELÉM DE SÃO FRANCISCO; NÚMERO 61: *PENICILLIUM GLABRUM*.80

FIGURA 15 (a) E (b) – PERFIS DE AMPLIFICAÇÃO DE ISSR OBTIDOS COM O *PRIMER* (GACA)⁴. PISTA M: MARCADOR DE PESO MOLECULAR 1KB PLUS; PISTAS 1-17: ISOLADOS DE *F. VERTICILLIOIDES* DA ZONA DA MATA, GOIANA (ITAPIREMA); PISTA 18: ISOLADO DE *F. VERTICILLIOIDES* DO SÃO FRANCISCO, PETROLINA (PEDRINHAS- CATINGUEIRO); PISTAS 19-30: ISOLADOS DE *F. VERTICILLIOIDES* DO SERTÃO, ARARIPINA XB 8030; PISTAS 31-39: ISOLADOS DE *F. VERTICILLIOIDES* DO SERTÃO, ARARIPINA BRF 5036-1; PISTAS 40-45: ISOLADOS DE *F. VERTICILLIOIDES* DO SERTÃO, ARARIPINA BRF 50361 CMS 36; PISTAS 46-52: ISOLADOS DE *F. VERTICILLIOIDES* DO SERTÃO, ARARIPINA BRF 5036; PISTAS 53-60: ISOLADOS DE *F. VERTICILLIOIDES* DO SÃO FRANCISCO, BELÉM DE SÃO FRANCISCO; PISTA 61: *PENICILLIUM GLABRUM*.81

FIGURA 16 – DENDROGRAMA CONSTRUÍDO PELO MÉTODO DE UPGMA, UTILIZANDO O COEFICIENTE DE JACCARD (J) A PARTIR DOS PERFIS DE AMPLIFICAÇÃO DAS REGIÕES ISSR COM O *PRIMER* (GACA)₄, OBTIDOS DE 60 ISOLADOS DE *F. VERTICILLIOIDES*. NÚMEROS 1-17: ISOLADOS DE *F. VERTICILLIOIDES* DA ZONA DA MATA, GOIANA (ITAPIREMA); NÚMERO 18: ISOLADO DE *F. VERTICILLIOIDES* DO SÃO FRANCISCO, PETROLINA (PEDRINHAS- CATINGUEIRO); NÚMEROS 19-30: ISOLADOS DE *F. VERTICILLIOIDES* DO SERTÃO, ARARIPINA XB 8030; NÚMEROS 31-39: ISOLADOS DE *F. VERTICILLIOIDES* DO SERTÃO, ARARIPINA BRF 5036-1; NÚMEROS 40-45: ISOLADOS DE *F. VERTICILLIOIDES* DO SERTÃO, ARARIPINA BRF 50361 CMS 36; NÚMEROS 46-52: ISOLADOS DE *F. VERTICILLIOIDES* DO SERTÃO, ARARIPINA BRF 5036; NÚMEROS 53-60: ISOLADOS DE *F. VERTICILLIOIDES* DO SÃO FRANCISCO, BELÉM DE SÃO FRANCISCO; NÚMERO 61: *PENICILLIUM GLABRUM*.83

FIGURA 17 – DENDROGRAMA DE SIMILARIDADE ESPECTRAL ENTRE ISOLADOS DE *F. VERTICILLIOIDES* COM BASE NOS PERFIS PROTEÔMICOS POR MALDI TOF-MS. AS DISTÂNCIAS SÃO MEDIDAS EM PORCENTAGEM DE SIMILARIDADE ESPECTRAL. *ISOLADO IDENTIFICADO COMO *ACHROMOBACTER SP.*.....87

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – ÁREA DE COLETA DE ESPIGAS DE MILHO NO ESTADO DE PERNAMBUCO	62
TABELA 2 – CARACTERÍSTICAS CLIMÁTICAS DA ÁREA DE COLETA NAS MESOREGIÕES DE SÃO FRANCISCO, SERTÃO E ZONA DA MATA, PERNAMBUCO, DURANTE OS MESES DE JULHO E AGOSTO DE 2010	63
TABELA 3 – <i>FUSARIUM VERTICILLIOIDES</i> ISOLADOS DE GRÃOS DE MILHO PROCEDENTES DE DIFERENTES LOCALIDADES DO ESTADO DE PERNAMBUCO	70
TABELA 4 – ISOLADOS DO GÊNERO <i>FUSARIUM</i> IDENTIFICADOS PELA TÉCNICA DE MALDI-TOF ICMS.....	88

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	19
2.1	CARACTERÍSTICAS GERAIS E SISTEMÁTICA DO GÊNERO <i>FUSARIUM</i>	19
2.2	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DO GÊNERO <i>FUSARIUM</i>	21
2.3	CARACTERÍSTICAS GERAIS DE <i>FUSARIUM VERTICILLIOIDES</i>	24
2.4	<i>FUSARIUM VERTICILLIOIDES</i> COMO PATÓGENO DO MILHO	26
2.5	FUMONISINAS	29
2.5.1	CARACTERÍSTICAS GERAIS E ESTRUTURA QUÍMICA	29
2.5.2	BIOSSÍNTESE	32
2.5.3	MECANISMO DE AÇÃO	34
2.5.4	ANÁLISE DE FUMONISINAS EM ALIMENTOS.....	37
2.5.5	INCIDÊNCIA DE <i>FUSARIUM</i> SPP. E FUMONISINAS EM GRÃOS.....	41
2.5.6	MICOTOXICOSES CAUSADAS POR FUMONISINAS.....	44
2.6	PRINCIPAIS FATORES QUE DETERMINAM O DESENVOLVIMENTO FÚNGICO E A PRODUÇÃO DE MICOTOXINAS.....	47
2.7	MARCADORES MOLECULARES PARA IDENTIFICAÇÃO.....	51
2.7.1	MARCADORES MOLECULARES GENE-ESPECÍFICOS.....	54
2.7.2	MARCADOR MOLECULAR ISSR (INTRON SITE SPLICE <i>PRIMER</i>).....	55
2.8	MALDI-TOF MS.....	57
3	METODOLOGIA.....	62
3.1	LOCAIS DE TRABALHO	62
3.2	ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE <i>FUSARIUM VERTICILLIOIDES</i> EM GRÃOS DE MILHO.....	62
3.2.1	OBTENÇÃO DOS ISOLADOS DE <i>FUSARIUM</i> SPP.....	62
3.2.2	ISOLAMENTO DE <i>FUSARIUM VERTICILLIOIDES</i>	64
3.3	OBTENÇÃO DO MICÉLIO PARA EXTRAÇÃO DO DNA.....	64
3.4	EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO	64
3.5	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE <i>FUSARIUM VERTICILLIOIDES</i>	65
3.6	DETECÇÃO DA PRESENÇA DO GENE <i>FUM1</i> EM ISOLADOS DE <i>F. VERTICILLIOIDES</i>	66

3.7 ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA DOS ISOLADOS DE <i>F. VERTICILLIOIDES</i>	66
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA NTSYS-PC.....	67
3.9 ANÁLISE POR MALDI-TOF ICMS.....	67
3.10 DETECÇÃO DE FUMONISINAS B1 E B2 POR MALDI-TOF MS.....	68
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	70
4.1 OBTENÇÃO DE ISOLADOS DE <i>FUSARIUM VERTICILLIOIDES</i>	70
4.2 IDENTIFICAÇÃO DE <i>FUSARIUM VERTICILLIOIDES</i>	73
4.3 DETECÇÃO DA PRESENÇA DO GENE <i>FUM1</i> EM ISOLADOS DE <i>F. VERTICILLIOIDES</i>	76
4.4 ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA DOS ISOLADOS DE <i>F. VERTICILLIOIDES</i>	79
4.5 ANÁLISE POR MALDI-TOF ICMS.....	86
4.6 DETECÇÃO DE FUMONISINAS B1 E B2 POR MALDI-TOF MS.....	92
5 CONCLUSÕES.....	94
REFERÊNCIAS	95
APÊNDICE	114

1 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é o cereal mais cultivado mundialmente, produzido em 77 países, principalmente devido à sua facilidade de adaptação, que permite o cultivo em regiões de clima tropical a temperado, desde o nível do mar até aproximadamente 3660m de altitude. O Brasil participa com 7% da produção mundial, sendo o terceiro maior produtor deste cereal, ficando atrás dos Estados Unidos, maior produtor, e da China. A importância econômica do milho se caracteriza pelas diversas formas de utilização. Embora a maior parte do milho destine-se a fabricação de ração animal, a alimentação humana com derivados de milho, constitui um importante uso deste cereal entre a população de baixa renda. No Nordeste do Brasil, é uma fonte alimentar importante para muitas pessoas que vivem no semi-árido (Embrapa, 2010; Ottoni, 2008).

Entre os motivos das perdas de safras ou da baixa produtividade do milho em diversos países está a produção de toxinas por fungos contaminantes, sendo estas micotoxinas tóxicas para os animais e humanos mesmo quando em baixas concentrações. As micotoxinas são produtos naturais de baixo peso molecular, produzidas como metabólitos secundários fúngicos. Estes metabólitos constituem um conjunto com toxicidade e química heterogêneas, alguns vitais para o fungo produtor. Existem dois fatores muito importantes no processo de produção das micotoxinas: a disponibilidade de água (apresentada na forma de atividade da água, *a_w*) para o crescimento dos fungos produtores e a temperatura (Lima *et al.*, 1998; Council for Agricultural Science and Technology, 2003).

Entre as linhagens produtoras, o gênero *Fusarium* é responsável pela maioria das contaminações dos alimentos por micotoxinas, sendo as espécies de maior importância as que produzem estes compostos tóxicos em cereais utilizados na dieta humana, como milho, arroz, entre outros, que, uma vez contaminados, são prejudiciais aos homens e animais que os ingerem (Council for Agricultural Science and Technology, 2003).

Fusarium verticillioides Sacc. Nirenberg (= *Fusarium moniliforme* Sheldon) é um parasita não obrigatório, toxigênico, de ocorrência comum em culturas de milho, causando podridão da raiz, colmo, espiga e deterioração de grãos armazenados, comumente associados ou colonizando a planta de maneira assintomática, encontrado tanto no solo de regiões tropicais e subtropicais como em solos de zonas

temperadas úmidas e sub-úmidas. Produz várias micotoxinas, sendo considerado uma das mais importantes fontes mundiais de contaminação por fumonisina nos produtos alimentícios, em especial do milho. A fumonisina apresenta 28 análogos divididos em quatro grupos, identificados como séries A, B, C e P. A série B (FB₁, FB₂, FB₃) compreende as fumonisinas mais relevantes produzidas por *F. verticillioides* que ocorrem como contaminantes naturais em milho. Além desta espécie, as espécies *F. proliferatum* (Matsush.) Nirenberg e *F. nygamai* L.W. Burgess e Trimboli também produzem fumonisina (Figueira, 2003; Meirelles, 2005; Bernd, 2006; Ottoni, 2008).

Estudos genéticos sugerem que 3 *loci* estão relacionados com a síntese de fumonisina em *F. verticillioides*, denominados de *FUM1*, responsável pelo controle da capacidade produtiva da toxina, bem como *FUM2* e *FUM3*, que controlariam a hidroxilação dos C-10 e C-05, respectivamente (Figueira, 2003). Deste modo, apesar de ser o maior produtor de fumonisina, nem todos os isolados de *F. verticillioides* apresentam o gene *FUM1*, não sendo estes, potenciais produtores desta micotoxina.

Os métodos fenotípicos algumas vezes não permitem a correta identificação das espécies do gênero *Fusarium*, em virtude da sua grande variabilidade genética. Pelas limitações em desenvolver estudos morfológicos para o gênero, uma vez que algumas espécies dos gêneros *Cylindrocarpon* Wollenw (1913) e *Acremonium* Fr. também produzem conídios multicelulares fusiformes semelhantes aos produzidos por espécies de *Fusarium*, os métodos moleculares e espectrais podem auxiliar no esclarecimento da taxonomia, evitando classificações artificiais sem consistência com a filogenia do gênero (Godoy, 2004; Martins, 2005).

Métodos moleculares, utilizados para a identificação das diferentes espécies de *Fusarium* toxigênicos bem como de outras espécies produtoras de micotoxinas, apresentam boa especificidade, podendo haver um estudo mais determinante quando aliados a técnicas espectrais modernas, como o *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry* (MALDI-TOF MS). Esta última apresenta-se como uma técnica barata, rápida e eficiente para a identificação de fungos, podendo auxiliar na diferenciação entre os táxons (Santos *et al.*, 2009).

Este estudo propõe a identificação taxonômica, molecular e espectral de isolados de *F. verticillioides* obtidos de grãos de milho do Estado de Pernambuco e a detecção da presença de fumonisinas B₁ e B₂ pelo uso da técnica de MALDI-TOF MS.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS E SISTEMÁTICA DO GÊNERO *FUSARIUM*

O gênero *Fusarium* Link (1809) ex Fries compreende espécies de fungos filamentosos de distribuição universal, com grande importância econômica, que comumente podem ser encontradas como fitopatógenas (causando murcha vascular e podridão basal em raízes), sapróbios do solo, associadas à matéria orgânica em decomposição e insetos, patógenos animais, sendo uma minoria patogênica para o homem (Gómez e Ramírez, 2008; Chang, 2010).

As espécies pertencentes ao gênero são classificadas como fungos do campo, por serem capazes de crescer em estágios pré-colheita e interagirem com espécies de plantas diferentes, sendo os grãos e fragmentos em decomposição substratos para sua sobrevivência, possibilitando assim, a infecção de culturas subsequentes e a produção de toxinas (Meireles, 2005).

A posição sistemática deste gênero é definida, segundo De Hoog *et al.* (2000), como pertencente ao Reino Eumycota, Divisão Ascomycota, Classe Euascomycetes, Ordem Hypocreales, Família Hypocreaceae, Gênero *Fusarium*.

Algumas espécies do gênero *Fusarium* apresentam apenas uma fase assexual, denominada fase anamorfa ou imperfeita, enquanto outras, além da fase assexual, também apresentam um estado teleomórfico, denominado fase sexual ou perfeita (Garcia, 2010).

A forma perfeita (teleomorfo) das espécies de *Fusarium* pertence aos gêneros *Nectria* (Fr.) Fr. (1849), *Calonectria* De Not. (1867), *Micronectriella* Hohn e *Gibberella* Sacc., sendo este último o que agrupa a maioria dos teleomorfos de *Fusarium*, e se caracteriza por apresentar ascospores produzidos em ascos contidos em ascocarpos do tipo peritécio (Gómez e Ramírez, 2008; Garcia, 2010).

A maioria das espécies deste gênero são ativos decompositores da celulose em substratos de plantas, e algumas espécies são fitopatogênicas e produtoras de micotoxinas em tecidos de plantas infectadas, sendo as mais importantes os tricotecenos, fumonisinas, zearalenona, moniliformina e ácido fusárico. Ocasionalmente causam danos em sementes de cereais, e outros produtos vegetais, antes e depois da colheita, em virtude da diminuição da qualidade e quantidade de grãos produzidos. São também perigosas à saúde humana e de outros animais pela produção das

micotoxinas, sendo que o acúmulo destas toxinas nos grãos e nos seus derivados ocasiona enfermidades severas agudas e crônicas (Brasileiro, 2003; Mulé *et al.*, 2004; Garcia, 2010).

Várias espécies de *Fusarium* são isoladas com grande frequência em sementes de cereais e pastagens, ocasionando grandes perdas econômicas incluem: *F. sambucinum* Fuckel (= *Gibberella pulicaris* Fr. Sacc. 1877), responsável por infecções em culturas de trigo e batata; *F. oxysporum* Schlecht, causador de murcha em diversas espécies vegetais de importância econômica, como algodoeiro, tomateiro e mamoeiro; *F. verticillioides*, um importante patógeno de culturas de milho e outros cereais; *F. graminearum* Schwabe e *F. solani* (Mart.) Sacc., são altamente patogênicas em hospedeiros como leguminosas, tomate, banana e tabaco (Tan e Niessen, 2003; Chang, 2010).

O principal interesse nas espécies do gênero se deve ao fato de estarem entre os fitopatógenos mais importantes do mundo, porém, cada vez mais espécies deste gênero têm sido descritas como causa de infecções localizadas em indivíduos imunocompetentes ou oportunistas em humanos, sendo responsáveis por enfermidades disseminadas em pacientes imunossuprimidos, como os submetidos a transplantes, terapias por corticóides, pacientes soro positivos ao vírus da imunodeficiência humana (HIV), leucêmicos, pacientes queimados ou com feridas abertas, aumentando os índices de morbidade e mortalidade entre estes indivíduos. As ferramentas diagnósticas são limitadas, atrasando o tratamento destas infecções, além disto, estes patógenos demonstram uma acentuada resistência à terapia antifúngica (Booth, 1971; Nucci e Anaissie, 2002; Chang, 2010; García, 2010).

Montiel (2004) denomina hialo-hifomicoses as micoses causadas por este patógeno, em virtude do agente etiológico ser identificado nos tecidos pela presença de hifas septadas não pigmentadas. Em indivíduos imunocompetentes, a infecção normalmente ocorre posteriormente à exposição traumática com um vegetal em decomposição, após queimadura ou cirurgia. A maioria dos casos de fusariose invasiva é produzida por *F. solani*, *F. oxysporum* e *F. verticillioides*, sendo que, em um terço dos casos, as espécies não são identificadas e os sintomas clínicos são indistinguíveis dos de uma aspergilose invasiva, também comum em pacientes com imunocomprometimento severo. *F. proliferatum* (Matsuhima) Nirenberg, *F. subglutinans* (Wollenweber e Reinking) Nelson, Toussoun e Marasas e *F. sacchari*

(E. J. Butler) W. Gams são listadas com menor frequência. (Torres, 2003; Chang, 2010).

As infecções sistêmicas decorrem da disseminação do micro-organismo desde a porta de entrada, normalmente determinada pela condição imunológica do hospedeiro, além de outros fatores de virulência, como a produção de enzimas e toxinas, resultando em um alto índice de mortalidade em virtude do tratamento terapêutico frequentemente não apresentar sucesso (Torres, 2003; Montiel, 2004; Gómez e Ramírez, 2008; Chang, 2010).

Além de espécies patogênicas facultativas de plantas, animais e humanos, isolados não patogênicos e endofíticos têm sido descritos. Pamphile e Azevedo (2002) caracterizaram molecularmente, através do uso de marcadores RAPD, isolados endofíticos de *F. verticillioides* em milho, visando verificar se havia relação entre proximidade genética de isolados endofíticos e o local de isolamento e/ou a população de milho hospedeira. Segundo os autores, foi possível separar isolados endofíticos de *F. verticillioides* de diferentes genótipos por meio destes marcadores, mostrando que pode existir uma grande associação entre estes, sugerindo uma especificidade para o genótipo da planta hospedeira (Chang, 2010).

2.2 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DO GÊNERO *FUSARIUM*

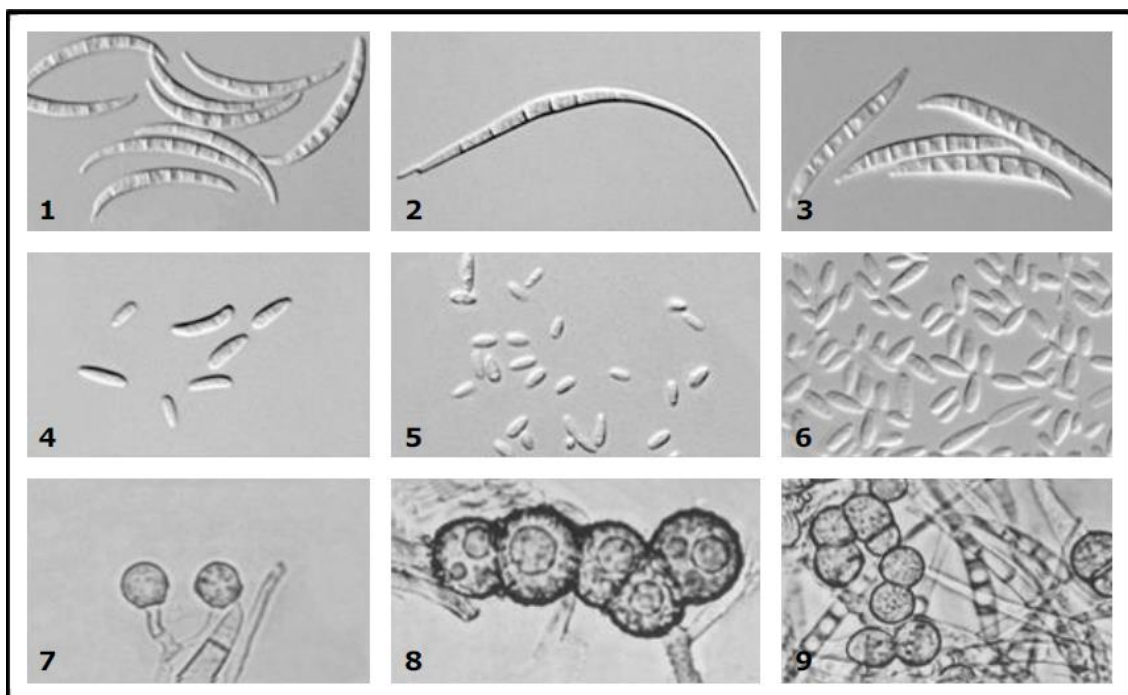
As colônias do gênero *Fusarium* caracterizam-se por crescimento rápido, e após 7 a 10 dias de cultivo, apresentam diversas cores, do violeta à púrpura escuro ou do creme à laranja, podendo o reverso apresentar-se nas cores pardo ou preto. O micélio pode apresentar-se aveludado ou levemente cotonoso (Leslie e Summerell, 2006).

São caracterizados microscopicamente pela formação de macroconídios em forma de foice, com extremidades afiladas, podendo apresentar 1 ou até 10 septos transversais. Algumas espécies apresentam macroconídios com uma estrutura pronunciada designada como célula pé. Estes emergem de células conidiogênicas (fiálides), que podem apresentar-se isoladamente ou agrupadas em massas, crescendo diretamente do micélio vegetativo, sendo conhecidas como esporodóquios. Os microconídios são pequenos, unicelulares, podendo apresentar diversas formas e eventualmente um septo. Uma característica importante é que

possuem a base truncada. Recentemente, o termo mesoconídio tem sido referido para os blastoconídios. Estes são semelhantes, em forma, aos macroconídios, mas de tamanho menor, não possuindo célula basal em forma de pé, apresenta-se de forma solitária e não formam cabeças mucóides, sendo a base do mesoconídio truncada. Geralmente, podemos observar em algumas espécies a produção de clamidosporos isolados ou agrupados em cadeias, de paredes espessas (lisas ou rugosas) e de localização apical ou intercalar (Pfenning, 2002; Godoy, 2004; Gómez e Ramírez, 2008).

Os métodos fenotípicos algumas vezes não permitem a correta identificação das espécies deste gênero, devido a sua variação morfológica decorrente da variabilidade genética. Pelas limitações em desenvolver estudos morfológicos do gênero, uma vez que algumas espécies dos gêneros *Cylindrocarpon* e *Acremonium* também produzem conídios multicelulares fusiformes semelhantes aos produzidos por espécies de *Fusarium*, os métodos moleculares podem auxiliar no esclarecimento da taxonomia evitando classificações artificiais sem consistência com a filogenia do gênero, contribuindo para discriminação das espécies associadas aos alimentos contaminados. Ainda neste aspecto, variações de características morfológicas e patogênicas dentro do gênero *Fusarium* resultam em uma classificação dividida em seções, *formae speciales* e raças (Godoy, 2004; Martins, 2005; Chang, 2010).

Apesar das limitações, as chaves de classificação para o gênero *Fusarium* mais utilizadas atualmente são as de Booth (1971) e De Hoog *et al.* (2000). As características morfológicas microscópicas estão representadas na Figura 1.



Fonte: García, 2010.

Figura 1: Características morfológicas microscópicas do gênero *Fusarium*. Macroconídios de *F. acuminatum* (1), *F. equiseti* (2) e *F. graminearum* (3). Microconídios de *F. fujikuroi* (4), *F. proliferatum* (5) e *F. verticillioides* (6). Clamidosporos de *F. oxysporum* (7), *F. equiseti* (8) e *F. solani* (9).

Atualmente estão descritas aproximadamente 150 espécies de *Fusarium* morfológicas e/ou filogeneticamente diferentes (García, 2010).

A abordagem polifásica para identificação de micro-organismos vem crescendo muito atualmente, e integra caracteres fenotípicos juntamente com sequências de DNA. Em fungos filamentosos, micro e macromorfologia, fisiologia, metabólitos produzidos e dados moleculares são importantes no processo de identificação, e nenhum deve ser subestimado, uma vez que, juntos, permitem a correta identificação de espécies do gênero *Fusarium*, como *F. verticillioides*, cuja taxonomia torna-se difícil em virtude da sua grande variabilidade genética (Godoy, 2004; Silva, 2012).

2.3 CARACTERÍSTICAS GERAIS DE *FUSARIUM VERTICILLIOIDES*

Fusarium verticillioides Sacc. Nirenberg (= *Fusarium moniliforme* Sheldon) é um parasita não obrigatório de ocorrência comum em culturas de milho, causando podridão da raiz, colmo, espiga e deterioração de grãos armazenados, comumente associados ou colonizando a planta de maneira assintomática, encontrado tanto no solo de regiões tropicais e subtropicais como em solos de zonas temperadas úmidas e subúmidas. Apesar de ser considerado o principal patógeno associado a culturas de milho em todo o mundo, e principalmente no Brasil, pode também ser encontrado como patógeno em culturas de trigo, sorgo, aveia, cana de açúcar, arroz, banana, figo, manga, abacaxi e aspargo (Figueira, 2003; Meirelles, 2005; Bernd, 2006; Chang, 2010; Melo, 2011).

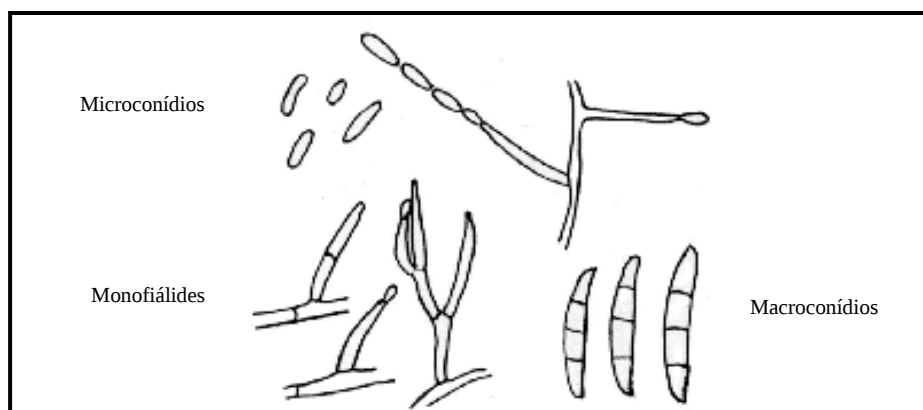
Fusarium verticillioides representa o estágio anamorfo da espécie *Gibberella moniliformis* (Wineland). Pertence ao complexo *Gibberella fujikuroi* (Sawada) Wollenw, antiga seção *Liseola*, composto por um grupo de aproximadamente 20 espécies, que é subdividida em pelo menos oito populações biológicas (“mating populations”) geneticamente distintas, determinadas pelas letras A a H. As “mating populations” A, a qual pertence *F. verticillioides*, e D produzem elevado nível de micotoxinas, enquanto as demais produzem pouca ou nenhuma (Schiabel, 2004; Meirelles, 2005; Leslie e Summerell, 2006; Melo, 2011).

As fumonisinas são claramente as toxinas mais importantes produzidas por *F. verticillioides*, e alguns isolados podem produzi-las em níveis muito altos. Alimentos contaminados por *F. verticillioides* são tóxicos a animais e humanos, e algumas, mas não todas, destas reações tóxicas são atribuídas à contaminação dos alimentos pela fumonisina. Além desta micotoxina, esta espécie também pode produzir outras toxinas, como ácido fusárico e derivados, traços de bovericina e moniliformina, fusarina C e 8-bostricoidina, que pode ser confundida com zearalenona (Leslie e Summerell, 2006).

Inicialmente, Wollenweber e Reinking (1935) estabeleceram a seção *Liseola* para as espécies de *Fusarium* que produziam microconídios em cadeia, macroconídios, mas não produziam clamidósporos. Uma espécie de *Fusarium* formadora de cadeia, descrita como *Fusarium moniliforme* Sheldon, foi incluída na seção junto com duas outras espécies e três variedades, isto é, seis taxa, posteriormente, reduzida a uma espécie, *F. moniliforme* Sheldon emend. Snyder e

Hansen by Snyder e Hansen. Booth (1971) iniciou a reavaliação das espécies na seção *Liseola*, que ainda está em andamento, separando a variedade *F. moniliforme* var. *subglutinans* de *F. moniliforme*, devido à ausência de microconídios em cadeia e presença de células conidiogênicas polifialídicas. Dentre as modificações sugeridas por Gerlach e Nirenberg (1982), estes apontaram o nome correto para *F. moniliforme* como *F. verticillioides* Sacc. Nirenberg, sendo o seu teleomorfo *Gibberella moniliformis* (Wineland) ou *Gibberella fujikuroi* mating population A, estreitando o conceito desta espécie. Como resultado, a identificação de muitos isolados originalmente descritos como *F. moniliforme* é agora posta em questão como sendo *F. verticillioides* ou até mesmo outras espécies (Leslie e Summerell, 2006).

Microscopicamente (Figura 2), apresenta numerosos microconídios ovóides com base truncada, podendo ter 1 ou 2 septos. A presença abundante de microconídios, normalmente formando cadeias, proporciona o aspecto pulverulento da colônia, de coloração violeta quando em meio batata-dextrose-ágar (BDA). Os conidióforos originam-se na hifa, e são escassamente ramificados. Quando presentes, os macroconídios são fusiformes, quase retos, com superfícies dorsal e ventral quase retas, e de paredes finas e delicadas. As células basal e apical são alargadas e ligeiramente curvadas, podendo ter de 3 a 5 septos. *F. verticillioides* não produz clamidósporos, mas células intumescidas que podem ser confundidas com clamidósporos ou pseudoclamidosporos (Booth, 1971).



Fonte: www.seimic.org

Figura 2: Características morfológicas microscópicas de *Fusarium verticillioides*.

F. verticillioides é morfologicamente idêntico a isolados de *F. thapsinum* Klittich, Leslie, Nelson e Marasas que não produzem pigmento amarelo quando crescido em meio de cultura. Também é semelhante à *F. proliferatum*, mas a última espécie distingue-se pela sua capacidade de formar cadeias de microconídios em polifiálides. As cadeias de microconídios produzidas por *F. proliferatum* geralmente são mais curtas que as de *F. verticillioides* e *F. thapsinum*. Estas duas últimas espécies podem ser confiavelmente diferenciadas por meio de testes de cruzamento, marcadores moleculares ou pela presença de pigmentos amarelos em meio de cultura, exclusivos de *F. thapsinum*. *F. verticillioides* também é muito semelhante à *F. andiyazi* Marasas, Rheeder, Lamprecht, Zeller e Leslie e *F. nygamai* Burgess e Trimboli, diferenciando-se da primeira por ausência de pseudoclamidosporo e da segunda por abundantes macroconídios em esporodóquios e clamidósporos em hifas aéreas de culturas antigas (Leslie e Summerell, 2006).

2.4 FUSARIUM VERTICILLIOIDES COMO PATÓGENO DO MILHO

A importância econômica do milho se caracteriza pelas diversas formas de utilização. Anualmente no Brasil são produzidas cerca de 50 milhões de toneladas de grãos, das quais 60% destinam-se à fabricação de ração animal, 20% para consumo humano direto e 8% destinam-se à indústria, a qual origina diversos subprodutos como óleos, margarinas, xaropes dentre outros (Ottoni, 2008; Chang 2010).

Embora a maior parte do milho destine-se a fabricação de ração animal, a alimentação humana, com derivados de milho, constitui um fator importante de uso deste cereal entre a população de baixa renda. No Nordeste do Brasil, é reconhecido como cultura agrícola relevante devido ao fácil cultivo, requisição de poucos recursos tecnológicos e por ser uma boa fonte alimentícia para população e para os animais. Somado a estes fatores, a cultura do milho assume um importante papel socioeconômico, como geradora de emprego e renda para o pequeno produtor (Souza, 2007; Chang, 2010).

A produção de milho pode ser afetada pela utilização de cultivares pouco produtivos ou suscetíveis a doenças e pragas, por condições desfavoráveis de clima e solo, qualidade fisiológica e sanitária das sementes, visto que elas são importantes

agentes de propagação e disseminação de patógenos. As doenças que afetam o milho podem ser causadas por vírus, nematóides, bactérias e fungos (Ottoni, 2008).

Infecções por fungos podem ocorrer sob duas condições: pré-colheita, a partir de infecções na espiga, e pós-colheita, durante o beneficiamento, armazenamento e transporte. As características nutricionais do milho são atrativas ao ataque destes micro-organismos, que ao se desenvolverem deterioram os grãos ocasionando perdas nutricionais (Ottoni, 2008; Freitas *et al.*, 2009).

A utilização do milho como fonte de alimentação humana torna importante a adoção de práticas, instituídas e acompanhadas até a colheita, que garantam a qualidade dos grãos, visando minimizar o ataque de fitopatógenos que futuramente possam se manifestar no campo e que também possam ocasionar uma maior deterioração durante o armazenamento. Como uma das espécies mais comumente relatadas infectando culturas de milho, *F. verticillioides* pode causar doenças em todos os estágios de desenvolvimento da planta, infectando raízes, caule e grãos. A podridão dos grãos ou da espiga causada por esta espécie é uma doença comum no milho, e caracteriza-se por uma alteração na cor dos grãos, que varia de rosa a marrom-avermelhado. Um típico crescimento cotonoso, constituído de micélio e esporos do fungo, pode ser observado em estágios avançados de infecção. Grãos assintomáticos podem transportar estes patógenos, resultando na podridão das sementes ou morte das plântulas, em caso de serem utilizados para plantio, e quando as condições forem de umidade relativa alta e temperaturas baixas, que favorecem o desenvolvimento do patógeno (Souza, 2007).

No Brasil, *F. verticillioides* é considerado o principal patógeno de campo que infecta sementes de milho, requerendo para o seu desenvolvimento temperaturas em torno de 25°C e atividade de água (a_w) = 0,98, sendo esta última maior para produção de fumonisinas. O tempo de sobrevivência desses fungos nas sementes está diretamente relacionado com as condições do ambiente de armazenamento (Butkeraitis, 2003; Meirelles, 2005; Bernd, 2006; Souza, 2007). Possui dois ciclos de vida distintos, que refletem uma relação de complexidade com o milho: o de um importante patógeno, ou o de um endofítico, sendo que cepas do fungo podem ser transmitidas pelas sementes e são capazes de se desenvolver sistemicamente afetando os grãos (Meirelles, 2005; Bacon *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2009).

Em estudo realizado por Lee *et al.* (2009) com isolados endofíticos de *F. verticillioides* inoculados em plântulas de milho antes, simultaneamente e após a

inoculação com *Ustilago maydis*, os efeitos sobre a severidade da doença Ferrugem e o crescimento das plantas foram avaliados. Quando *F. verticillioides* foi simultaneamente inoculado com *U. maydis*, a gravidade da doença da Ferrugem foi significativamente diminuída e o crescimento da planta aumentado, quando comparado a outros tratamentos. Controles mostraram que *F. verticillioides* sozinho não influenciou no crescimento da planta, mas sua ocorrência no milho como endofítico melhorou a resistência do hospedeiro, através da interferência precoce no processo de infecção e limitando o desenvolvimento da doença, resultando em crescimento das plantas.

O ciclo de *F. verticillioides* em milho se inicia com a permanência em resíduos contaminados na pós-colheita. O micélio desenvolvido pode infectar as sementes no solo, que assumem importante papel na propagação de patógenos sendo fonte de inóculo ou contaminando áreas livres de doenças, desencadeando infecção sistêmica para o colmo, seguido de disseminação, atingindo a espiga. No entanto, a disseminação de macro e microconídios consistem na via de contaminação mais efetiva, por possibilitar a entrada de conídios pelos tecidos ou estigmas florais, atingindo diretamente o grão. A formação de macro e microconídios é determinada por fatores ambientais, como temperatura e umidade. A infecção também pode ocorrer através de lesões nas sementes, provocadas por insetos ou pássaros, favorecendo a dispersão dos esporos a longas distâncias, afetando cultivares próximos, ou curtas distâncias, através da ação da água (Schiabel, 2004; Meirelles, 2005; García, 2010).

Após a colheita o fungo sobrevive seguramente no período de entre-safras, colonizando as sementes armazenadas. A estocagem inadequada sob altas temperaturas, umidade relativa do ar e teor de umidade dos grãos, aliados a concentração do inóculo, interações microbianas, danificação mecânica dos grãos e infestação por insetos podem permitir a proliferação de fungos, e a perda por eles ocasionada não se reflete apenas na qualidade e quantidade dos grãos, mas também na produção de micotoxinas. Embora a produção destes compostos tóxicos dependa de condições ideais de substrato, temperatura e umidade (ressaltando que a presença de um fungo em grãos não seja fator determinante para produção de toxinas), o Nordeste Brasileiro oferece condições favoráveis ao desenvolvimento do fungo e produção de seus metabolitos secundários, requerendo atenção quanto a

identificação destes micro-organismos toxigênicos presentes em culturas de milho (Meirelles, 2005; Souza, 2007).

A presença de fungos toxigênicos em milho, com predominância de espécies do gênero *Fusarium*, vem sendo estudada por um número significativo de autores, embora no Nordeste haja poucos estudos (Pozzi, *et al.*, 1995; Orsi, *et al.*, 2000; Fandohan, *et al.*, 2005; Kawashima e Soares, 2006; Dorn, *et al.*, 2011; Boutigny, *et al.*, 2011; Melo, 2011). Sendo o milho um cereal de grande importância econômica no Brasil, em especial na região Nordeste, a armazenagem dos grãos deve ser uma preocupação primordial na tentativa de garantir a qualidade dos grãos armazenados, minimizar os riscos à saúde animal e humana, pela presença de micotoxinas produzidas por fungos como *F. verticillioides*, e reduzir as perdas econômicas (Chang, 2010).

2.5 FUMONISINAS

2.5.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS E ESTRUTURA QUÍMICA

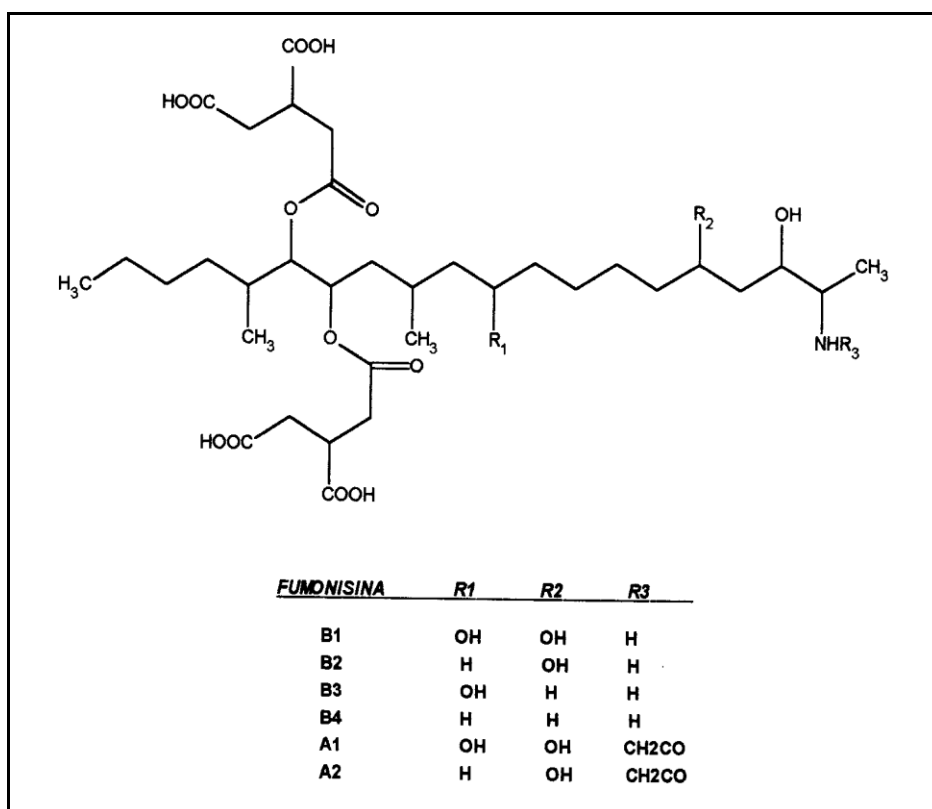
De acordo com Waskiewicz *et al.* (2012), as fumonisinas constituem uma família de micotoxinas alimentares cancerígenas, descobertas pela primeira vez em 1988 a partir de culturas de *F. verticillioides* MCR826, obtido de milho de Transkey, África do Sul, sendo esta espécie a principal produtora da toxina. Hoje em dia, as fumonisinas também são conhecidas por serem produzidas por outras espécies, como *F. napiforme* Marasas, *F. oxysporum*, *F. dlamini* Marasas, *F. nygamai*, *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* Keissl e *F. proliferatum*, sendo esta última de grande destaque como segundo maior produtor de fumonisinas (Thiel *et al.*, 1991; Bezuidenhout *et al.*, 1988; Gelderblom *et al.*, 1988; Seefelder, *et al.*, 2002; Knaflewski, *et al.*, 2008; Ottoni, 2008; Stockmann-Juvala e Savolainen, 2008).

Estes compostos tóxicos podem estar presentes no micélio ou nos esporos dos fungos, e devido ao caráter cancerígeno, teratogênico, mutagênico e imunodepressivo, determinadas micotoxinas têm sido motivo de intoxicações agudas e/ou crônicas em humanos e animais (Bernd, 2006; Ottoni, 2008).

Estas micotoxinas têm sido isoladas a partir de culturas de plantas de interesse agrônomo e/ou produtos à base de milho, embora outras culturas possam ser afetadas (figo, manga, abacaxi e aspargo). Os fatores determinantes

para contaminação incluem localização, clima, suscetibilidade das plantas à invasão por fungos em virtude de danos causados por insetos e estresse das culturas. Apresentam 28 análogos divididos em 4 grupos identificados de séries A, B, C e P. A série B (Figura 3) compreende as micotoxinas mais relevantes em *F. verticillioides* do ponto de vista toxicológico, e que ocorrem como contaminantes naturais em milho (FB₁, FB₂, FB₃), sendo a FB₄ de menor frequência (Figueira, 2003; Brown *et al.*, 2008; Ottoni, 2008; Wild e Gong, 2010).

As fumonisinas da série A, isoladas a partir de *F. verticillioides* e do milho, se diferenciam da série B pela presença de um grupo N-acetil amida em vez de um grupo amina na posição C-2. As fumonisinas da série C, produzidas principalmente por cepas de *F. oxysporum*, são quimicamente similares as da série B, exceto pelo fato do grupo metil no C-1 terminal não estar presente. As toxinas da série P foram encontradas em culturas de *F. proliferatum* crescidas em milho, e contém um 3-hidroxipiridina na posição C-2, ao invés de uma amina como encontrada nas fumonisinas da série B (Waskiewicz *et al.*, 2012).



Fonte: Henningen (1998).

Figura 3: Estrutura química das Fumonisin FB₁-FB₄, A₁ e A₂.

Diferente de outras toxinas, que são solúveis em solventes orgânicos, as fumonisinas são compostos polares, solúveis em água e soluções aquosas de metanol e acetonitrila. Não são solúveis em solventes apolares, de modo que esta característica de hidrossolubilidade talvez tenha dificultado o seu estudo. A fumonisina FB₁, cuja massa molecular é de 722 Da, destaca-se dentre todas por ser encontrada em maiores níveis, e tem como fórmula empírica um diéster de propano 1,2,3-ácido tricarboxílico e 2-amino-12, 16-dimetil-3,5,10,14,15-pentahidroieicosano, em que no C14 e C15 os grupos hidroxilas são esterificados com o grupo carboxiterminal de propano 1,2,3-ácido tricarboxílico. A esta classe também pertencem as fumonisinas FB₂ e FB₃, que se distinguem pela ausência de grupos livres de hidroxilas (Ottoni, 2008; Cruz, 2010; Waskiewicz *et al.*, 2012).

A fumonisina B₁ é a mais prevalente em milho e seus derivados, perfazendo um total de 70-80% de fumonisinas encontradas em culturas de *F. verticillioides* e naturalmente contaminando os alimentos. Entretanto, pequenas quantidades de outras séries, principalmente FB₂ e FB₃, podem ser encontradas junto às amostras que contenham FB₁, porém em quantidades sempre menores e toxicidade mais baixa. FB₁ tem sido detectada em amostras de milho nas mais variadas concentrações em toda parte do mundo, além de também ter sido encontrada em sorgo, arroz, farelo de trigo, farelo de soja e aves utilizadas na alimentação (Stockmann-Juvala e Savolainen, 2008).

As fumonisinas são conhecidas por serem prevalentemente produzidas por espécies de *Fusarium*, entretanto, estudos recentes têm demonstrado que, outras fumonisinas como FB₆, uma nova fumonisina isolada em conjunto com FB₂ de culturas estacionárias de *Aspergillus niger* Tiegh., pode ser produzida em grandes quantidades por algumas estirpes de *A. niger* em meio ágar com baixa atividade de água (Varga *et al.*, 2010; Abrunhosa *et al.*, 2011).

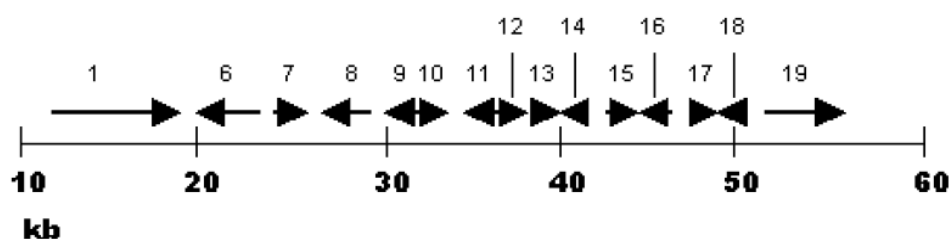
Storari *et al.* (2012) identificaram a micobiota e testaram a habilidade para produção de Ocratoxina A e fumonisina *in vitro* por isolados de *A. niger* e *A. awamori* Nakaz. encontrados em chás de ervas disponíveis no mercado suíço. Fumonisinas foram produzidas por 76% e 37% dos isolados de *A. niger* e de *A. awamori* respectivamente, enquanto OTA não foi produzida por isolados de *A. awamori* e foi detectada em 7% dos isolados de *A. niger*, de modo que 12 das 22 amostras de chás analisados estavam associadas com a contaminação por espécies de *Aspergillus* produtoras de micotoxinas.

Outros autores também vêm confirmando a habilidade para produção de fumonisinas, principalmente FB₂ e FB₄, por *A. niger* em diferentes concentrações e produtos agrícolas, como grãos de café, uvas, frutos secos de videira, tâmaras, figos e produtos derivados de uvas, como vinhos (Noonim *et al.*, 2009; Logrieco *et al.*, 2009; Varga, *et al.*, 2010; Logrieco, *et al.*, 2010). Sendo *A. niger* uma espécie ubíquota, capaz de colonizar uma variedade de produtos agrícolas, e devido ao seu interesse biotecnológico, a descoberta deste novo potencial toxigênico é considerada um risco por alguns autores, visto que certas cepas podem produzir fumonisinas e outras toxinas concomitantemente, como Ocratoxina A e Aflatoxinas, de modo que os alimentos e rações podem conter potencialmente duas toxinas cancerígenas a partir desta espécie (Abrunhosa *et al.*, 2011; Waskiewicz *et al.*, 2012).

A produção de fumonisina B₂ e B₄ foi relatada em outras espécies de fungos biotecnologicamente importantes do gênero *Tolypocladium* W. Gams. Estas micotoxinas foram detectadas em onze isolados testados de três espécies: *Tolypocladium inflatum*, *T. cylindrosporum* e *T. geodes*, sendo comparadas com a produção de fumonisinas por espécies de *Fusarium* e *Aspergillus niger*. Com os resultados confirmando a produção de fumonisinas por espécies do gênero *Tolypocladium*, sugeriu-se que o potencial de contaminação de preparações de ciclosporinas comerciais com fumonisinas deva ser investigado (Mogensen *et al.*, 2011).

2.5.2 BIOSÍNTESE

Os genes envolvidos na biossíntese de metabólitos secundários em fungos filamentosos encontram-se agrupados em “clusters”, sendo o cluster FUM responsável pela síntese de fumonisinas, composto por 15 genes, 42 Kb, localizado no cromossomo 1 (Figura 4). Este cluster inclui genes que codificam enzimas e proteínas similares a policetídeo sintases (*fum1*), citocromo P450 monooxigenases (*fum6*, *fum12* e *fum15*), desidrogenases (*fum7* e *fum13*), amino transferases (*fum8*), dioxigenases (*fum3*), acil-CoA graxo sintetases (*fum10* e *fum16*), transportadores de tricarboxilato (*fum11*), peptídeo sintetases (*fum14*), fatores de longevidade (*fum17* e *fum18*) e transportadores ABC (*fum19*) (Meirelles, 2005).



Fonte: Meirelles (2005).

Figura 4: Esquema do *cluster* FUM de *Fusarium verticillioides*. As setas indicam a localização e a orientação dos genes. Os números 1 e 6-19 indicam os genes *fum1* e *fum6-19*.

Sugere-se atualmente, que o gene *fum5* corresponde ao gene *fum1*, o *fum9* ao gene *fum3* e o *fum12* ao *fum2*. Acredita-se que o gene *fum19* estaria relacionado com o transporte de fumonisinas fora da célula, e outros genes, como *pac1*, *fcc1* e *zfr1*, estariam sendo descritos como relevantes na regulação da síntese de fumonisinas, residindo fora do *cluster* (García, 2010).

O *cluster* de genes necessários para a biossíntese de fumonisina pode estar completo, parcialmente ou completamente suprimido no complexo da espécie *Gibberella fujikuroi*, de modo que, espécies filogeneticamente próximas diferem na sua capacidade de produção de fumonisinas. Assim, estudos demonstram que espécies de *Fusarium*, como *F. verticillioides*, podem apresentar uma deleção parcial do *cluster* de fumonisina, causando variação quanto à produção desta toxina (González-Jaén *et al.*, 2004; Mirete *et al.*, 2004). Espécies próximas filogeneticamente de *F. verticillioides*, como *F. nygamai*, podem possuir os genes do *cluster* e produzirem fumonisinas, e outras espécies, como *F. oxysporum* (Proctor *et al.*, 2008) e *A. niger* (Frisvad *et al.*, 2007; Noonim *et al.*, 2009) podem produzir fumonisinas, sugerindo a existência deste *cluster* de genes em outras espécies deste gênero ou em outros gêneros de ascomicetos (García, 2010).

Estudos genéticos sugerem que 3 *loci* estão relacionados com a síntese de fumonisina em *F. verticillioides*, denominados de *fum1*, responsável pelo controle da capacidade produtiva da toxina além de *fum2* e *fum3*, que controlariam a hidroxilação dos C-10 e C-05, respectivamente (Figueira, 2003). Deste modo, cepas nocauteadas no locus *fum1* não produzem fumonisinas; linhagens nocauteadas no gene *fum2* não apresentam a capacidade de hidroxilar o C-10 da fumonisina, produzindo, portanto, apenas FB₂, mas não FB₁ ou FB₃. Por fim, linhagens

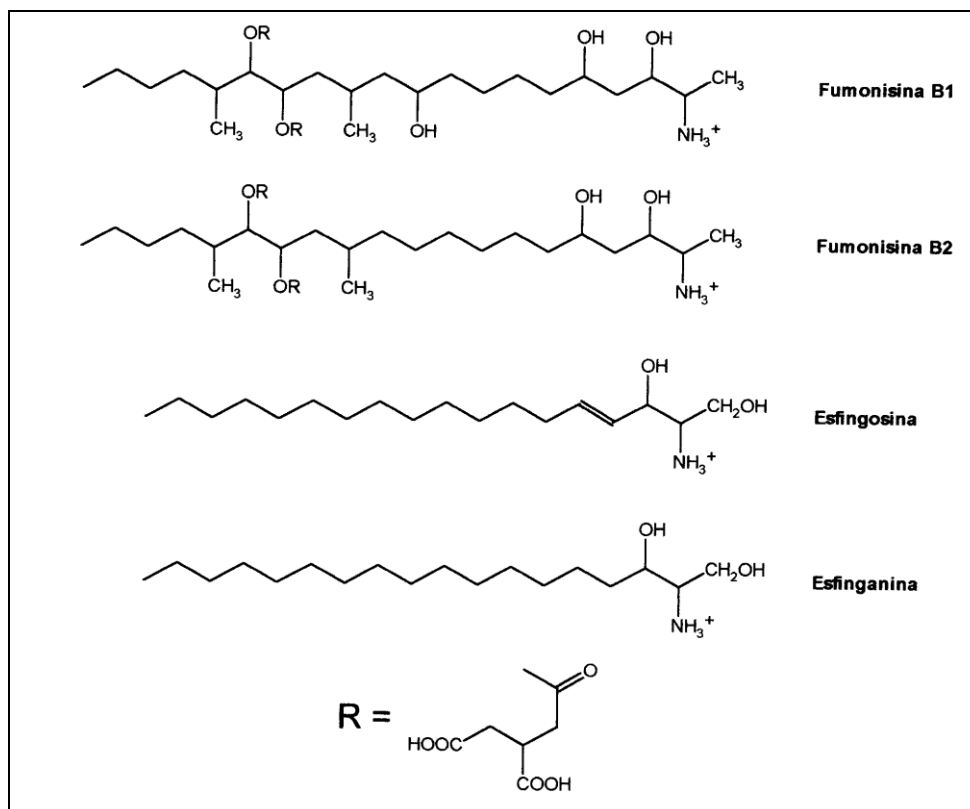
defeituosas no gene *fum3* não possuem capacidade de hidroxilar C-05, e produzem somente FB₃, não produzindo FB₁ ou FB₂ (Proctor *et al.*, 1999).

A síntese de fumonisinas começa com a formação de uma cadeia linear desde o carbono 3-20, a partir de um derivado de acetato, catalisada por uma enzima poliketídeo sintase (PKS), codificada pelo gene *fum1*. As PKSs estão presentes em plantas, bactérias e fungos, produzindo metabólitos secundários como pigmentos, toxinas, fatores de virulência e antibióticos. As fumonisinas FB₁, FB₂ e FB₃ são sintetizadas a partir de um precursor menos hidroxilado, com participação de várias enzimas codificadas por diferentes genes (García, 2010).

Segundo Lang (2005), as fumonisinas exercem toxicidade baseada na estrutura molecular, podendo interagir com enzimas envolvidas no metabolismo e biossíntese de esfingolípídios e interferir em sua atividade funcional. As mesmas afetam os sítios de regulação celular, aparentemente independentes da interrupção do metabolismo de lipídios, resultando na alteração da proliferação celular, comunicação célula-célula, adesão celular, velocidade da apoptose, indução do estresse oxidativo e modulação da expressão gênica.

2.5.3 MECANISMO DE AÇÃO

Devido à semelhança estrutural das fumonisinas aos esqueletos carbônicos de esfingolípídeos, alguns autores sugerem que esta toxina, em especial a FB₁, pode interferir no metabolismo dos mesmos, assim como no equilíbrio do nível de esfingosina devido à similaridade estrutural com a mesma (Figura 5) (Meirelles, 2005).



Fonte: Minami (2004).

Figura 5: Comparação entre as estruturas das fumonisinas B₁, B₂, esfingosina e

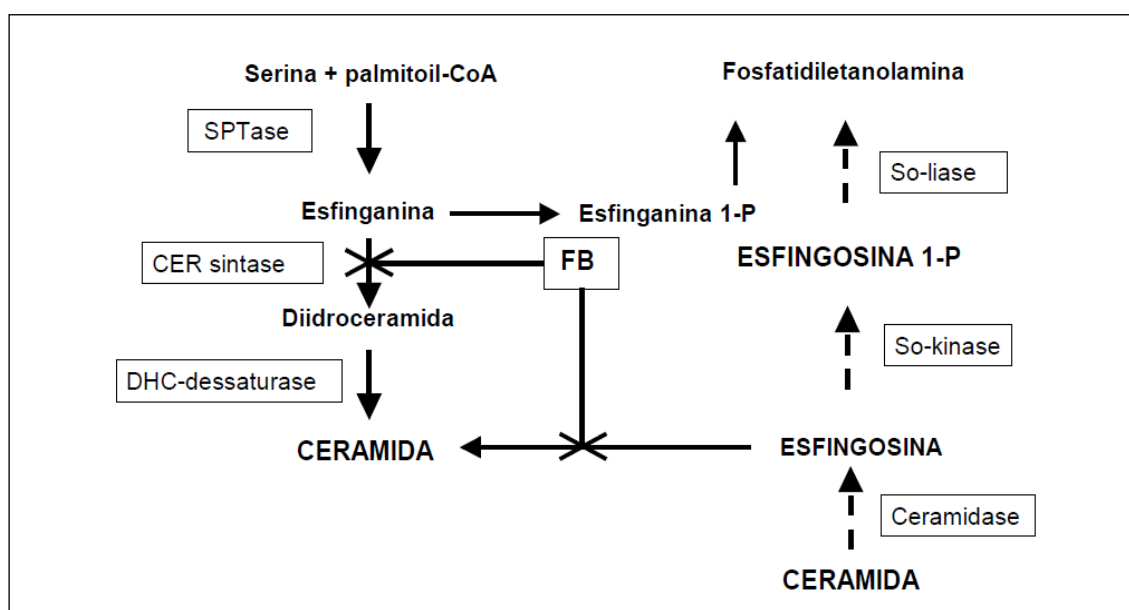
Dentre os mecanismos de ação da FB₁ um deles envolve o rompimento da via de biossíntese de esfingolípídeos, os quais são importantes para integridade da membrana celular e para comunicação celular, por inibição, através da ligação ao sítio catalítico, de uma enzima denominada ceramida sintase (N-acetiltransferase), localizada no retículo endoplasmático (Figura 6). A inibição da biossíntese do complexo de esfingolípídeos interrompe numerosas funções das células e sinalização de vias, incluindo o acúmulo de bases esfingóides (esfinganina e esfingosina) no soro de animais expostos a esta toxina e uma depleção de esfingolípídeos, o que altera a proliferação e a diferenciação celular. A regulação da apoptose contribui potencialmente para a ação tóxica e carcinogênica em animais através de um balanço alterado de morte celular e replicação, uma vez que o acúmulo de esfinganina inibe o crescimento celular, é citotóxico, e a falta de esfingolípídeos altera o comportamento celular (Wang *et al.*, 1991; Meirelles, 2005; Stockmann-Juvala e Savolainen, 2008; Cruz, 2010; Wild e Gong, 2010).

A inibição da biossíntese de esfingolípídeos, segundo Cruz (2010), causa danos à atividade celular, uma vez que estas substâncias são importantes para a

composição lipoprotéica da membrana celular, para comunicação entre as células, para interação intracelular, para a matriz celular e para os fatores de crescimento, como mensageiro de diversos fatores, como interleucina 1, fator de crescimento de nervos e fator de necrose de tumor.

Estudos em camundongos sugerem que a FB₁ pode exercer um efeito na apoptose e divisão celular, através de perturbações na via de fator de necrose tumoral (TNF- α), que assim como os esfingolipídeos, também estão envolvidos na apoptose e replicação celular, além de reestruturação dos tecidos e processos inflamatórios. Uma vez que a TNF- α se liga aos receptores, ocorre a ativação de esfingomielinases, mediando a produção de ceramida, ativação da capase, expressão de proteínas inibidoras da apoptose e ativação do fator nuclear κ B (NF κ B). Deste modo, as vias dependentes dos esfingolipídeos e TNF- α podem interagir influenciando a toxicidade da FB₁ (Minami, *et al.*, 2004; Wild e Gong, 2010).

Os esfingolipídeos também servem como sítios de ligação para proteínas da matriz extracelular, inclusive para determinados micro-organismos e toxinas microbianas. Apesar de terem sido descobertos há mais de 100 anos, apenas recentemente foram reconhecidos por sua importância como mediadores dos efeitos das fumonisinas (Minami, *et al.*, 2004).



Fonte: Minami, *et al.* (2004).

Figura 6: Locais de ação das fumonisinas (FB) na síntese de esfingolipídeos. Abreviaturas: SPTase (serina palmitoiltransferase, CER sintase (ceramida sintase), DHC-dessaturase (diidroceramida dessaturase), So-kinase e -liase (esfingosina quinase e liase).

Butkeraitis (2003) considera relevante conhecer as vias metabólicas que podem ser afetadas pela inibição da enzima ceramida sintase, como a atividade biológica da esfinganina e a função dos esfingolipídeos nas células, visto que a interrupção desta via pode explicar, parcialmente, os efeitos patológicos das fumonisinas.

2.5.4 ANÁLISE DE FUMONISINAS EM ALIMENTOS

Os problemas e os riscos ligados à contaminação de produtos destinados a fabricação de rações animais e a dieta humana pela fumonisina levou ao desenvolvimento de métodos eficazes, confiáveis e sensíveis para detecção desta micotoxina no milho e seus derivados e em outros produtos de origem agrícola (Butkeraitis, 2003).

As metodologias comumente utilizadas para detecção e quantificação de fumonisinas são cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia gasosa/espectrômetro de massa (GC/MS) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada a detectores de fluorescência (FL), ultravioleta (UV) e de massa (MS). Os ensaios imunoenzimáticos também constituem um método eficiente, apresentando alta sensibilidade, reprodutibilidade e fácil execução (Meirelles, 2005; Xavier, 2007).

Segundo Degani *et al.* (1998), “a cromatografia é um método físico-químico de separação, e está fundamentada na migração diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre devido a diferentes interações, entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária”. A grande variedade de combinações entre fases móveis e estacionárias a torna uma técnica extremamente versátil, podendo ser utilizada para a identificação de compostos, por comparação com padrões previamente existentes, para a purificação de compostos, separando-se as substâncias indesejáveis e para a separação dos componentes de uma mistura.

O primeiro método empregado para detecção de fumonisinas foi o CCD de fase reversa sobre placa de sílica modificada C₁₈, empregando metanol: água (3:1) como sistema solvente, a partir de culturas de *Fusarium verticillioides* MRC 826. Porém, apesar do baixo custo e não precisar de equipamentos caros e sofisticados, o método apresenta como desvantagem um alto limite de detecção (0,5 µg/g), o que não o torna apropriado para análise de alimentos contaminados. Como moléculas polares solúveis em água e em solventes polares, as fumonisinas são adequadas

para determinação por CLAE em fase reversa, apesar do uso de metodologias como cromatografia gasosa/ espectômetro de massa (GC/MS) serem utilizadas como confirmatórias na análise de fumonisinas. Entretanto, o uso do CLAE tem sido mais comum na geração de dados de ocorrência destas toxinas, uma vez que requer menos equipamentos sofisticados e é de fácil aplicabilidade (Butkeraitis, 2003).

A principal característica da CLAE, também conhecida por HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromathography*, é a utilização de fases estacionárias com micropartículas esféricas (10,5 ou 3,0 μ). A utilização de bombas para a eluição da fase móvel torna-se necessária, uma vez que estas fases são menos impermeáveis. A utilização destas novas fases estacionárias, aliadas ao desenvolvimento dos instrumentos, permitiu a esta técnica apresentar um melhor desempenho em termos de resolução, detecção e quantificação em um menor tempo de análise (Cruz, 2010).

As fumonisinas já foram identificadas em diversos substratos, em especial no milho para ração animal, sendo a FB₃, FB₂ e FB₁ detectadas no milho naturalmente contaminado, e a última representando 70% da concentração total de fumonisinas detectadas. Apesar dos limites legais para a presença de fumonisinas em alimentos não terem sido estabelecidos, o “Mycotoxin Committee of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians” recomenda os níveis máximos de 5, 10, 50 e 50 μ g/g para rações de equinos, suínos, bovinos e aves, respectivamente. A Suíça recomenda o limite de 1 μ g/g para os derivados de milho a serem consumidos por humanos, enquanto a “Food and Drug Administration” recomenda para consumo humano o nível máximo de 2,0 μ g/g de fumonisinas para farelo de milho, 3,0 μ g/g em milho para pipoca e 4,0 μ g/g em milho destinado a produção de massas (Meirelles, 2005; Cruz, 2010).

No Nordeste do Brasil, Kawashima e Soares (2006) detectaram a presença de fumonisina B₁, aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, ocratoxina A e zearalenona em 74 amostras de produtos a base de milho adquiridas no comércio da cidade de Recife, PE, durante o período de 1999 a 2001. Fumonisina B₁ foi determinada por HPLC com detecção por fluorescência e as demais toxinas foram determinadas por cromatografia em camada delgada. Fumonisina B₁ foi encontrada em 94,6% das amostras em concentrações variando de 20 a 8600 μ g/kg. Apenas 5 amostras continham aflatoxina B₁ e o teor máximo encontrado foi 20 μ g/kg. As aflatoxinas G₁ e

G₂, ocratoxina A e zearalenona não foram detectadas em nenhuma das amostras. Todas as amostras contaminadas com aflatoxinas também apresentaram fumonisina B₁.

Lino *et al.* (2006) determinaram a quantidade de fumonisinas B₁ e B₂ em milho e produtos à base de milho Portugueses, HPLC com detecção de fluorescência. Trinta e uma amostras foram analisadas, e a presença de fumonisinas foi detectada em quatorze delas, em concentrações que variaram entre 113- 2,026 µg kg⁻¹.

Wang *et al.* (2008) analisaram e detectaram a presença de micotoxinas em alimentos à base de milho oriundos dos mercados centrais do Leste da China utilizando HPLC. Os resultados mostraram que a FB₁ é a principal contaminante nas amostras, sendo o nível global de contaminação relativamente baixo, variando entre 0,25- 1,8 µg/g em 66,7% (16 de 24) das amostras de milho da área Centro-leste; 0,21- 0,29 µg/g em 28% (6 de 21) das amostras da área Nordeste e 0,30- 3,13 µg/g em 30% (6 de 20) nas amostras da área Sudeste.

A ocorrência de aflatoxinas e fumonisinas em amostras de milho recém-colhido provenientes da região Norte do Estado do Paraná, Brasil, foi avaliada por Moreno *et al.* (2009) por cromatografia em camada fina e HPLC, respectivamente, durante os anos de 2003 e 2004. Na colheita de 2003, as fumonisinas foram detectadas em 100% das amostras, com níveis de 2,54 µg/g na recepção e 3,12 µg/g em amostras de pré-secagem. No ano de 2004 as fumonisinas foram detectadas em 98,9% das amostras na recepção e 95% das amostras de pré-secagem, sendo os níveis médios de 1,31 µg/g e 1,36 µg/g, respectivamente. Aflatoxinas não foram detectadas em 92% das amostras analisadas

O nível de fumonisinas em amostras de sementes de milho e a capacidade de cepas de *F. verticillioides*, isoladas de sementes de milho cultivadas em diferentes regiões na Índia, para a produção de fumonisinas foram detectadas por Nayaka *et al.* (2010). A maioria das amostras de milho estavam contaminadas entre 5 e 50% com *F. verticillioides*. Vinte e três, das trinta e cinco amostras, foram positivas para a produção de fumonisinas, detectadas através de HPLC e método imunoenzimático (CD-ELISA). Os níveis de fumonisina variaram nas amostras de sementes de 200 a 1772 µg/g usando CD-ELISA. O método HPLC diferenciou a produção de FB₁ e FB₂, de modo que quatorze das trinta e cinco cepas de *F. verticillioides* produziram

ambas as toxinas, demonstrando a exposição humana à fumonisina através do consumo de alimentos derivados do milho contaminados com este fungo.

Os limites de detecção e quantificação obtidos pela técnica de HPLC, utilizando variados métodos de extração e clean up, estão bem abaixo dos limites permitidos na legislação, de modo que, trabalhos recentes têm utilizado espectrometria de massas acopladas com cromatografia líquida (Marques, 2006; Sforza *et al.*, 2006; Covarelli *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2013).

A espectrometria de massas pode ser definida como o estudo de sistema de formação de íons, com ou sem fragmentação, os quais são caracterizados por sua relação massa/carga (m/z) abundância relativa. Em meados de 1900, J. J. Thomson construiu seu espectrômetro de massas parabólico para avaliar a razão carga / massa (z/m) para muitas espécies iônicas. Na expressão z/m , z é o número de cargas e m é a soma total de prótons e nêutrons em um átomo, molécula ou íon. Atualmente, o parâmetro medido é a relação m/z , ao invés de z/m , a unidade m/z foi recentemente designada de Thomson (Th). Hoje, existem diversos modelos de equipamentos, como MS em serie (MS/MS), dissociação por colisão induzida (CID), tempo de voo (TOF), diferentes tipos de detectores e equipamentos híbridos, possibilitando a quantificação de compostos com massa molecular de até 300 000 Da, com alta sensibilidade e seletividade (Xavier, 2007).

Boutigny *et al.* (2011) através do uso da CLAE-MS, quantificaram as toxinas produzidas por espécies de *Fusarium* provenientes de amostras de milho de localidades diferentes na África do Sul , durante os anos de 2008 e 2009. Deoxinivalenol e zearalenona foram correlacionados a *Fusarium graminearum*, fumonisinas a *F. verticillioides* e moniliformina e bovericina a *F. subglutinans*. A contaminação por micotoxinas em cada área individualmente variou muito entre os anos, de modo que, por exemplo, a concentração total de micotoxinas em uma localidade da região leste foi de 274 ng g⁻¹ em 2008 e 3957 ng g⁻¹ em 2009.

A contaminação por aflatoxinas e fumonisinas foi avaliada por Somorin *et al.* (2012) analisando amostras de farinha de inhame (*Dioscorea* sp.) provenientes dos mercados da Nigéria, através do uso da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção de fluorescência e CLAE acoplado a um espectrômetro de massa, respectivamente. Aflatoxinas B₁ e G₁ foram encontradas em farinha de *Dioscorea rotundata* (inhame branco) em concentrações entre 0,2- 3,2 µg kg⁻¹ e 0,5- 3,5 µg kg⁻¹, respectivamente, perfazendo um total de 57 e 21% das amostras.

Apenas a aflatoxina B₁ foi encontrada em 32% das amostras de *D. alata* (“inhame de água”), em concentrações < 0,6 µg kg⁻¹. Fumonisinas B₁ foram encontradas em 32% das amostras de inhame branco, em concentrações variando entre 5- 91 µg kg⁻¹, e foi encontrada em 5% das amostras de inhame de água, em concentrações < 0,6 µg kg⁻¹.

Técnicas avançadas de espectrometria de massas como MALDI-TOF MS (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry*) e ESI-MS (*Electrospray Ionization*), têm sido utilizadas na análise de polímeros sintéticos, complexos organometálicos e compostos orgânicos de interesse ambiental. A maior expansão, no entanto, se deu em bioquímica, biologia molecular, petroquímica e vem crescendo na área de ciências de alimentos (Blechova *et al.*, 2006; Marques, 2006).

Segundo a International Agency for Research on Câncer-IARC (1993), as toxinas derivadas de *Fusarium verticillioides* estão classificadas no Grupo 2B, como possíveis carcinogênicos para humanos, evidenciando o potencial carcinogênico referente a testes em animais, mas os dados em humanos são insuficientes (Lang, 2005).

2.5.5 INCIDÊNCIA DE *FUSARIUM* SPP. E FUMONISINAS EM GRÃOS

A fumonisina faz parte de um grupo de micotoxinas produzidas principalmente por *F. verticillioides* e *F. proliferatum*, sendo considerada a principal toxina encontrada em cereais em todo o mundo. Sua ocorrência tem sido associada com prejuízos na equinocultura, suinocultura, avicultura e riscos à saúde humana, tendo sido relacionada com câncer do esôfago em algumas regiões do mundo e como um fator de risco para defeitos do tubo neural (Bhandari *et al.*, 2002; Figueira, 2003; Brown *et al.*, 2008; Ottoni, 2008).

Leeslie *et al.* (2005) reavaliaram isolados de *Fusarium* que haviam sido recuperados de Sorgo e Milheto. Os autores analisaram cinco amostras de cinco espécies de *Fusarium* (*F. andiyazi*, *F. nygamai*, *F. pseudonygamai*, *F. thapsinum*, e *F. verticillioides*) geralmente associadas a estas culturas, que podem ser distinguidas por isoenzimas e com padrões de bandas resultantes de polimorfismos de tamanho de fragmentos amplificados. As espécies foram avaliadas quanto ao

perfil de produção das toxinas moniliformina e fumonisina e quanto a patogenicidade, diferindo bastante nestes aspectos, justificando que os erros de identificação anteriores justificam as inconsistências encontradas na literatura quando acreditava-se que estavam estudando uma mesma espécie.

Gallardo-Reyes *et al.* (2006) ao coletarem 76 amostras de grãos de milho provenientes de dez localidades produtoras no México analisaram a micobiota, e determinaram a presença de fumonisinas na forma natural bem como a capacidade de produção desta toxina por *F. verticillioides* isolados dos grãos. Como resultados, isolaram, em ordem decrescente, espécies dos gêneros *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium* e *Alternaria*, respectivamente. Reis *et al.* (2010) caracterizaram a microflora e a presença de fumonisina em grãos de Sorgo no Brasil, correlacionando os resultados com o meio ambiente e fatores abióticos. Todas as amostras apresentaram contaminação por fungos, sendo os mais frequentes *Cladosporium* spp (61,8%). e *Helminthosporium* spp (33,4%). *Fusarium verticillioides* foi isolado de 15,1% das amostras, com 38% delas contaminadas por fumonisina B₁, em níveis que variaram de 50-368,78ng g⁻¹. Em relação aos fatores abióticos, temperatura, atividade de água e precipitação mostraram uma positiva correlação com a frequência de *F. verticillioides* e a produção de fumonisina B₁.

Espécies de *Fusarium* isoladas de arroz na Ásia e na África foram caracterizadas de acordo com sua ecologia, filogenia, patogenicidade e produção de toxinas por Wulff *et al.* (2010). Independente da origem, quatro espécies de *Fusarium* foram detectadas de diferentes amostras de sementes de arroz: *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. andiyazi* e *F. fujikuroi*, sendo esta última encontrada apenas em amostras asiáticas. As taxas de infecção variaram entre 0,25% e 9%.

Reyes-Velázquez *et al.* (2011) determinaram a ocorrência de *Fusarium* spp. em milho de diferentes regiões do México e determinaram a capacidade destes isolados de produzirem bovericina (BEA), fusaproliferina (FUS) e fumonisinas (FBs). Vinte e oito amostras de milho foram analisadas quanto à micobiota e a ocorrência natural de micotoxinas. *F. verticillioides* foi a espécie dominante (44 isolados-80%), seguida de *F. subglutinans* (13 isolados-37%) e *F. proliferatum* (2 isolados-16%), sendo todas as amostras positivas quanto a contaminação por FB₁ e FB₂, em níveis superiores a 606 e 277 ng g⁻¹, respectivamente. Todos os isolados de *F. verticillioides* foram capazes de produzir FB₁, e alguns também produziram FB₂ e FUS.

Rocha *et al.* (2012) aplicaram métodos moleculares para identificar espécies de *Fusarium* isoladas de grãos de milho de diferentes regiões do Brasil, tendo como resultado do isolamento, 96 isolados identificados como *F. verticillioides* e quatro isolados identificados como outras espécies de *Fusarium*.

Uegaki *et al.* (2012) estimaram a prevalência de *Fusarium* spp. produtores de micotoxinas bem como os níveis de fumonisinas em milho cultivado e colhido no Japão, durante o ano de 2009. *Fusarium fujikuroi* foi a espécie mais prevalentemente isolada em amostras coletadas após a etapa de amadurecimento, além de outras espécies, e produziu fumonisinas B1 e B2 em testes de cultivo em meio de cultura com milho, excedendo níveis de 2000 $\mu\text{g Kg}^{-1}$.

Queiroz *et al.* (2013) propuseram um estudo para determinar a micobiota total de *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. e *Fusarium* sp., bem como a detecção e quantificação de fumonisina B₁ e aflotoxina B₁ em rações comerciais destinadas a pássaros ornamentais no Rio de Janeiro, Brasil. Sessenta amostras de diferentes rações comerciais foram coletadas. *Aspergillus* (82%), *Cladosporium* (50%) e *Penicillium* (42%) foram os gêneros mais frequentemente isolados. *Aspergillus niger* (35%), *Aspergillus fumigatus* (28%) e *Aspergillus flavus* (18%) apresentaram as maiores densidades relativas. Quanto a presença de micotoxinas, a contaminação com fumonisinas foi detectada em 95% do total de amostras, com níveis entre 0,92 a 6,68 $\mu\text{g g}^{-1}$, e a contaminação por aflatoxinas foi encontrada num total de 40% das amostras, com níveis entre 1,2 e 9,02 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Stumpf *et al.* (2013) analisaram as espécies de *Fusarium* e fumonisinas, pelo uso de cromatografia líquida de alta eficiência, associados a grãos de milho em 23 municípios do Rio Grande do Sul, Brasil, no período de 2008-2010. *Fusarium* spp. do complexo *Gibberella fujikuroi* estavam presentes em 96% das amostras, sendo que a identificação via PCR confirmou a presença de *F. verticillioides* em 76% das amostras, seguido por *F. subglutinans* (4%) e *F. proliferatum* (2%). *G. Zeae* (anamorfo = *F. graminearum*) totalizaram 18% das amostras. A toxina FB₁ foi encontrada em 58,6% das amostras, a FB₂ ocorreu em 37,9% das amostras, enquanto ambas as toxinas foram observadas em 37,9% das amostras, sendo que os limites encontrados estão abaixo do limite máximo determinado pela regulamentação em vigor no Brasil.

2.5.6 MICOTOXICOSES CAUSADAS POR FUMONISINAS

A contaminação de alimentos e rações por fumonisina tem sido associada a doenças de origem hepatotóxicas e nefrotóxicas para maioria das espécies animais testadas, que apresentam graus variados de sensibilidade à fumonisina, dependendo do estado nutricional do animal, dose ingerida e modo de exposição. Fumonisinas estão associadas com várias doenças animais, incluindo câncer de rim e fígado em roedores utilizados em laboratório, defeitos na formação do tubo neural em embriões de camundongos tanto *in vivo* quanto *in vitro*, leucoencefalomalácia (LEME) em cavalos, síndrome do edema pulmonar (SEP) e hidrotórax em suínos e toxicidade renal e hepatotoxicidade em coelhos, ratos e ovelhas (Harrison, *et al.*, 1990; Osweiler *et al.*, 1992; Proctor *et al.*, 2003; Silva, 2007; Ottoni, 2008; Chang, 2010).

A leucoencefalomalácia (LEME) é uma doença neurotóxica fatal que afeta cavalos, burros, mulas e coelhos, caracterizada por lesões necróticas liquefativas predominantemente na massa branca, mas também em certa extensão da substância cinzenta do cérebro. Os sintomas neurotóxicos podem ser vistos dias após a exposição à fumonisina B₁, e incluem diminuição do consumo de alimentos, laminite, ataxia, paralisia facial e recumbência. Debilidade da função motora, necrose da substância branca cerebral e lesões no córtex cerebral podem ser observadas posteriormente, resultando em morte dentro de poucas horas a uma semana (Butkeraitis, 2003; Minami *et al.*, 2004; Stockmann-Juvala *et al.*, 2008).

A partir do isolamento de fumonisinas em animais acometidos com LEME, estudos através da administração intravenosa de FB₁ em cavalos sugerem que a dose oral suficiente para indução da LEME estaria em torno de 15-22 mg/kg da dieta. Os animais sobreviventes apresentam lesões neurológicas permanentes. Além das lesões cerebrais, têm sido relatadas anormalidades histopatológicas no fígado e rins de cavalos que ingeriram fumonisina pura, milho naturalmente contaminado ou material de cultura de *F. verticillioides*. Esta outra forma de manifestação da LEME, assim como a neurotóxica, é inicialmente caracterizada por inapetência e depressão, seguidas de edema facial e icterícia. Outros sinais observados são os elevados níveis de enzimas no soro, indicando danos no fígado, e uma alteração na relação sérica de esfinganina/esfingosina, indicativo da

intoxicação por fumonisina (Butkeraitis, 2003; Minami, 2004; Stockmann-Juvala *et al.*, 2008).

A síndrome do edema pulmonar em suínos (SEP) é caracterizada por edema pulmonar e hidrotórax, causando danos ao epitélio alveolar, endotélio pulmonar e falência cardíaca, levando a óbito em 4-7 dias de ingestão diária de fumonisinas em concentrações maiores ou iguais a 92 $\mu\text{g/g}$ ou 6mg/Kg de peso corporal/dia. A sintomatologia consiste em dispnéia, seguida de fraqueza, cianose e morte. Necrose de pâncreas e danos no fígado têm sido observadas em lesões de suínos intoxicados com fumonisina, a partir de ração naturalmente contaminada. A elevação do colesterol sérico, enzimas hepáticas e alterações nos sistemas hepático, cardiovascular e imune são características constantemente observadas. Os níveis associados a toxicose em suínos variam de 1 $\mu\text{g/g}$ a 300 $\mu\text{g/g}$ (Butkeraitis, 2003; Minami, 2004).

Theumer *et al.* (2002) avaliaram, na Argentina, os efeitos imunológicos causados pela administração de FB₁ em ratos durante 12 semanas, concluindo que a toxina tem como órgãos alvo de toxicidade subcrônica o fígado e os rins, sendo o intestino delgado também claramente afetado.

Em aves, o efeito se manifesta através do retardo no desenvolvimento, redução no ganho de peso, aumento de peso nos órgãos hepático e renal, problemas cardíacos, imunodepressão, degeneração e necrose hepática (Silva, 2007).

A constante ingestão de fumonisinas através de produtos e derivados de milho tem sido associada ao câncer de esôfago em humanos em Transkey (África) e Linxian (China), onde se verifica alta incidência desta patologia. Os níveis médios de FB₁ e FB₂ foram significativamente maiores, tanto em grãos de milho mofado, quanto nos aparentemente saudáveis, na região de alta incidência de câncer de esôfago, quando comparados com área de baixa incidência, na África do Sul, no período compreendido entre 1985 e 1989 (Sydenham *et al.*, 1990). Em estudo realizado por Marasas *et al.* (1986), uma amostra de milho, aparentemente saudável, encontrou-se 44 $\mu\text{g/g}$ de FB₁ e grãos visivelmente contaminados por *Fusarium* apresentaram contaminação de 83 $\mu\text{g/g}$ de FB₁. Embora outros fatores possam estar relacionados à incidência de câncer esofágico, como consumo de álcool, entre outros componentes dietéticos ou ambientais, estudos sustentam a hipótese de que as fumonisinas possam ser parcialmente responsáveis pela

ocorrência da doença em humanos, uma vez que espécies de *Fusarium* produtoras de fumonisinas associadas ao milho estão envolvidas (Yoshizawa, *et al.*, 1994; Butkeraitis, 2003).

Em 1990, foi relatada uma má formação do tubo neural em um grupo de recém-nascidos na fronteira entre as regiões do Texas e México, onde o consumo de alimentos da culinária mexicana é maior, e acredita-se que tal patologia esteja associada com o consumo de “tortillas” (comida mexicana à base de milho) pelas mães durante a gravidez, uma vez que nos anos do estudo, o milho continha uma alta concentração de fumonisina (Silva, 2007; Ottoni, 2008).

No Brasil, Orsi *et al.* (2000) relataram a frequência de 90,2% e 97,4% de contaminação por FB₁ e FB₂ em amostras de grãos de milho híbrido armazenados. Vargas *et al.* (2001), analisaram 214 amostras de milho não processado armazenados em diversos armazéns do país, encontrando níveis de fumonisina que variaram entre 200 e 6100 mg/kg de FB₁ em 99% das amostras. Porém a contaminação não se restringe a grãos de milho, se estendendo a produtos processados derivados do milho, como demonstrado por Castro *et al.* (2004), onde 100% das amostras de cereal infantil tipo C (farinha de milho, amido, entre outros) estavam contaminados por fumonisina, em níveis de contaminação que variavam entre 437 a 2242 µg/kg.

Cumprе ressaltar, que diferentes produtos têm diferentes níveis de micotoxinas, com o nível variando de acordo com fatores físicos ou mecânicos durante o processo. Sabe-se que o arroz e o milho têm alta concentração de micotoxina, porém, o processamento desses grãos pode significar uma redução significativa dos níveis tóxicos de micotoxinas (Leal *et al.*, 2005).

A incidência de fungos produtores de micotoxinas, com a predominância de *F. verticillioides*, em produtos de origem agrícola evidencia constante perigo à saúde humana e animal, requerendo medidas de controle eficazes principalmente com relação aos países exportadores desses produtos. O conhecimento de fatores eco-fisiológicos que condicionam o crescimento dos fungos e a produção de micotoxinas, assim como o estudo das populações e a variedade inter ou intraespecífica, são as bases para o desenvolvimento de métodos diagnósticos adequados e eficazes (Figueira, 2003; García, 2010).

2.6 PRINCIPAIS FATORES QUE DETERMINAM O DESENVOLVIMENTO FÚNGICO E A PRODUÇÃO DE MICOTOXINAS

A presença de um fungo toxigênico, no campo ou durante o armazenamento dos produtos alimentícios, não implica necessariamente na produção de micotoxinas, sendo que, para produção desta toxina, faz-se necessário a condição de biossíntese do fungo e condições ambientais predisponentes, como alternância das temperaturas, condições adequadas de umidade e pH. Fatores como a composição do substrato e da atmosfera, interações microbianas, fúngicas ou com vetores invertebrados, genótipo do hospedeiro e composição química do alimento também influenciam na capacidade produtora de micotoxinas do fungo, sendo os alimentos de alto teor de carboidratos os mais favoráveis à produção de algumas toxinas, embora outros compostos também exerçam influência (Ottoni, 2008).

Após a colheita e durante o armazenamento de produtos agroalimentícios, as condições ambientais que permitem o crescimento dos fungos tornam-se mais fáceis de serem controladas. O conhecimento das condições ótimas de crescimento fúngico e produção de toxinas permitem estratégias de controle e prevenção da ocorrência destes fungos e suas micotoxinas sobre os cereais, tanto no campo quanto durante o armazenamento (García, 2010).

A atividade de água (a_w), assim como a temperatura, é um dos fatores eco-fisiológicos mais importantes para colonização de um determinado substrato e/ou hospedeiro e na produção de toxinas pelo gênero *Fusarium*. Segundo García (2010), a atividade de água é definida, do ponto de vista microbiológico, como “a água livre de um substrato, em equilíbrio com a água relativa do ambiente, disponível para o crescimento microbiano ou fúngico”. Em ecossistemas terrestres, a atividade de água pode se expressar como atividade de água total (Ψ_T) definida pela mesma autora como “a fração disponível do conteúdo de água total necessária para o crescimento microbiano ou fúngico, medida em Pascals”.

A disponibilidade de água determina a germinação dos esporos, a taxa de crescimento fúngico e pode afetar a regulação da biossíntese de toxinas, embora os fungos filamentosos consigam crescer com uma pequena quantidade de água disponível, sendo por isso, considerados os maiores causadores de deterioração dos vegetais. Para a maioria das espécies fúngicas que acometem os grãos, a atividade de água mínima está em torno de 0,70. Para as espécies do gênero

Fusarium, a germinação dos esporos ocorre a partir da $a_w=0,88$, enquanto o crescimento ocorre em $a_w=0,90$. Baixo teor de umidade > 22% evitam ou reduzem a produção de toxinas durante o armazenamento de cereais (Dilkin *et al.*, 2002; Palmero *et al.*, 2008; García, 2010).

Do mesmo modo que os fungos são afetados pela disponibilidade de água, cada espécie possui uma temperatura mínima que favorece o seu desenvolvimento e a produção de toxinas. Embora o crescimento possa ser observado em uma ampla faixa de temperatura (-4°C/65°C), a maioria dos fungos cresce em temperaturas em torno de 0-35°C, e a produção de micotoxinas difere entre as espécies fúngicas. As temperaturas mínima, máxima ou ótima para produção de micotoxinas é incerta, entretanto, a melhor faixa de temperatura está em torno de 20-28°C (Dilkin *et al.*, 2002; Lacey, 1989 apud García, 2010).

Os requerimentos mínimos para o crescimento e produção de toxinas são distintos em diferentes temperaturas e substratos, de modo que, a temperatura exerce importante influencia sobre a disponibilidade de água. Cada fator, separadamente ou em interação, tem influência sobre as espécies de fungos que estão colonizando o cereal, estabelecendo espécies dominantes, dependendo das condições (Magan e Aldred, 2007).

O efeito de diferentes atividades de água (0,968; 0,956; 0,944; 0,925) e temperatura (25 e 30°C) sobre a colonização e produção de fumonisina FB₁ e FB₂ por isolados de *F. verticillioides* e *F. proliferatum* do milho foi investigado por Marín *et al.* (1995) durante um período de seis semanas. Ambas as espécies cresceram melhor com o aumento da atividade de água e em temperaturas de aproximadamente 30°C. Pouca produção de FB₁ e FB₂ foi observada em $a_w = 0,925$, sendo as maiores produções em $a_w = 0,956$ e 0,968 em ambas as temperaturas testadas, sendo *F. verticillioides* o maior produtor.

Ryu *et al.* (1999), investigaram a influência de temperaturas cíclicas, em intervalos de 12 horas, em culturas mantidas a 5 e 25°C, 10 e 25°C, e 15 e 30°C, sobre a produção de FB₁ por *F. verticillioides* e ergosterol por isolados de *F. proliferatum* obtidos de arroz. Além disso, eles realizaram testes em culturas a temperatura constante (25°C) por duas semanas, seguidos de mais quatro semanas a 15°C. Em todas as culturas a produção de FB₁ e ergosterol foram observadas, tendo os isolados de *F. verticillioides* mantidos no intervalo de 10 e 25°C obtido a maior média de produção de FB₁, 247 µg/g após duas semanas, e os

isolados de *F. proliferatum* mantidos em temperaturas entre 5 e 25°C obtidos a média máxima de produção de ergosterol de 284 µg/g após seis semanas.

A produção de fumonisina FB₁ e FB₂ por isolados de *F. verticillioides* foi avaliada por Dilkin *et al.* (2002) em diferentes temperaturas (20, 25 e 30°C) e umidade (25, 34 e 42%), em intervalos de crescimento de 10, 20, 30, 45 e 60 dias. A concentração de fumonisinas variou bastante, alcançando faixas de 0,25 - 5515,45 µg/g para FB₁ e 0,15-3032,10 µg/g para FB₂. A maior produção de FB₁ foi observada em condições de 34% de umidade, após 60 dias a 25°C, enquanto a maior média de FB₂ foi obtida de culturas após 45 dias de crescimento, com umidade de 42% na mesma temperatura.

Hinojo *et al.* (2006) avaliaram a produção de fumonisinas FB₁ e FB₂ em quatro isolados do complexo de espécies *Gibberella fujikuroi* em amostras de arroz em diferentes temperaturas e atividade de água. Como resultados, a produção de fumonisinas foi maior a 20°C e menor a 37°C. Quatro dos cinco valores de atividade de água testados (0,97; 0,98; 0,99; 1,0) não afetaram significativamente a acumulação de fumonisina, mas as mesmas não eram detectadas quando em culturas de $a_w = 0,96$.

Rupollo *et al.* (2006) também avaliaram os efeitos da umidade e do armazenamento hermético na contaminação e produção de micotoxinas por fungos em grãos de aveia por 12 meses. Os grãos foram colhidos com umidade de 16%, e secados até as umidades de 9, 12 e 15%. O aumento do tempo de armazenamento e umidades mais elevadas favoreceram a incidência dos fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*.

A influência da temperatura e atividade de água na produção da micotoxina fumonisina por isolados de *Aspergillus niger* e *Fusarium* spp. foi demonstrada por Mogensen *et al.* (2009). Os isolados foram cultivados em seis temperaturas diferentes, entre 15-42°C, no meio de cultura Czapek ou BDA, com adição de 5% de NaCl. *A. niger* teve a maior produção de FB₂ a 25-30°C, enquanto *Fusarium* spp. tiveram a maior produção de fumonisina FB₁ e FB₂ a 20-25°C. A adição de 2,5% de NaCl, ou 10-20% de sacarose aumentou a produção de FB₂ em *A. niger*, enquanto a adição de glicerol reduziu esta produção. Todas as três atividades de água com solutos reduzidos diminuiu a produção de fumonisina em espécies de *Fusarium*.

Em seu artigo de revisão, Picot *et al.* (2010) enfatizaram a importância da atividade de água e da temperatura como principais fatores abióticos que

influenciam na produção de fumonisina em espécies de *F. verticillioides* e *F. proliferatum*. A partir da análise dos estudos realizados por outros autores, eles puderam concluir que maior disponibilidade de água resulta numa maior produção de fumonisina e crescimento fúngico, e que temperaturas entre 20-30°C para *F. verticillioides*, e 15-25°C para *F. proliferatum* foram consideradas temperaturas ótimas para produção destas toxinas por estas espécies. Outros fatores como pH, fatores nutricionais e mecanismos de defesa naturais da planta também foram descritos como relevantes para produção de fumonisinas.

Os fungos geralmente crescem em pH entre 4 a 7, sendo o pH ótimo para a maioria das espécies contaminantes de vegetais em torno de 5,6. Em condições nas quais o pH está muito acima desta faixa o crescimento torna-se difícil, favorecendo a produção de metabólitos secundários, sugerindo que o pH ácido cria um ambiente favorável para início da síntese de toxinas. *F. verticillioides* cresce melhor em pH 7,0 e 30°C, enquanto *F. proliferatum* cresce bem em pH 5,5 e 25°C (Marín *et al.*, 1995 a e b).

Flaherty *et al.* (2003) demonstraram a existência de um gene, *PAC1*, que codifica um dos principais reguladores transcricionais em resposta a mudanças de pH, mostrando que em pHs ácidos ocorre um aumento da síntese de fumonisinas por *F. verticillioides*, enquanto em pHs básicos não se observa a produção da toxina. A interrupção do gene *PAC1* resultou em um mutante, que tanto em pHs ácidos quanto básicos produziram muito mais toxinas que as espécies selvagens.

O efeito interativo da atividade de água com outros fatores eco-fisiológicos, como temperatura e pH, e sua influência na taxa de crescimento e produção de toxinas têm sido demonstrado por vários estudos, usando técnicas moleculares como RT-PCR em tempo real, que detecta os níveis de expressão dos principais genes que atuam na rota de síntese da toxinas (García, 2010).

A luz também é um importante sinal para os fungos, uma vez que influencia muitas respostas fisiológicas diferentes. Fanelli *et al.* (2012) analisaram a influência da luz em diferentes comprimentos de onda e intensidade no crescimento, conidação e biossíntese de fumonisina B₁, B₂ e B₃ por *F. verticillioides*. Comprimentos de onda em todo espectro visível, do vermelho (627 nm) ao azul (470 – 455 nm) estimularam o crescimento e aumentaram a produção de fumonisina por até 150% quando comparado com o cultivo no escuro. Entretanto, o cultivo sob onda curta de luz azul (390 nm) mostrou redução do crescimento fúngico e da produção

de fumonisina em até 85%. Luz branca pulsante não teve efeito sobre o crescimento, mas reduziu a produção de fumonisina pela metade da produção observada durante a incubação no escuro. RT-PCR em tempo real foi usada para medir o nível de expressão dos genes *fum1*, *fum21* e *FvVE1*, que codificam proteínas envolvidas na biossíntese de fumonisina, confirmando uma correlação significativa entre expressão gênica e produção de fumonisina.

2.7 MARCADORES MOLECULARES PARA IDENTIFICAÇÃO

As espécies de *Fusarium* podem ser identificadas e analisadas por técnicas clássicas e/ou moleculares. As técnicas clássicas baseiam-se na análise de caracteres fenotípicos como a caracterização morfológica (produção de conídios, crescimento radial da colônia), ou bioquímica (produção de substâncias, auxotrofias), restringindo a possibilidade de se conduzir estudos populacionais e muitas vezes, de sistemática. O uso de técnicas moleculares vem crescendo acentuadamente, e se apresenta como uma alternativa aos métodos tradicionais, pois analisa o genoma, independentemente do estado fisiológico do organismo, sendo suficientemente sensível para distinguir espécies estreitamente relacionadas (Gomes, 2008).

Marcador molecular é todo e qualquer fenótipo oriundo de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Os diversos métodos de detecção de polimorfismo genético diretamente em nível de ácidos nucleicos têm permitido a análise molecular da variabilidade do DNA, determinando pontos de referência nos cromossomos, tecnicamente denominados “marcadores moleculares” (Gomes, 2008).

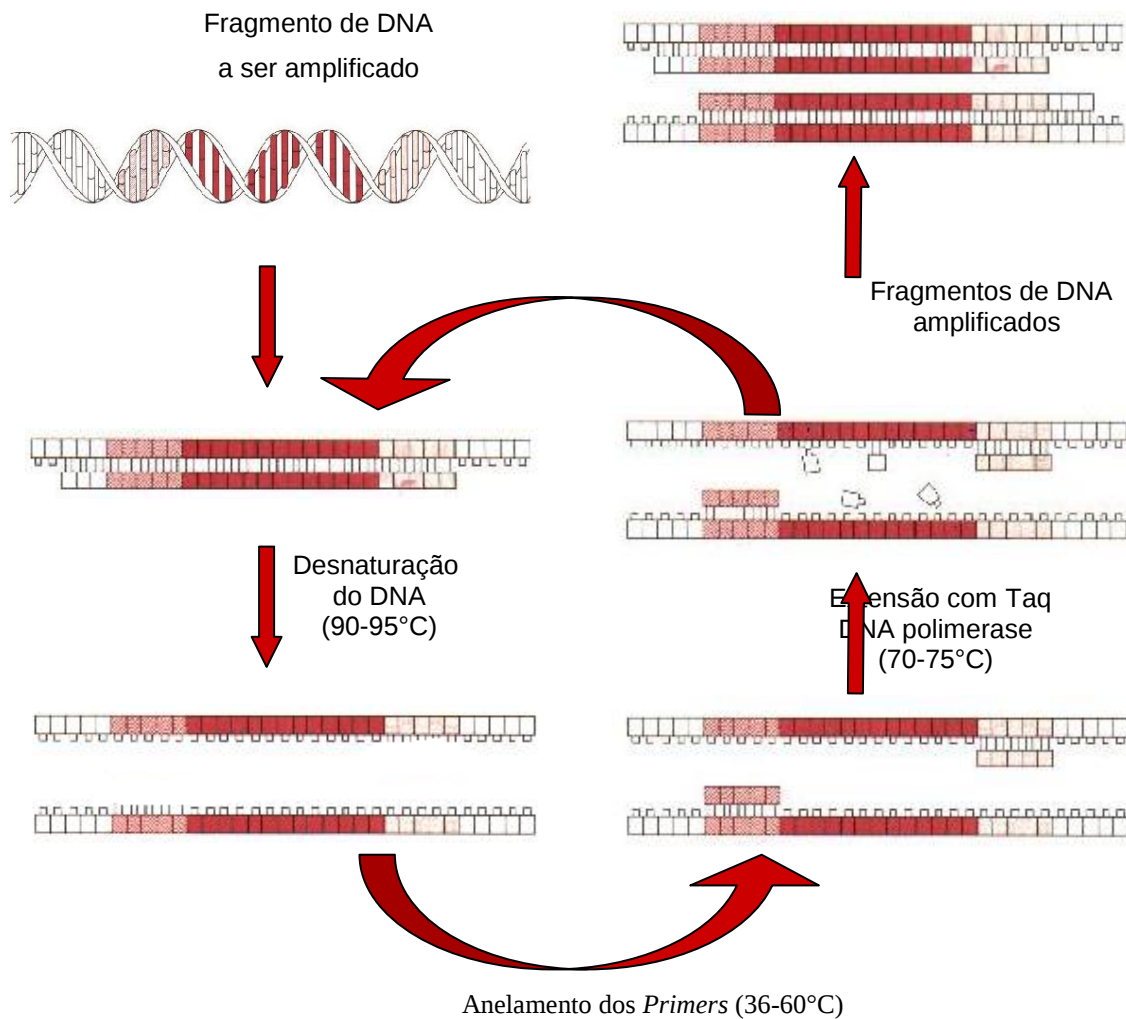
As técnicas de diagnóstico molecular têm sido muito utilizadas nos programas de melhoramento genético, revelando a variabilidade em nível de DNA e, conseqüentemente, detectando diferenças entre indivíduos. Estas enfocam a organização da estrutura genética das populações, podendo mostrar o grau de similaridade intraespecífica e interespecífica, evitando o efeito ambiental (Medeiros, 2008).

O desenvolvimento do processo de amplificação via PCR aumentou muito a eficiência da detecção de polimorfismos no DNA ou RNA de diversos organismos,

permitindo a obtenção de outras classes de marcadores moleculares que têm revolucionado a genética molecular, por se tratar de uma ferramenta relativamente rápida, simples e segura, tanto na pesquisa visando o entendimento de processos biológicos fundamentais, quanto nas áreas aplicadas envolvendo diagnóstico e melhoramento genético de plantas e animais (Carneiro-Leão, 2006; Maciel, 2008).

A técnica consiste na amplificação *in vitro* de uma determinada sequência de DNA catalisada por uma DNA polimerase termorresistente. A reação também possui outros componentes, como desoxirribonucleotídeos trifosfatados (DNTP's), que fornecem as bases nitrogenadas para síntese de DNA, iniciadores, uma fita simples de DNA como molde e tampão, contendo íons de magnésio e outras substâncias (Serafini *et al.*, 2002; Pierce, 2004).

Cada ciclo de PCR consiste em três etapas (Figura 7): a primeira, de desnaturação (abertura da dupla fita) do DNA em alta temperatura (94°C-100°C); a segunda de anelamento (hibridização) dos iniciadores em temperatura mais baixa, definida conforme a composição e tamanho de bases dos *primers*, e a última etapa de reação de polimerização (síntese) da fita complementar pela DNA polimerase, na temperatura ótima da enzima (72°C para *taq* DNA polimerase, por exemplo). Depois de 30 a 40 ciclos em um termociclador, obtêm-se bilhões de cópias do DNA-alvo, e os produtos da amplificação são observados após a eletroforese (Serafini *et al.*, 2002).



Fonte: Brasileiro (2003).

Figura 7: Esquema básico de amplificação de um segmento específico de DNA pela técnica da PCR.

A possibilidade de se gerar grandes quantidades de fragmentos de DNA de segmentos específicos do genoma foi um dos aspectos fundamentais da revolução causada pela PCR. O impacto causado por esse método foi observado pelo volume crescente de seqüências de DNA e proteínas em bancos de dados. (Ferreira e Grattapaglia, 1998; Maciel, 2008; Medeiros, 2008).

Algumas técnicas têm sido utilizadas para caracterizar diferentes espécies de *Fusarium*, como PCR com iniciadores espécie-específico (Mulé *et al.*, 2004; Sreenivasa *et al.*, 2010; Maheshwar *et al.*, 2009) e ISSR (Inter-simple Sequence Repeat) (Luongo *et al.*, 2007; Bayraktar *et al.*, 2008).

O genoma haplóide de espécies toxigênicas importantes, como *F. verticillioides*, já foi sequenciado, apresentando 46 Mb e 12 cromossomos, sendo assim, possível encontrar nas bases de dados informações sobre as sequências de importantes genes da rota de síntese de micotoxinas (García, 2010).

2.7.1 MARCADORES MOLECULARES GENE-ESPECÍFICOS

A detecção de fitopatógenos com o uso de *primers* específicos em reação de PCR tem sido muito utilizada por pesquisadores na tentativa de evitar a disseminação do patógeno no material vegetal (Mulé *et al.*, 2004; Sreenivasa *et al.*, 2010; Maheshwar *et al.*, 2009; Chang *et al.*, 2013). Esta técnica é uma alternativa rápida, fácil e sensível, que pode ser empregada em pequena ou grande escala (Medeiros, 2008).

A presença do gene *FUM1*, responsável pelo controle da capacidade produtiva da toxina fumonisina, e outros genes desta via biossintética vem sendo reportada por diversos autores em isolados de *F. verticillioides*. Sánchez-Rangel *et al.* (2005) reportaram a produção de fumonisina e a presença do gene *FUM1* através do uso de *primer* específico, para 34 isolados de *F. verticillioides* isolados de culturas de milho no México, de modo que a maioria dos isolados produtores de fumonisina apresentava este gene.

Silva *et al.* (2007) analisaram 27 isolados de *F. verticillioides* oriundos de milho e sorgo do Brasil quanto a presença do gene *FUM1*. Os resultados obtidos mostraram que 6 destes, exibiram 100% de similaridade quanto a sequência do gene, estando diretamente ligado a produção de fumonisina.

Maheshwar *et al.* (2009) relataram a capacidade de produção de fumonisina por 27 isolados de *F. verticillioides* provenientes de arroz de diferentes regiões da Índia, através do uso de um par de *primers* específicos, de modo que 11 isolados foram identificados como hábeis a produzir fumonisina. Trabalho semelhante foi realizado por Nelson *et al.* (1997), que testaram a habilidade para produzir fumonisina em 90 culturas de *F. verticillioides* isolados de milho e outros substratos de diferentes áreas geográficas (Austrália, Estados Unidos), destacando a predominância de fumonisina B₁.

Um ensaio de PCR com os *primers* gene-específicos *FUM1* foi realizado por Dissanayake *et al.* (2009) para testar a capacidade produtora de fumonisina B₁ por isolados de *Fusarium proliferatum* oriundos de plantas de cebolinho (*Allium fistulosum*) e sementes de cultivares comerciais no Japão, discriminando isolados não produtores e produtores de fumonisina B₁, sendo que 13 dos 20 isolados analisados produziram esta toxina, apresentando um fragmento de DNA amplificado de aproximadamente 700pb.

Através da detecção dos genes iniciais da via biossintética de fumonisina, *FUM1* e *FUM8*, Von Bargen *et al.* (2009) demonstraram que em 25, de 45 isolados de *Fusarium proliferatum* analisados associados a aspargo, a presença destes genes indicaram a habilidade em produzir fumonisinas, de modo que a sua detecção precoce nestes isolados poderia ser adequada para impedir a absorção destas toxinas em alimentos utilizados na dieta humana.

Wang *et al.* (2010) também utilizaram os genes *FUM1* e *FUM8* para determinar a identidade e a capacidade produtora de fumonisinas em fungos isolados de amostras de aspargos na China, e observaram que os isolados que continham os genes FUM produziram fumonisinas em cultura, variando de 28-4204 μg^{-1} , sendo *Fusarium proliferatum* a única espécie de *Fusarium* produtora de fumonisina associada à aspargo.

2.7.2 MARCADOR MOLECULAR ISSR (INTRON SITE SPLICE PRIMER)

As regiões de microssatélites são conhecidas como sequências simples repetidas (SSR – Simple Sequence Repeats) e consistem de pequenas sequências (sequence motif) com 1 a 4 nucleotídeos de comprimento que se repetem em *tandem* em um determinado locus, distribuídas ao longo do genoma, sendo mais abundantes em regiões não codificadoras do que em *éxons*. Tais sequências são frequentemente encontradas em genomas eucarióticos, e são distribuídas ao acaso, formando *loci* genéticos muito mais polimórficos do que os *loci* hiperpermeáveis contituídos por minissatélites. As sequências de microssatélites são pequenas, usualmente menores do que 10-pb (Ferreira e Grattapaglia, 1998; Richard *et al.*, 1999; Guy-Franck e Pâques, 2000; Brasileiro, 2003).

Os métodos que detectam o polimorfismo nos *loci* de sequências simples repetidas geram um grande número de alelos detectáveis, oferecendo grande reprodutibilidade. Devido a sua alta mutabilidade, os microssatélites possuem um significativo papel na evolução do genoma, produzindo e mantendo a variação genética quantitativa. O alto grau de mutações altera os seus comprimentos e conseqüentemente, estas mudanças resultam em polimorfismo entre indivíduos, permitindo uma discriminação precisa entre indivíduos proximamente relacionados (Kashi *et al.*, 1997; Brasileiro, 2003; Carneiro-Leão, 2006).

Estes marcadores têm revolucionado algumas áreas da genética, sendo bastante utilizados para mapeamento genético e físico de genomas, para identificação e discriminação de genótipos e estudos de genética de populações. Além de serem altamente polimórficos, a análise dos microssatélites usam quantidades mínimas de DNA, equivalentes as usadas no RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). O uso de microssatélites como marcadores também pode auxiliar na discriminação de “taxa”, que é uma técnica chamada “microssatélite fingerprinting”. Este método tem sido testado em vários fungos, detectando polimorfismos inter e intraespecífico, auxiliando também no estudo genético de plantas (Groppe *et al.*, 1995; Ferreira e Grattapaglia, 1998; Carneiro-Leão, 2006).

Os *primers* de microssatélites com motivos de (AT)_n, (CA)_n, (CT)_n, (GT)_n, (TG)_n, (ACA)_n, (ACC)_n, (ACG)_n, (ACT)_n, (AGC)_n, (AGG)_n, (AGT)_n, (ATC)_n, (GAC)_n, (GTG)_n, (GACA)_n, (GATA)_n e (TGTC)_n são usualmente utilizados para amplificação de inter-regiões repetidas. Esta ferramenta produz padrão de amplificação que revela o possível polimorfismo de DNA na sequência de nucleotídeos entre os dois sítios de microssatélites no genoma de fungos, gerando o que é denominado de perfil ISSR (Gupta *et al.*, 1994; Brasileiro, 2003).

Bayraktar *et al.* (2008) analisaram a variabilidade genética entre isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* usando marcadores moleculares como RAPD e ISSR, que permitiram uma discriminação entre os isolados dividindo-os em três grupos. Estes métodos revelaram uma considerável variação genética entre os isolados, mas nenhuma correlação para o agrupamento em isolados de diferentes regiões geográficas.

Chang *et al.* (2013) usaram marcadores moleculares ISSR (*primers* GTG₅ e GACA₄), INTRON (*primer* EI1), RAPD (*primer* OPW-6) e RFLP para comparar isolados de *F. verticillioides* fitopatogênicos e isolados da mesma espécie obtidos de

amostras clínicas, de modo que, os marcadores ISSR utilizados apresentaram uma alta homogeneidade genética entre os isolados obtidos de amostras clínicas, em contraste com a alta variabilidade genética entre os isolados fitopatogênicos de *F. verticillioides*.

A amplificação de ISSR demonstra que os microssatélites são mais variáveis que isoenzimas, RFLP (Restriction fragment length polymorphism), RAPD, e AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) (Becerra e Paredes, 2000), mais estáveis e reprodutíveis segundo Han *et al.* (2002), sendo útil para identificação de espécies e caracterização de isolados fúngicos.

2.8 MALDI-TOF MS

O sistema mais antigo para a classificação das espécies de fungos, que incluem fungos filamentosos e leveduras, é baseado em dados morfológicos, principalmente aqueles ligados às estruturas reprodutivas. Porém, este método de classificação apresenta limitações, tais como as culturas de fungos que não desenvolvem estruturas reprodutivas, ou a semelhança morfológica entre membros de espécies diferentes (Santos e Lima, 2010).

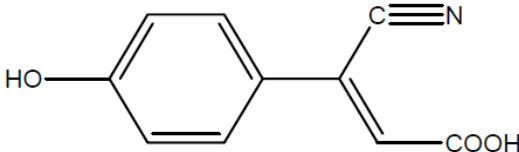
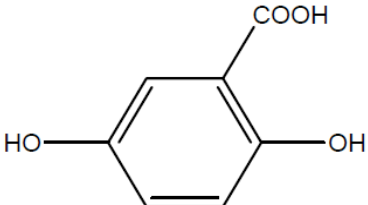
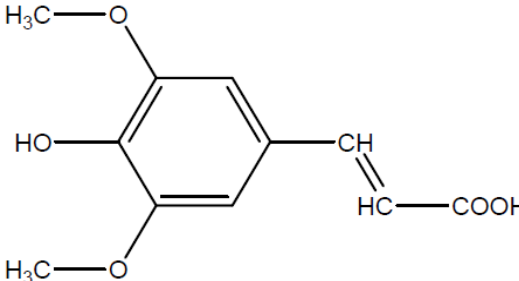
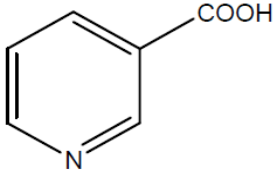
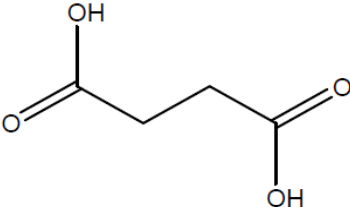
Métodos moleculares, na tentativa de facilitar a identificação das diferentes espécies de *Fusarium* toxigênicos bem como de outras espécies produtoras de micotoxinas, apresentam uma boa especificidade, podendo haver um estudo mais determinante quando aliados a técnicas espectrais modernas, como o *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry* (MALDI-TOF MS), técnica físico-química que se apresenta como uma alternativa rápida e eficiente quanto à identificação de fungos, podendo diferenciar diferentes táxons.

A técnica possui importantes vantagens em relação aos métodos de PCR, como rapidez, simplicidade e requerimento de pequenas quantidades de amostras para manipulação. Entretanto, alguns cuidados são necessários para evitar contaminações e interferências, como sais e etc. (Horká *et al.*, 2012).

O espectrômetro de massas é um instrumento que permite determinar a massa molecular de compostos eletricamente carregados, ou íons previamente formados. As técnicas avançadas em espectrometria de massas diferem principalmente no modo de ionização das amostras, permitindo a análise rotineira,

ao contrário das antigas técnicas de ionização, como EI (*electron ionization*), de proteínas, peptídeos, açúcares etc. Com o surgimento de novas técnicas de ionização, como a ionização por ESI-MS (*Electrospray Ionization Mass Spectrometry*) e a ionização por MALDI, introduzida por Hillenkamp e Karas (1988), a espectrometria de massas se estendeu à quase todos os tipos de moléculas. Ambas são técnicas brandas de ionização, o que resulta na formação de íons com baixa energia, tornando possível a ionização desde moléculas de baixa massa molecular até biomoléculas com massas acima de 1 milhão de Daltons (Marques, 2006).

Na técnica de MALDI-TOF IC (intact cell) MS, a amostra de células intactas contendo a espécie de interesse é misturada com uma matriz (geralmente um ácido orgânico aromático) formando uma “mistura sólida”. O ácido 2,5-di-hidroxi-benzóico (DHB) e α -ciano-4-hidroxi-cinâmico (CHCA) são exemplos de matrizes comumente empregadas na análise de fungos por MALDI-TOF ICMS (Figura 8). Um pulso de laser, com comprimento de onda próximo do UV, incide sobre essa mistura, e a energia do laser é absorvida pela matriz, que tem o máximo de absorção perto do comprimento de onda do laser. Os íons formados através da transferência de carga das moléculas da matriz para o composto que fica na forma de MH^+ , recebem uma alta energia cinética inicial (K), que os impulsiona para o analisador de massas Time-of-flight (TOF), onde são separados de acordo com o tempo de voo, considerando a distância na qual o íon se movimenta até atingir o detector (Hillenkamp *et al.*, 1988; Marques, 2006; Santos e Lima, 2010).

Nome	Código	Comprimento de onda	MM	Estrutura Química
Ácido α -ciano-4-hidroxi-cinâmico	CHCA	UV 337 nm 353 nm	189.1675	
Ácido 2,5-di-hidroxi-benzóico	DHB	UV 337 nm 353 nm	154.1201	
Ácido sinapínico	SA	UV 337 nm 353 nm	224.2100	
Ácido nicotínico	NA	UV 266 nm	123.1094	
Ácido succínico	SCA	IR 2.94 μ m 2.79 μ m	118.0266	

Fonte: Santos e Lima (2010).

Figura 8: Principais matrizes usadas na técnica de MALDI-TOF ICMS.

MALDI-TOF ICMS recentemente ganhou popularidade como uma ferramenta rápida e eficaz para identificação e caracterização de micro-organismos, como fungos, espécies de interesse clínico, além da identificação e monitoramento de micotoxinas em alimentos (Marinach-Patrice *et al.*, 2009; Marques, 2006; Dong *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2009; Santos, *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2011.; Horká *et al.*, 2012; Silva, 2012; Lima-Neto *et al.*, 2013; Passarini *et al.*, 2013).

Para identificação de fungos, a técnica está fundamentada principalmente na análise das proteínas ribossomais. Além destas proteínas, as proteínas constituintes

das paredes do micélio e/ou esporos, no caso dos fungos filamentosos, e das paredes celulares, no caso das leveduras, também são de grande relevância neste processo de identificação. O espectro de massa gerado das proteínas é interpretado como um *fingerprint* celular, onde apenas a presença ou ausência dos picos referentes às proteínas é importante. Em contraste, as intensidades dos picos (concentrações) não são relevantes no processo de identificação. Os espectros obtidos nesta abordagem são comparados com espectros de referências existentes em bases de dados (Santos e Lima, 2010).

Cada vez mais trabalhos de identificação de fungos filamentosos deterioradores e toxigênicos em alimentos vêm sendo realizados usando esta técnica, sendo ainda menor o número de trabalhos voltados à identificação de espécies do gênero *Fusarium*, principalmente quando estas estão ligadas a doenças em plantas, visto que a maior parte dos estudos está direcionada a espécies de interesse clínico.

Seyfarth *et al.* (2008) usaram a análise da sequência de região ITS e MALDI-TOF MS para diagnosticar uma infecção por isolados de *F. proliferatum* em paciente leucêmico, demonstrando que este último método mostrou-se inovador, rápido e eficiente quanto a identificação desta espécie fúngica de ocorrência incomum neste tipo de infecção, enquanto as indicações sorológicas falso-positivas indicaram a presença de *Aspergillus* sp.

De Carolis *et al.* (2012) identificaram espécies de *Aspergillus*, *Fusarium* e *Mucorales* pelo uso da técnica de MALDI-TOF MS. Como resultado, 91 de 94 isolados (96,8%) foram identificados ao nível de espécie, de acordo com os resultados do método morfológico de referência. Três isolados foram identificados ao nível de gênero, concluindo que a técnica é adequada para identificação de rotina de fungos filamentosos.

Marchetti-Deschmann *et al.* (2012), usando a mesma técnica, analisaram os esporos de 22 cepas diferentes de *Fusarium* pertencentes a 6 subespécies, demonstrando que a diferenciação de espécies intimamente relacionadas foi possível, desde que, as análises fossem realizadas sob condições bem definidas e parâmetros fixos, visto que um ponto crítico da análise foi a preparação adequada da amostra de esporos.

Técnicas avançadas de espectrometria de massas como MALDI-TOF MS (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry*) e

ESI-MS (*Electrospray Ionization*), têm sido utilizadas na análise de polímeros sintéticos, complexos organometálicos e compostos orgânicos de interesse ambiental. A maior expansão, no entanto, se deu em bioquímica, biologia molecular, petroquímica e vem crescendo na área de ciências de alimentos (Blechova *et al.*, 2006; Marques, 2006).

Marques (2006) realizou um estudo pioneiro ao aplicar a técnica de ionização por MALDI-TOF na análise de amostras de amendoim e café contaminadas respectivamente por aflatoxinas e ocratoxinas, micotoxinas, de baixo peso molecular, tendo como resultados um excelente desempenho e vantagem com relação ao método ELISA, principalmente devido a maior exatidão em medidas de massas, e, portanto, maior confiabilidade, com perspectiva de melhoria em estudos futuros para adaptação da técnica.

A vantagem da utilização da técnica MALDI-TOF sobre o ESI, além do custo menor, é a possibilidade de execução de 96 análises simultâneas em uma só placa, confirmado a presença de micotoxinas, porém, apresenta dificuldade ao se trabalhar em baixa escala de m/z , devido ao ruído químico muito intenso dos íons da matriz, minimizado pelo uso de um líquido iônico como matriz, que absorve energia na região do UV (Armstrong *et al.*, 2001; Marques, 2006).

Atualmente, a técnica de MALDI-TOF é mais utilizada em análises de moléculas como proteínas e peptídeos, mas artigos mostram que a técnica vem crescendo na detecção de misturas de antibióticos e fármacos e na análise de moléculas de baixo peso molecular, como as micotoxinas, de forma rápida e econômica, com uma preparação de amostra relativamente simples, sendo assim, uma alternativa eficaz para detecção de micotoxinas produzidas por *F. verticillioides* (Lee *et al.*, 2004; Catharino *et al.*, 2005; Sleno e Volmer, 2005; Elostá *et al.*, 2007; Wang, *et al.*, 2012).

Este trabalho é o primeiro a utilizar a técnica de MALDI-TOF na análise de isolados de *F. verticillioides in vitro* quanto à presença de micotoxinas de baixo peso molecular, com destaque para fumonisina B₁ e B₂.

3 METODOLOGIA

3.1 LOCAIS DE TRABALHO

O trabalho foi desenvolvido nos laboratórios de Fitopatologia e de Genética Molecular de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), CETENE (Centro de tecnologias estratégicas do Nordeste) e nos laboratórios da Micoteca da Universidade do Minho (MUM) (Braga, Portugal).

3.2 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE *FUSARIUM VERTICILLIOIDES* EM GRÃOS DE MILHO

3.2.1 OBTENÇÃO DOS ISOLADOS DE *FUSARIUM* SPP.

Os isolados de *Fusarium* spp. foram provenientes de espigas de milho oriundas das mesoregiões do São Francisco, Sertão e Zona da Mata de Pernambuco, fornecidas pelas estações Experimentais do IPA destas regiões e por produtores locais (Tabela 1), durante os meses de Julho e Agosto de 2010 (Tabela 2). As espigas foram acondicionadas em sacos plásticos, devidamente rotulados, e armazenadas a -4 °C para posterior análise micológica.

Tabela 1: Área de coleta de espigas de milho no Estado de Pernambuco

Mesoregião	Municípios/Local de coleta
São Francisco	Belém do São Francisco
	Belém do São Francisco (BSF-Catingueiro)
	Belém do São Francisco (Catingueiro)
	Petrolina (Pedrinhas- Catingueiro)
Sertão	Araripina BRS 5036 1
	Araripina BRS 5036 1 CMS 36
	Araripina XB 8030
	Araripina BRS 5036
Zona da Mata	Goiana (Itapirema)

Tabela 2: Características climáticas da área de coleta nas mesoregiões de São Francisco, Sertão e Zona da Mata, Pernambuco, durante os meses de Julho e Agosto de 2010.

Mesoregião	Municípios	Período de coleta	Densidade Pluviométrica (mm)	Temperatura (°C)	
				Máxima	Mínima
São Francisco	Belém do São Francisco	Estiagem	0,0	29,0	18,0
	Petrolina	Estiagem	0,5	30,5	19,9
Sertão	Araripina	Estiagem	0,0	27,0	15,0
Zona da Mata	Goiana	Estiagem	0,0	30,5	23,0

Fonte: Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA); Sistema de Monitoramento Agrometeorológico (Agritempo).

Foram analisados 200 grãos de milho retirados de diferentes espigas colhidas diretamente do campo, de cada amostra oriunda de cada uma das regiões de estudo (amostra composta).

Os grãos foram desinfestados superficialmente em solução de álcool etílico 70% durante 30 segundos, solução de hipoclorito de sódio a 1,5% por 5 minutos e três lavagens em água destilada estéril por 30 segundos cada, e em seguida, secos em papel filtro esterilizado. O isolamento dos fungos foi realizado através do método de papel filtro com congelamento (BRASIL, 1992; Lucca Filho, 1987). Os grãos infectados foram transferidos para placas de Petri sobre três folhas de papel filtro previamente umedecidas em água destilada e incubados em câmara de germinação a uma temperatura de 20 ± 2 °C por 24 horas sobre luz branca fluorescente e regime de 12 horas de luz/12 horas de escuro. Em seguida os grãos foram colocados em congelador a -18°C por mais 24 horas para impedir a germinação do embrião. Após o tratamento térmico, as amostras foram colocadas novamente em câmara de germinação por mais 5 dias sob as mesmas condições. Em seguida, os grãos foram analisados individualmente em microscópio de luz. Os isolados foram identificados inicialmente com base em suas características morfológicas: coloração do micélio (branca ou rosada) e formato dos micro e macroconídios.

3.2.2 ISOLAMENTO DE *FUSARIUM VERTICILLIOIDES*

Isolados indicativos de *F. verticillioides* foram obtidos dos grãos de milho através da transferência de colônias fúngicas para os meios Dicloran-àgar-base (Hocking e Pitt, 1980) e Batata-Dextrose-Ágar (BDA) suplementado com o antibiótico cloranfenicol (100 mgL⁻¹) e incubados à temperatura ambiente (25±2°C) por aproximadamente 5 a 7 dias. Para observações microscópicas, os isolados foram transferidos para placas de Petri contendo meio Spezieller Nahrstoffarmer àgar (SNA) (Nirenberg, 1976).

Após este período, culturas monospóricas foram obtidas e os isolados foram identificados por microscopia óptica com base nas características macroscópicas como coloração do micélio, reverso e diâmetro da colônia e microscópicas, como presença de microconídios em cadeia, forma e tamanho dos micro e macroconídios, dos conidióforos e das fiálides, segundo Booth (1977) e Leslie e Summerell (2006).

3.3 OBTENÇÃO DO MICÉLIO PARA EXTRAÇÃO DO DNA

Os isolados purificados em tubos de ensaio contendo meio BDA foram transferidos para placas de Petri contendo o mesmo meio, e em seguida incubadas à temperatura ambiente (25±2°C) por 7 dias para o crescimento micelial.

3.4 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

A extração de DNA genômico a partir do micélio dos isolados de *F. verticillioides* e um isolado de *Penicillium glabrum* (controle negativo), foi realizada conforme a técnica descrita por Malosso *et al.* (2006) modificada. O método de extração direta foi baseado em *bead-beating* na velocidade de agitação de 5,0m/s, durante 60 segundos, em microtubo contendo 700µl de tampão CTAB a 2%, pH 8,0 (previamente aquecido a 65°C) e 65mg do micélio. Em seguida, o microtubo contendo o micélio triturado foi incubado a 65°C por 45 minutos e centrifugado a 12.000 rpm, por 10 minutos, a 24°C. O sobrenadante foi recuperado e transferido para outro microtubo ao qual foi adicionado 650 µl de clorofórmio e álcool isoamílico (24:1) seguido de centrifugação a 12.000 rpm.

A fase aquosa recuperada foi transferida para outro microtubo ao qual foi acrescido de isopropanol absoluto, à temperatura de -20°C, na mesma proporção do volume recuperado. Foi então incubado em -20°C, por 60 minutos, para precipitação dos ácidos nucleicos. Em seguida, foi procedida a centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos, em 24°C, para formação e fixação do sedimento, descartando o sobrenadante.

Para a lavagem do sedimento, foi adicionado 1.000µl (1ml) de etanol 70% ao microtubo e centrifugado a 12.000 rpm, por 5 minutos, em 24°C. Novamente foi procedido o descarte do sobrenadante e incubado em estufa a 37 °C para completa evaporação do álcool. Após este período, foram adicionados 50µl de tampão Tris-EDTA (pH 8,0) ao sedimento para ressuspensão espontânea do DNA, a 4°C por 24 horas sendo preservado sob refrigeração a - 20°C.

3.5 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE *FUSARIUM VERTICILLIOIDES*

As reações de amplificação para identificação da espécie foram efetuadas para um volume final de 25 µL conforme Maheshwar *et al.* (2009), contendo: 25ng de DNA, 1 µL de cada *primer* (20 pmol), 0.5 µL de Taq DNA polymerase (3U/µL), 2.5 µL de 10X Tampão PCR buffer, 2.5 µL de MgCl₂ e 1 µL de 2 mM dNTPs. Os *primers* utilizados foram VERT-1 (5'-GTCAGAATCCATGCCAGAACG-3') e VERT-2 (5'-CACCCGCAAATCCATCAG-3') segundo Patino *et al.* (2006). Para o protocolo de amplificação foi utilizado o termociclador Techne TC-512 com a seguinte programação: 94 °C por 1 minuto para desnaturação inicial, seguido de 35 ciclos de desnaturação por 1 minuto a 94 °C, anelamento a 60 °C por 1 minuto e uma extensão final de 72 °C por 5 minutos. Os produtos amplificados e o DNA *ladder* de 1Kb plus (Invitrogen Life Technologies) foram corados com *GelRed*TM, separados por eletroforese em gel de agarose 1,0 %, a 4V.cm⁻¹ em tampão de corrida TBE 1X (pH 8,0).

3.6 DETECÇÃO DA PRESENÇA DO GENE *FUM1* EM ISOLADOS DE *F.*

VERTICILLIOIDES

As reações de amplificação para detecção da presença do gene *FUM1* foram efetuadas para um volume final de 25 µL segundo Maheshwar *et al.* (2009), contendo: 25ng de DNA, 1 µL de cada *primer* (20 pmol), 0.5 µL de Taq DNA polymerase (3U/µL), 2.5 µL de 10X Tampão PCR buffer, 2.5 µL de MgCl₂ e 1 µL de 2 mM dNTPs. Os *primers* utilizados foram VERTF-1 (5' - GCGGGAATTCAAAAGTGGCC - 3') e VERTF-2 (5' - GAGGGCGCGAAACGGATCGG - 3'), segundo Patino *et al.* (2006). Para o protocolo de amplificação foi utilizado o termociclador Techne TC-512 com a seguinte programação: 94 °C por 1 minuto para desnaturação inicial, seguido de 35 ciclos de desnaturação por 1 minuto a 94 °C, anelamento a 60 °C por 1 minuto e uma extensão final de 72 °C por 5 minutos. Os produtos amplificados e o DNA *ladder* de 1Kb plus (Invitrogen Life Technologies) foram corados com *GelRed*TM, separados por eletroforese em gel de agarose 1,0 %, a 4V.cm⁻¹ em tampão de corrida TBE 1X (pH 8,0).

3.7 ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA DOS ISOLADOS DE *F.*

VERTICILLIOIDES

As reações de PCR para análise da variabilidade genética dos isolados de *F. verticillioides* foram realizadas utilizando os *primers* de ISSR (GTG)₅, segundo Lieckfeldt *et al.* (1993) e (GACA)₄, conforme Meyer e Mitchel (1995). As reações de amplificação foram feitas com volume final de 25µL nas seguintes condições: Tampão (Tris– HCl 20mM pH 8,4; KCl 50mM), MgCl₂ 0,75mM, dNTP 0,25mM, 0,25mM do *primer*, 0,4U de Taq DNA polimerase (Operon Technologies CA) e 25 ng de DNA alvo. As reações de amplificação foram realizadas utilizando o termociclador Techne TC-512 com a seguinte programação: uma etapa de desnaturação inicial a 93 °C por 5 minutos, 40 ciclos de 20 segundos a 93 °C, 45 segundos a 55 °C e 90 segundos a 72 °C, seguidos por uma extensão final de 6 minutos a 72 °C. Os produtos amplificados e o DNA *ladder* de 1Kb plus (Invitrogen Life Technologies)

foram corados com *GelRed*TM, separados por eletroforese em gel de agarose 1,0 %, a 4V.cm⁻¹ em tampão de corrida TBE 1X (pH 8,0).

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA NTSYS-PC

Os dados obtidos das amplificações com os *primers* (GTG)₅, (GACA)₄ foram analisados pelo programa *Numerical Taxonomy System of Multivariaty Programs* – NTSYS-PC (Rohlf, 1988; Bussab *et al.*, 1990). Os dados foram introduzidos na forma de variáveis binárias, ou seja, o número 1 (um) significando presença de banda, e o número 0 (zero), ausência. Desta forma, construiu-se uma matriz de similaridade, utilizando o coeficiente de Jaccard (J) (Jaccard, 1908). A partir da construção da matriz de similaridade foi gerado um dendrograma pelo método de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair Group Method With Arithmetical Average*).

3.9 ANÁLISE POR MALDI-TOF ICMS

Os isolados purificados de *F. verticillioides* foram incubados no escuro em câmara incubadora durante 48 horas a 25°C, em placas de Petri de 6 centímetros de diâmetro contendo 5mL de meio BDA. *Escherichia coli* DH5 α obtida da MUM foi utilizada como padrão para a calibração externa do MALDI-TOF MS. As células da *Escherichia coli* DH5 α foram cultivadas em meio Luria Bertani Agar (triptona 10g/L, extrato de levedura 5 g/L, NaCl 10 g/L) a 37°C durante 20 horas (Rodrigues *et al.*, 2011). Cerca de 1 μ g de esporos e micélio jovem de cada cultura foi transferida diretamente para a placa de 48 poços de MALDI-TOF MS. Simultaneamente, 0,5 μ L da solução de matriz (75mg/mL de ácido 2,5- dihidroxibenzóico -DHB- em etanol/água/acetonitrila (1:1:1) com 0,03% ácido trifluoracético) foi adicionada às amostras e homogeneizadas suavemente. As misturas foram secas a temperatura ambiente. Para garantia de reprodutibilidade, cada amostra foi feita em duplicata. Durante a análise, todas as soluções foram preparadas e armazenadas a 5°C de acordo com Rodrigues *et al.* (2011).

As análises foram realizadas em um sistema Axima LNR (Kratos Analytical, Shimadzu, UK) equipado com um laser de nitrogênio (337nm), em que a intensidade

do laser foi fixada imediatamente acima do limiar para a produção de íons. Doze proteínas ribossomais conhecidas de *E. coli* DH5 α (4.365,4; 5.096,8; 5.381,4; 6.241,4; 6.255,4; 6.316,2; 6.411,6; 6.856,1; 7.158,8; 7.274,5; 7.872,1; 9.742 e 12.227,3 Da) foram utilizadas como calibrantes externos. Os espectros de massa com base na gama de massas 2-20 kDa foram registrados utilizando o modo linear, como um atraso de 104 ns e uma voltagem de aceleração de 20kV. Os espectros finais foram gerados somando 20 disparos do laser acumulados por perfil e 50 perfis produzidos por amostra, o que levou a 1000 disparos de laser por espectros somados.

As listas de picos resultantes foram exportadas para o programa SARAMISTM (Spectral Archiving and Microbial Identification System, Anagnostec, Germany, www.anagnostec.eu), onde a identificação microbiana final foi alcançada. No SARAMISTM as listas de picos das amostras individuais foram comparadas no banco de dados gerando uma lista ordenada de espectros correspondentes. O SARAMISTM utiliza um sistema de pontos baseado em lista de picos com sinais de massa ponderados de acordo com a sua especificidade. A semelhança entre os espectros individuais é expressa como o número absoluto ou relativo de combinar sinais de massa e depois de submeter os dados para um único algoritmo de agrupamento aglomerativo. Identificações microbianas através do SARAMISTM são baseadas na presença ou ausência de cada pico no espectro. Um dendrograma baseado na análise proteômica das linhagens foi criado através do SARAMISTM.

3.10 DETECÇÃO DE FUMONISINAS B1 E B2 POR MALDI-TOF MS

Os isolados de *F. verticillioides* foram preparados segundo metodologia descrita por Ono *et al.* (2010) modificada. Cada amostra de crude (extrato) (0,5 μ L), separada previamente para as análises por espectrometria de massas, foi aplicada na placa de MALDI-TOF (Flexi-MassTM, ShimadzuBiotech, UK). Em seguida, 0,5 μ L da solução matriz do ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA, Fluka, Buchs, Suíça, CHCA saturado em 33% de etanol, 33% acetonitrila, 31% de água e 3% de ácido trifluoro-acético) foi adicionado sobre cada amostra e misturada suavemente com a

ponteira de micropipeta. A placa foi mantida a 25°C (+- 2,0°C) até a evaporação da fase líquida. Todas as amostras foram analisadas em triplicata.

De acordo com o método analítico desenvolvido neste trabalho, a calibração externa do equipamento foi realizada utilizando-se uma mistura de padrões de peptídeos (Peptide Calibration Standard II, Bruker Daltonics) em matriz de ácido α -ciano-3-hidróxi cinâmico (CHCA), de acordo com as instruções do fornecedor. Os espectros foram gerados em espectrômetro de massa MALDI-TOF, modelo Autoflex III (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA), equipado com laser Nd:YAG que opera a 355nm. Os espectros foram adquiridos em modo refletido positivo, com uma voltagem de aceleração de 19 kV, em faixa de massas de 500-4480 (m/z).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 OBTENÇÃO DE ISOLADOS DE *FUSARIUM VERTICILLIOIDES*

Foram obtidos para este estudo sessenta isolados de *Fusarium verticillioides* oriundos dos grãos de milho coletados em três mesoregiões de Pernambuco (Tabela 3). Todos os isolados fúngicos analisados apresentavam características macroscópicas (Figura 9) e microscópicas típicas da espécie (Figura 10), como descrito segundo Booth (1977) e Leslie e Summerell (2006).

Tabela 3: *Fusarium verticillioides* isolados de grãos de milho procedentes de diferentes localidades do Estado de Pernambuco.

Nº de Isolados	Mesoregião	Localidade
53 a 60	São Francisco	Belém do São Francisco Belém do São Francisco (BSF-Catingueiro) Belém do São Francisco (Catingueiro)
18		Petrolina (Pedrinhas-Catingueiro)
31 a 39 40 a 45 19 a 30 46 a 52	Sertão	Araripina BRS 5036-1 Araripina BRS 5036 1 CMS 36 Araripina XB 8030 Araripina BRS 5036
1 a 17	Zona da Mata	Goiana (Itapirema)

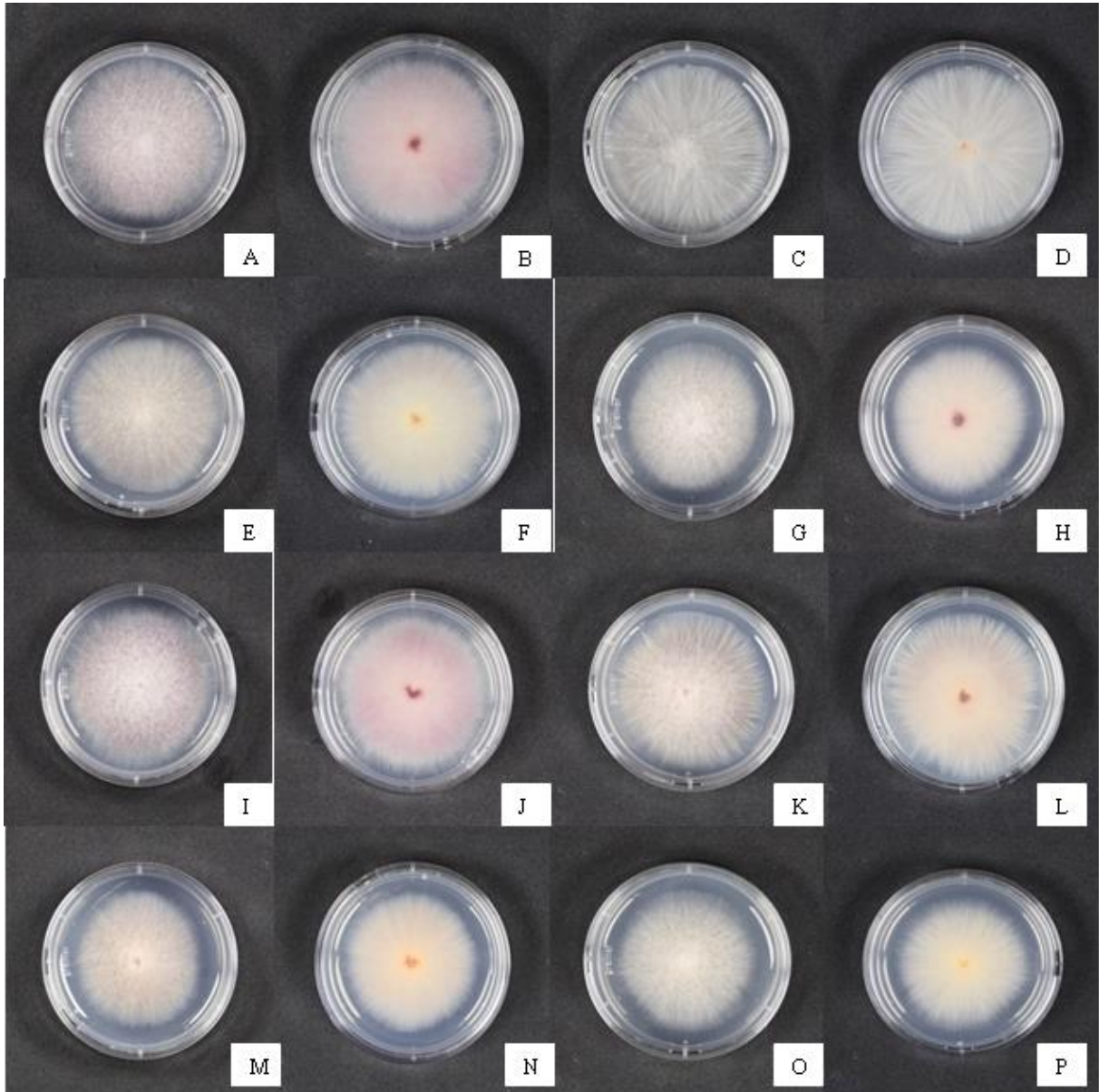


Figura 9: Ilustração de algumas culturas de *Fusarium verticillioides*. Culturas incubadas durante 4 dias no escuro, a 25°C em meio de cultura Batata-dextrose-água (BDA). (A) e (B) Verso e reverso, respectivamente, do isolado n° 10; (C) e (D) Verso e reverso, respectivamente, do isolado n° 59; (E) e (F) Verso e reverso, respectivamente, do isolado n° 28; (G) e (H) Verso e reverso, respectivamente, do isolado n° 18; (I) e (J) Verso e reverso, respectivamente, do isolado n° 15; (K) e (L) Verso e reverso, respectivamente, do isolado n° 54; (M) e (N) Verso e reverso, respectivamente, do isolado n° 36; (O) e (P) Verso e reverso, respectivamente, do isolado n° 45.

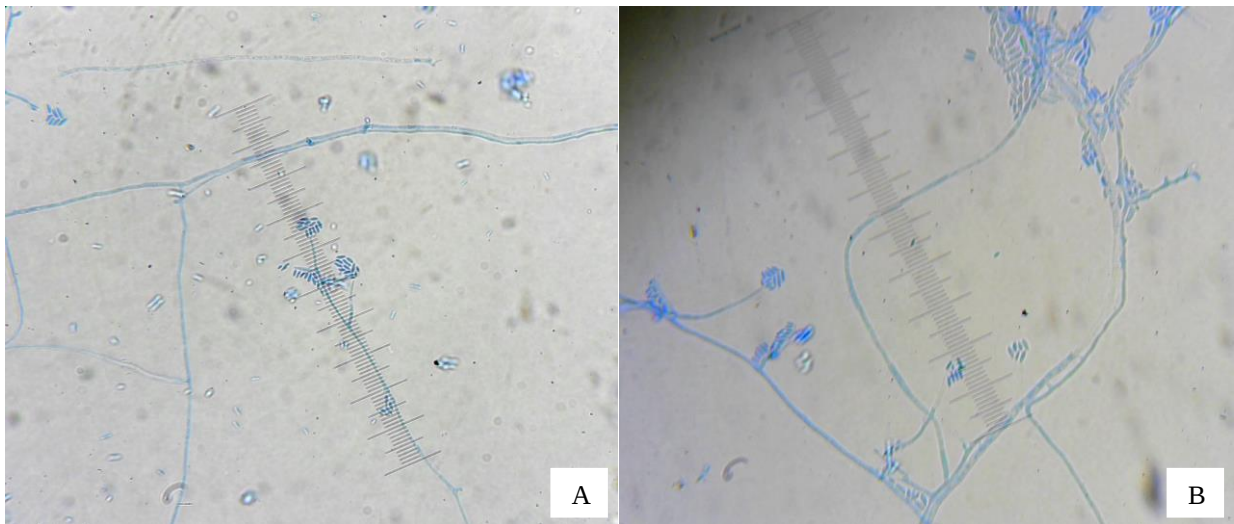


Figura 10: Microconídios (A) e macroconídios (B) de *F. verticillioides*.

4.2 IDENTIFICAÇÃO DE *FUSARIUM VERTICILLOIDES*

Todos os sessenta isolados, identificados morfologicamente como *F. verticillioides*, foram submetidos a PCR para confirmação molecular da espécie pelo uso dos *primers* VERT-1 e VERT-2, e apresentaram o produto amplificado de aproximadamente 800pb previsto (Figura 11). O mesmo produto amplificado não foi evidenciado em *Penicillium glabrum* (controle negativo).

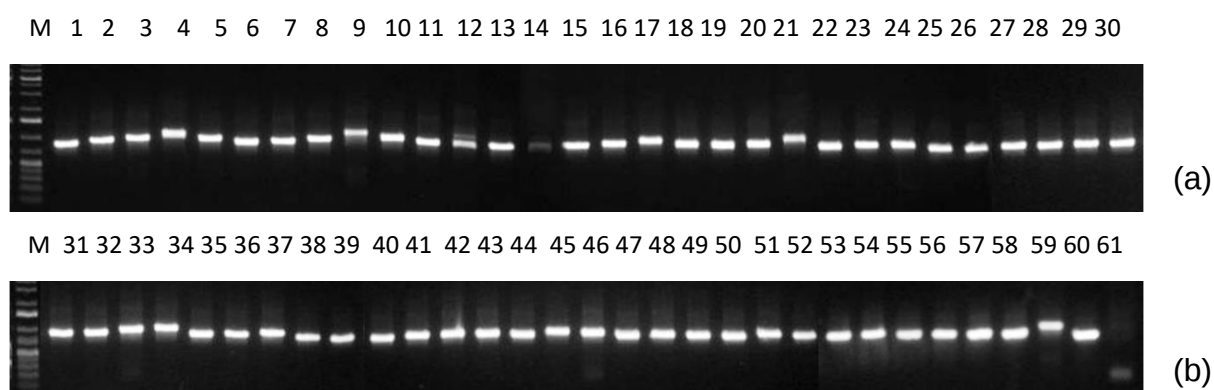


Figura 11 (a) e (b): Perfis de amplificação de 60 isolados de *F. verticillioides* obtidos com os *primers* VERT-1 e VERT-2. Pista M: marcador de peso molecular 1Kb plus; pistas 1-17: isolados de *F. verticillioides* da Zona da Mata, Goiana (Itapirema); Pista 18: isolado de *F. verticillioides* do São Francisco, Petrolina (Pedrinhas- Catingueiro); Pistas 19-30: isolados de *F. verticillioides* do Sertão, Araripina XB 8030; Pistas 31-39: isolados de *F. verticillioides* do Sertão, Araripina BRF 5036-1; Pistas 40-45: isolados de *F. verticillioides* do Sertão, Araripina BRF 50361 CMS 36; Pistas 46-52: isolados de *F. verticillioides* do Sertão, Araripina BRF 5036; Pistas 53-60: isolados de *F. verticillioides* do São Francisco, Belém de São Francisco; Pista 61: *Penicillium glabrum*.

Os resultados mostraram a eficiência do uso dos *primers* espécie-específicos VERT-1 e VERT-2 baseados na sequência IGS para confirmação da identidade dos isolados de *F. verticillioides*, identificados primariamente pela metodologia clássica.

Os métodos fenotípicos algumas vezes não permitem a correta identificação das espécies deste gênero, devido a variação morfológica decorrente da variabilidade genética. Pelas limitações na identificação morfológica dentro do gênero *Fusarium*, uma vez que algumas espécies dos gêneros *Cylindrocarpon*, *Acremonium* também produzem conídios multicelulares fusiformes semelhantes aos produzidos por espécies de *Fusarium*, os métodos moleculares podem auxiliar na confirmação taxonômica deste gênero (Godoy, 2004; Martins, 2005).

Diversas técnicas têm sido utilizadas para caracterizar diferentes espécies de *Fusarium*, como iniciadores de PCR espécie-específicos. Em busca de uma

detecção precoce de *F. verticillioides* e na tentativa de impedir a entrada de fumonisinas na cadeia alimentar, González-Jáen *et al.* (2004) relatam a importância e a utilidade do uso do mesmo par de *primers* espécie-específicos deste estudo para identificação de *F. verticillioides*.

Dissanayake *et al.* (2009) também utilizaram os *primers* espécie-específicos VERT-1 e VERT-2 e diferenciaram espécies de *F. verticillioides* e *F. proliferatum* provenientes de sementes e plantas de *Allium fistulosum* no Japão, sendo esta última identificada pelos *primers* PRO1 (5'-CTTTCCGCCAAGTTTCTTC- 3') e PRO2 (5'-TGTCAGTAACTCGACGTTGTTG- 3').

Goertz *et al.* (2010) identificaram espécies de *Fusarium* em milho híbrido comercial na Alemanha. *F. verticillioides*, *F. graminearum* e *F. proliferatum* foram as espécies predominantes durante a coleta realizado no ano de 2006, enquanto as espécies predominantes durante o ano de 2007 foram *F. graminearum*, *F. cerealis* e *F. subglutinans*, identificadas por *primers* específicos, inclusive os *primers* VERT-1 e VERT-2 para *F. verticillioides*.

Nayaka *et al.* (2010) confirmaram a taxonomia de 35 isolados de *F. verticillioides* obtidos de milho cultivado no Sul da Índia pelo uso do mesmo par de *primers* utilizado neste estudo, observando um fragmento de 800 pb para esta espécie, ao contrário do fragmento obtido para outras espécies de *Fusarium* analisadas.

Magculia e Cumagun (2011) analisaram a diversidade genética e o potencial de produção de fumonisina em isolados de *F. verticillioides* responsáveis por infecções no milho nas Filipinas usando técnicas moleculares. Quarenta e nove dos 54 isolados foram identificados como *F. verticillioides* pelo uso dos *primers* VERT-1 e VERT-2.

Pelizza *et al.* (2011) em estudo onde relatam a primeira ocorrência de *F. verticillioides* como fungo entomopatogênico do gafanhoto *Tropidacris collaris* (Stoll), praga cada vez mais recorrente e generalizada em áreas cada vez mais extensas na província do Norte da Argentina, também utilizaram os *primers* VERT-1 e VERT-2 para identificação molecular desta espécie, sugerindo assim, estudos futuros para o uso de *F. verticillioides* como agente controlador da praga.

Apesar de exemplos de sucesso, ainda há resultados conflitantes sobre o uso destes *primers*. Outras técnicas, como sequenciamento de regiões de interesse no DNA, têm sido utilizadas, porém o consumo de tempo é muito maior.

Visentin *et al.* (2009) analisaram 100 isolados de *Fusarium*, descritos como *F. proliferatum* e *F. verticillioides*, obtidos de grãos de milho infectados no Noroeste da Itália pelo uso de marcadores moleculares espécie-específicos, presença ou ausência de polifálides, amplificação da região ITS, sequenciamento da calmodulina e perfil AFLP. O uso dos *primers* VERT-1 e VERT-2 predominantemente diferenciou as espécies supracitadas, mas alguns isolados de *F. proliferatum*, confirmado pelo uso de outras técnicas utilizadas no mesmo estudo, foram identificados erroneamente por este par de *primers*.

Outros pares de *primers* também são utilizados para identificar isolados de *F. verticillioides*. Sampietro *et al.* (2010) utilizaram *primers* baseados na sequência IGS para identificação de espécies de *Fusarium*, sendo os *primers* Fps-F (5' - CGCACGTATAGATGGACAAG - 3') e VERT-2 (5' - CACCCGCAGCAATCCATCAG - 3') os *primers* utilizados para identificação molecular de *F. verticillioides*, segundo Jurado *et al.* (2006 a,b)

Sreenivasa *et al.* (2010) isolaram e identificaram amostras de *F. verticillioides* de grãos de milho na Índia utilizando um novo conjunto de *primers*, VERT-R (5'-CGA CTC ACG GCC AGG AAA CC - 3') combinado com um *primer* já projetado VERTF-1 (5'-GCG GGA ATT CAA AAG TGG CC - 3'), de modo que, das 103 espécies de *Fusarium* analisadas, 83 apresentaram resultado positivo para *F. verticillioides*.

Faria *et al.* (2012) usaram novos ensaios de PCR para identificação de *F. verticillioides*, *F. subglutinans* e outras espécies do complexo *Gibberella fujikuroi*. Os *primers* desenhados revelaram isolados de *F. verticillioides* e *F. subglutinans*, obtidos de sementes de milho de diferentes regiões do Brasil, mas não outras espécies de *Fusarium* ou outros gêneros de fungos obtidos de coleções de culturas ou a partir de sementes de milho.

Lenart *et al.* (2013) utilizaram *primers* espécie-específicos para identificar isolados de *Fusarium* spp. (*F. poae*, *F. oxysporum*, *F. graminearum*, *F. sporotrichioides*, *F. culmorum*, *F. proliferatum* e *F. verticillioides*) provenientes de culturas de milho do Sul da Polônia, tendo sido os *primers* VER-1 (5' – CTCCTGCGATGTTTCTCC – 3') e VER-2 (5' – AATTGGCCATTGGTATTATATATCTA – 3'), conforme Mulé *et al.* (2004), utilizados para identificação de *F. verticillioides*.

A identificação de fungos potencialmente micotoxigênicos, provenientes de culturas vegetais de importância econômica, pelo uso de marcadores moleculares espécie-específicos, auxilia na confirmação dos resultados taxonômicos com rapidez e eficiência, sendo em muitos casos, a única alternativa de identificação (Godoy, 2004).

4.3 DETECÇÃO DA PRESENÇA DO GENE *FUM1* EM ISOLADOS DE *F. VERTICILLIOIDES*

Todos os sessenta isolados de *F. verticillioides* submetidos a PCR para detecção do gene *FUM1* usando os *primers* VERTF-1 e VERTF-2 para a fumonisina, mostraram-se positivos quanto à presença do gene, gerando fragmentos de aproximadamente 500pb previsto para confirmação (Figura 12). Não houve amplificação para o isolado de *Penicillium glabrum*, utilizado como controle.

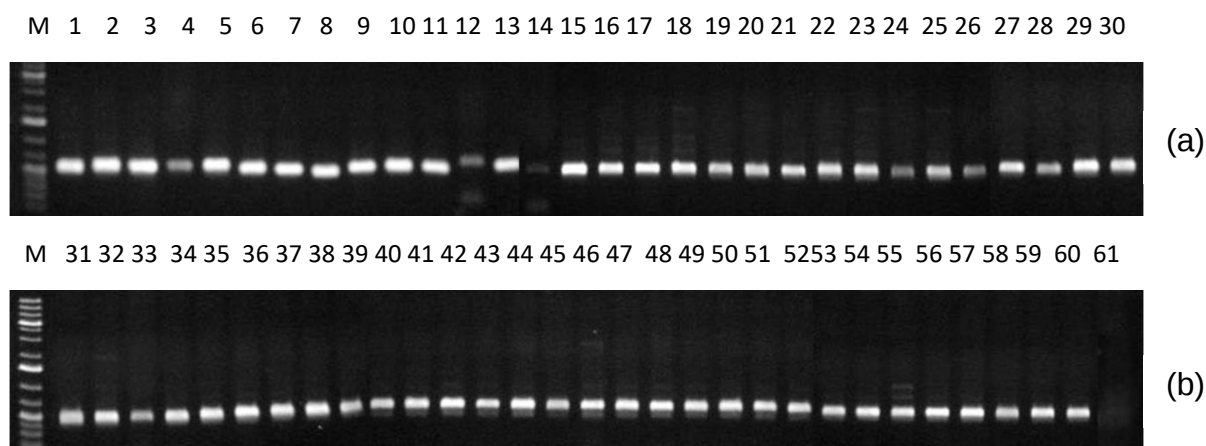


Figura 12 (a) e (b): Amplificação do gene *FUM1* em 60 isolados de *F. verticillioides* obtida com os *primers* VERTF-1 e VERTF-2. Pista M: marcador de peso molecular 1Kb plus; pistas 1-17: isolados de *F. verticillioides* da Zona da Mata, Goiana (Itapirema); Pista 18: isolado de *F. verticillioides* do São Francisco, Petrolina (Pedrinhas- Catingueiro); Pistas 19-30: isolados de *F. verticillioides* do Sertão, Araripina XB 8030; Pistas 31-39: isolados de *F. verticillioides* do Sertão, Araripina BRF 5036-1; Pistas 40-45: isolados de *F. verticillioides* do Sertão, Araripina BRF 50361 CMS 36; Pistas 46-52: isolados de *F. verticillioides* do Sertão, Araripina BRF 5036; Pistas 53-60: isolados de *F. verticillioides* do São Francisco, Belém de São Francisco; Pista 61: *Penicillium glabrum*.

Vários autores relatam que nem todos os isolados de *F. verticillioides* produzem fumonisina (Sánchez-Rangel *et al.*, 2005; Maheshwar *et al.*, 2009), e a maioria dos isolados que são capazes de produzir fumonisina apresentam o gene *FUM1*.

Sánchez-Rangel *et al.* (2005) reportaram a correlação entre a produção de fumonisina e a presença do gene *FUM1* através do uso deste *primer* específico, para 34 linhagens de *F. verticillioides* isolados de culturas de milho no México, de modo que a maioria dos isolados com capacidade de produzir fumonisina apresentava este gene.

Silva *et al.* (2007) analisaram 27 isolados de *F. verticillioides* oriundos de milho e sorgo do Brasil quanto a presença do gene *FUM1*, e seis destes exibiram amplificação do gene.

A presença do gene *FUM1* entre os isolados fitopatogênicos foi observada em diversos estudos, como os de Maheshwar *et al.* (2009), que usaram os mesmos pares de *primers* deste estudo para análise de isolados de *F. verticillioides* na Índia.

Nayaka *et al.* (2010) detectaram isolados de *F. verticillioides* toxigênicos via PCR pelo uso dos *primers* VERTF-1 e VERTF-2. Vinte e três isolados dos trinta e cinco analisados apresentaram amplificação do gene *FUM1*, assim como todos os isolados deste estudo, sendo a capacidade produtora de fumonisina confirmada posteriormente pelo uso de técnicas como HPLC e CD-ELISA.

Karthikeyan *et al.* (2011) submeteram 82 isolados de espécies de *Fusarium* coletadas de amostras de arroz infectadas a um ensaio de PCR para determinar cepas produtoras de fumonisinas e não produtoras utilizando os mesmos *primers* VERTF-1 e VERTF-2 usados neste estudo, identificando 21 isolados de *F. verticillioides* que apresentaram amplificação para o gene *FUM1* e 25 isolados que não apresentaram amplificação para o mesmo gene.

Outros pares de *primers* vêm sendo utilizados para detecção da presença do gene *FUM1* em espécies de *Fusarium*, e assim, caracterizando seu potencial toxigênico.

Anukul *et al.* (2013) analisaram a produção de fumonisina e toxina T-2 por espécies de *Fusarium*, predominantemente *F. verticillioides*, isoladas de alimentos para camarão e matérias primas agrícolas para cultivo de camarão na Tailândia. Foram utilizados os *primers* *FUM1* (5' - 'GGCCATGACTTTGCCATTTCC - 3') e reverso (5' – GATGGCATTGATTGCCTCGC - 3') para determinação da produção da fumonisina por isolados de *Fusarium* spp. Todos, exceto quatro dos 40 isolados fúngicos, produtores de fumonisina apresentaram o gene *FUM1*. As espécies de *Fusarium* que não sintetizaram toxina T-2 não continham o gene Tri-5. Deste modo, o estudo fez um alerta à contaminação por micotoxinas na cadeia de alimentos

destinados à fabricação de ração animal e ao uso de matérias primas contaminadas no cultivo de camarão.

Vinte e sete isolados de *Fusarium* spp. provenientes de amostras de sementes de sorgo, foram diferenciadas quanto a sua capacidade de produção de fumonisinas através da elaboração de um *primer* para o gene *FUM21* juntamente com *primers* já estabelecidos para os genes *FUM1* e *FUM8*, em estudo realizado por Divakara *et al.* (2013). Entre os 27 isolados de *Fusarium* spp. investigados, apenas nove isolados de *F. verticillioides* apresentaram todos os três genes testados. Os restantes dos 14 isolados de *F. thapsina* e os quatro isolados de *F. incarnatum-equiseti*, do complexo *F. cf. incarnatum*, não mostraram amplificação para os genes testados.

Madania *et al.* (2013) identificaram 32 isolados de *Fusarium* spp. oriundos de quatro diferentes regiões geográficas na Síria. A maioria destes isolados (26 dos 32 isolados) foi identificada como *F. verticillioides*, sendo apenas estes potencialmente produtores de fumonisina, demonstrado a partir da amplificação do gene *FUM1* pelo uso dos pares de *primers* Fum-1 (5' – GTCCTACGCGATACATCCCACCACAAT – 3') e Fum-2 (5' – GATCAAGCTCGGGGCCGTCGTTTCATAG – 3').

Zhang *et al.* (2013) analisaram o potencial de produção de fumonisinas em espécies do gênero *Fusarium* isoladas de produtos derivados de milho na China. Dos 22 isolados de *Fusarium* spp., 19 eram potenciais produtores de fumonisina, sendo 16 destes *F. verticillioides*, dois *F. subglutinans* e um isolado de *F. proliferatum*, e apresentaram amplificação dos genes *FUM1* e *FUM8* demonstrado pelo uso dos pares de *primers* Fum1-2L (5'-GCAACTCACCTTACTCGCTATTC-3')/ Fum1/2R (5'-TGTTTCAGAGGGGTCTTTGGTTA-3') e Fum8-3N (5'-CACTGCATATGACTACCTCTTGGGAGGA-3')/ Fum8-4E (5'-CTCGAATTCGGACATGTCCCTCGCGATAA -3'), respectivamente.

No presente estudo a presença do gene *FUM1*, detectada pelo uso dos *primers* VERTF-1 e VERTF-2, foi detectada em todos os isolados de *F. verticillioides* analisados, confirmando o potencial micotoxigênico dos mesmos.

4.4 ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA DOS ISOLADOS DE *F.*

VERTICILLIOIDES

Os perfis de amplificação das regiões ISSR, utilizando o *primer* (GTG)₅ em sessenta isolados de *F. verticillioides* estão ilustrados na Figura 13. Foram obtidos padrões de um a seis fragmentos, com peso molecular variando em torno de 300 a 1500 pares de bases.

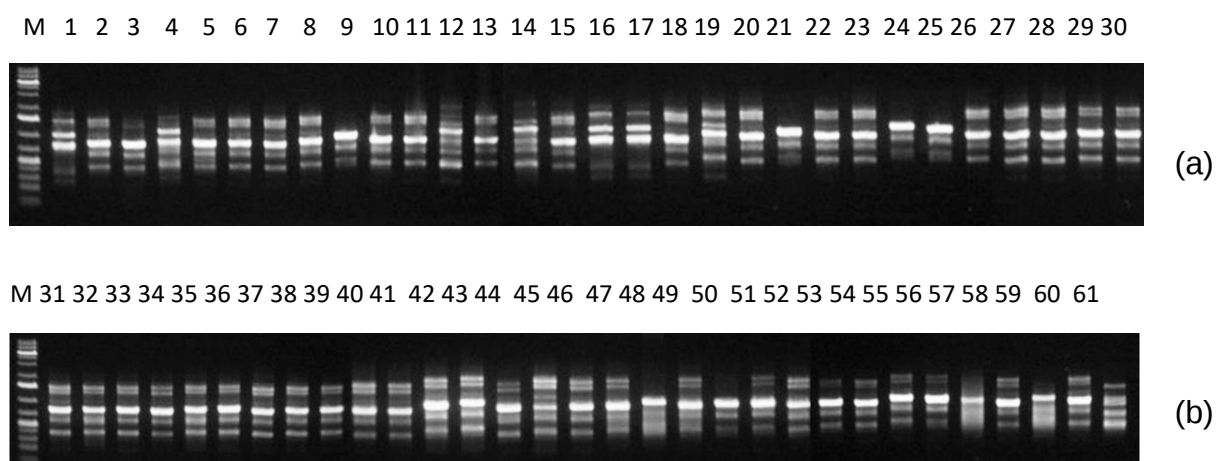


Figura 13 (a) e (b): Perfis de amplificação de ISSR obtidos com o *primer* (GTG)₅. Pista M: marcador de peso molecular 1Kb plus; pistas 1-17: isolados de *F. verticillioides* da Zona da Mata, Goiana (Itapirema); Pista 18: isolado de *F. verticillioides* do São Francisco, Petrolina (Pedrinhas- Catingueiro); Pistas 19-30: isolados de *F. verticillioides* do Sertão, Araripina XB 8030; Pistas 31-39: isolados de *F. verticillioides* do Sertão, Araripina BRF 5036-1; Pistas 40-45: isolados de *F. verticillioides* do Sertão, Araripina BRF 50361 CMS 36; Pistas 46-52: isolados de *F. verticillioides* do Sertão, Araripina BRF 5036; Pistas 53-60: isolados de *F. verticillioides* do São Francisco, Belém de São Francisco; Pista 61: *Penicillium glabrum*.

O marcador evidenciou a formação de 5 grupos distintos com 100% de similaridade de tamanho de fragmento, distinguindo apenas um isolado dos demais (isolado 45), que relaciona-se com o primeiro grupo com um nível de aproximadamente 85% de similaridade, como demonstrado na Figura 14.

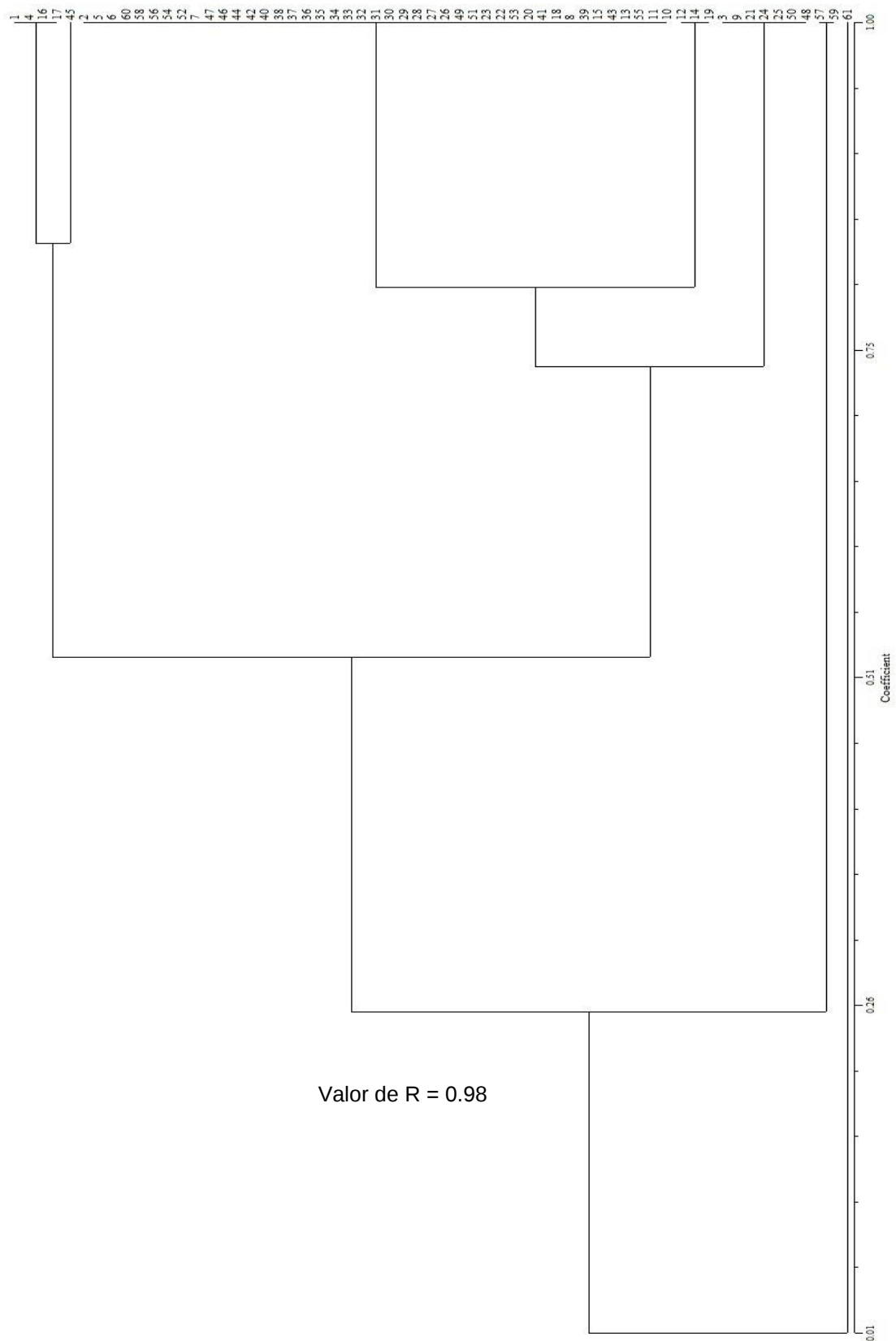


Figura 14: Dendrograma construído pelo método de UPGMA, utilizando o coeficiente de Jaccard (J) a partir dos perfis de amplificação das regiões ISSR com o *primer* (GTG)₅, obtidos de 60 isolados de *F. verticillioides*. Números 1-17: isolados de *F. verticillioides* da Zona da Mata, Goiana (Itapirema); Número 18: isolado de *F. verticillioides* do São Francisco, Petrolina (Pedrinhas- Catingueiro); Números 19-30: isolados de *F. verticillioides* do Sertão, Araripina XB 8030; Números 31-39: isolados de *F. verticillioides* do Sertão, Araripina BRF 5036-1; Números 40-45: isolados de *F. verticillioides* do Sertão, Araripina BRF 50361 CMS 36; Números 46-52: isolados de *F. verticillioides* do Sertão, Araripina BRF 5036; Números 53-60: isolados de *F. verticillioides* do São Francisco, Belém de São Francisco; Número 61: *Penicillium glabrum*.

Os perfis de amplificação de ISSR utilizando o *primer* (GACA)₄ dos sessenta isolados de *F. verticillioides* estão representados na Figura 15. Os isolados apresentaram padrões com um ou quatro fragmentos, com peso molecular variando em torno de 300 a 2000 pares de bases.

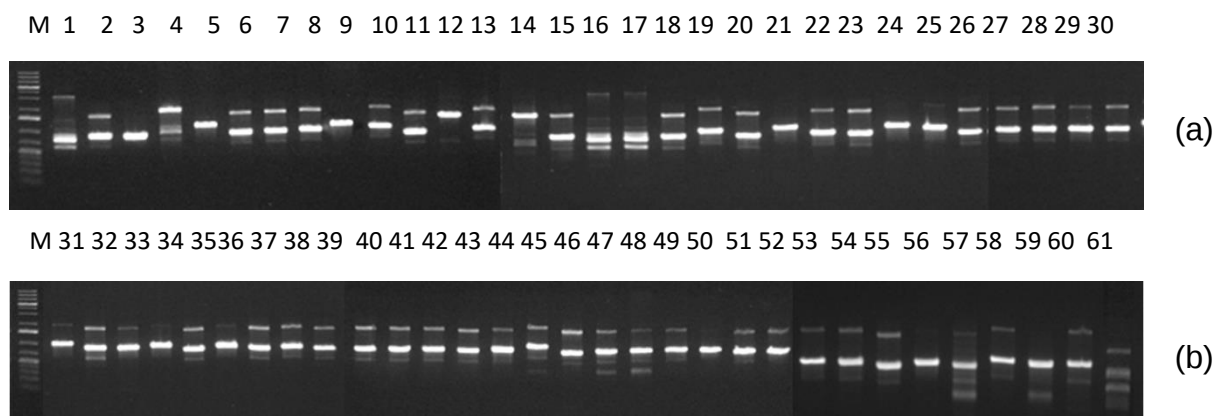


Figura 15 (a) e (b): Perfis de amplificação de ISSR obtidos com o *primer* (GACA)₄. Pista M: marcador de peso molecular 1Kb plus; pistas 1-17: isolados de *F. verticillioides* da Zona da Mata, Goiana (Itapirema); Pista 18: isolado de *F. verticillioides* do São Francisco, Petrolina (Pedrinhas- Catingueiro); Pistas 19-30: isolados de *F. verticillioides* do Sertão, Araripina XB 8030; Pistas 31-39: isolados de *F. verticillioides* do Sertão, Araripina BRF 5036-1; Pistas 40-45: isolados de *F. verticillioides* do Sertão, Araripina BRF 50361 CMS 36; Pistas 46-52: isolados de *F. verticillioides* do Sertão, Araripina BRF 5036; Pistas 53-60: isolados de *F. verticillioides* do São Francisco, Belém de São Francisco; Pista 61: *Penicillium glabrum*.

O marcador evidenciou a formação de 4 grupos distintos com 100% de similaridade, distinguindo três isolados (isolados 12, 57 e 59) dos demais, além de distinguir o isolado de *Penicillium glabrum* (isolado 61) dos demais isolados de *F. verticillioides*, como demonstrado na Figura 16. O isolado número 12 relaciona-se com aproximadamente 65% de similaridade com dois grupos, enquanto os isolados números 57 e 59 relacionam-se entre si com um nível de similaridade de aproximadamente 75%.

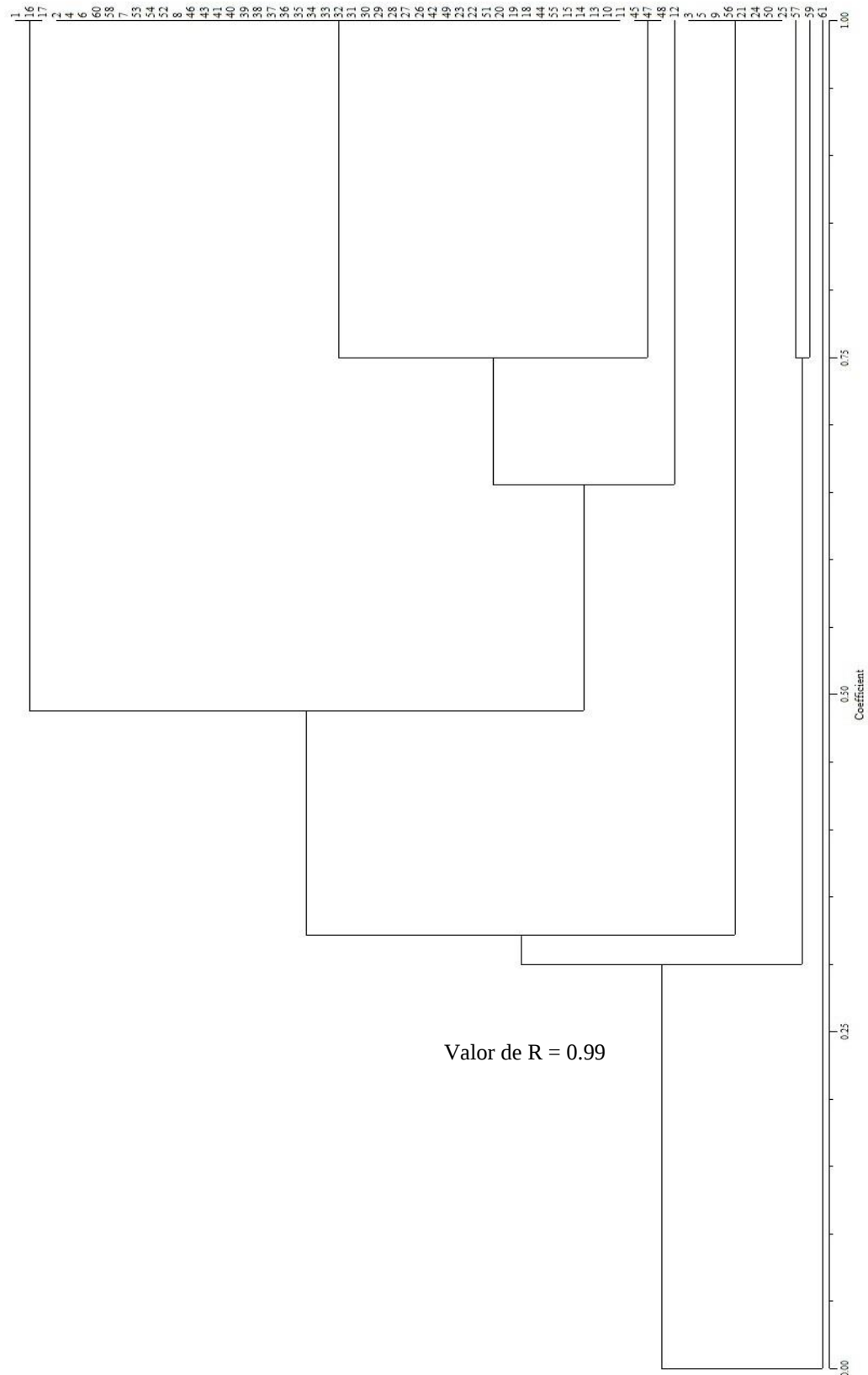


Figura 16: Dendrograma construído pelo método de UPGMA, utilizando o coeficiente de Jaccard (J) a partir dos perfis de amplificação das regiões ISSR com o *primer* (GACA)₄, obtidos de 60 isolados de *F. verticillioides*. Números 1-17: isolados de *F. verticillioides* da Zona da Mata, Goiana (Itapirema); Número 18: isolado de *F. verticillioides* do São Francisco, Petrolina (Pedrinhas-Catingueiro); Números 19-30: isolados de *F. verticillioides* do Sertão, Araripina XB 8030; Números 31-39: isolados de *F. verticillioides* do Sertão, Araripina BRF 5036-1; Números 40-45: isolados de *F. verticillioides* do Sertão, Araripina BRF 50361 CMS 36; Números 46-52: isolados de *F. verticillioides* do Sertão, Araripina BRF 5036; Números 53-60: isolados de *F. verticillioides* do São Francisco, Belém de São Francisco; Número 61: *Penicillium glabrum*.

A análise dos géis de agarose revelou grande homogeneidade genética entre os isolados de *F. verticillioides* com o uso dos *primers* (GTG)₅ e (GACA)₄, não havendo agrupamento em função do local de origem.

A variabilidade genética entre fungos parasita possibilita a adaptabilidade das espécies aos hospedeiros e as regiões geográficas (Lima, 2005).

Há poucos relatos sobre o uso dos *primers* de ISSR em isolados de *F. verticillioides*, sendo um recente estudo realizado por Chang *et al.* (2013), que usou os *primers* de ISSR (GTG)₅ e (GACA)₄ para análise comparativa da variabilidade genética entre isolados clínicos e fitopatogênicos desta espécie fúngica, onde foi observada uma maior homogeneidade entre os isolados obtidos de amostras clínicas. Estudo semelhante foi realizado por Oliveira *et al.* (2011), que utilizaram outros três *primers* de ISSR para diferenciar isolados patogênicos e não patogênicos de *Fusarium* spp. coletados em bananais de diferentes municípios do Norte de Minas Gerais, demonstrando a eficiência destes *primers* na diferenciação destes isolados.

Utilizando o mesmo par de *primers* deste estudo, Brasileiro (2003) encontrou uma grande diversidade molecular intraespecífica para *F. solani*, não havendo coincidência entre os quatro grupos formados e a origem geográfica dos isolados, corroborando com os resultados aqui obtidos.

Lima (2005) analisando o perfil de amplificação de ISSR utilizando o *primer* (GTG)₅ constatou que este foi eficiente em detectar diferenças entre linhagens de *Metarhizium anisopliae*, observando também, através do uso do *primer* (GACA)₄, uma diversidade genética significativa nas linhagens de *Metarhizium* mutantes e selvagens. Esta variabilidade genética encontrada entre as linhagens permite sua adaptabilidade aos mais variados hospedeiros e regiões geográficas.

Medeiros (2008), utilizando os marcadores (GTG)₅ e (GACA)₄, para amplificar o DNA de isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* provenientes de feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*), detectaram alta variabilidade genética, não encontrando também agrupamento em função da origem geográfica.

Tiago *et al.* (2011) caracterizaram 37 isolados de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* obtidos de cigarrinha da raiz da cana-de-açúcar utilizando também os *primers* (GTG)₅ e (GACA)₄, observaram 96% de similaridade de tamanho de fragmentos entre os grupos formados pelo uso do *primer* (GTG)₅ e 100% de

similaridade entre os grupos formados para os demais *primers* utilizados em sua pesquisa.

Outros *primers* de ISSR vêm sendo utilizados para análise da variabilidade genética em *Fusarium* spp. Bayraktar *et al.* (2008) analisaram 74 isolados de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* usando 20 *primers* de ISSR, confirmando que a variabilidade genética entre os isolados foi maior entre as diferentes regiões estudadas.

Baysal *et al.* (2009), analisaram a variabilidade genética pelo uso de *primers* ISSR de isolados de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* e *F. oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici* provenientes de campos de produção de tomate na Turquia. Estas análises moleculares indicaram diversidade genética nos isolados, separando-os em três grupos, porém, este agrupamento não foi relacionado com a distância geográfica entre os isolados.

Gurjar *et al.* (2009) utilizaram os *primers* ISSR afim de distinguir isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* causadores de murcha em grão de bico de isolados de *Fusarium proliferatum*. Os resultados evidenciaram que os de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* eram claramente distintos de *F. proliferatum*, e os isolados de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* não diferiram geneticamente entre si, evidenciando, assim, pouca variabilidade dentro da *formae speciales*.

Baysal *et al.* (2010) realizaram pioneiramente a caracterização molecular de isolados de *Fusarium oxysporum* f. *melongenae* utilizando marcadores ISSR e RAPD. Foram utilizados seis marcadores ISSR, obtendo como resultados uma grande variabilidade genética intraespecífica pelo uso dos marcadores CCA(TGA)₅TG e (ACC)₆CC.

Viswanathan *et al.* (2011) usaram marcadores ISSR1, ISSR5 e ISSR9 para confirmação patogênica e molecular de linhagens de *F. sacchari* isoladas de Cana-de-açúcar, obtendo fragmentos de 650 pb, 720 pb e 880 pb respectivamente, caracterizando isolados patogênicos e não-patogênicos.

Arpita Das *et al.* (2012) caracterizaram 24 isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* provenientes de culturas de banana na Índia. A identificação molecular foi feita pelo uso de marcadores moleculares espécie-específico e a análise de toxinas foi feita via PCR e HPTLC. Marcadores moleculares ISSR foram utilizados para verificar a diversidade genética dos isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. Os dendrogramas gerados a partir dos perfis de amplificação pelo uso dos 26 *primers* de ISSR, incluindo (GTG)₅ e (GACA)₄, revelaram a natureza polifilética

dos isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, e 10 grupos genotípicos foram identificados, demonstrando a eficiência da técnica para análise da diversidade genética de isolados de *F. oxysporum*.

Ingle e Ingle (2013) utilizaram marcadores moleculares ISSRF2, ISSRF3, ISSRF7 e ISSRF11 para analisar a variabilidade genética intraespecífica de isolados de *F. oxysporum* f. sp. *cubense*, tendo como resultado a divisão em quatro grupos dos isolados estudados, não havendo também separação quanto a região de origem.

O conhecimento do grau de variabilidade genética do patógeno é fundamental no delineamento de ensaios com agentes controladores, podendo-se analisar a ação do agente inibidor *in vitro*, e planejar formas de controle e monitoramento no campo. Desta forma, as diferenças específicas e a variabilidade genética podem ser empregadas como critério ou indicação do uso de novos produtos com potencial para serem utilizados como alternativa de controle (Cramer *et al.*, 2003).

4.5 ANÁLISE POR MALDI-TOF ICMS

Um dendrograma de parentesco entre os isolados de *F. verticillioides*, baseado nos perfis proteômicos gerados pela técnica de MALDI-TOF ICMS, está ilustrado na Figura 17. Os resultados obtidos pela análise molecular, macromorfológica e micromorfológica estiveram predominantemente em consonância com os resultados obtidos neste estudo, confirmando a taxonomia no mínimo ao nível de gênero (Tabela 4).

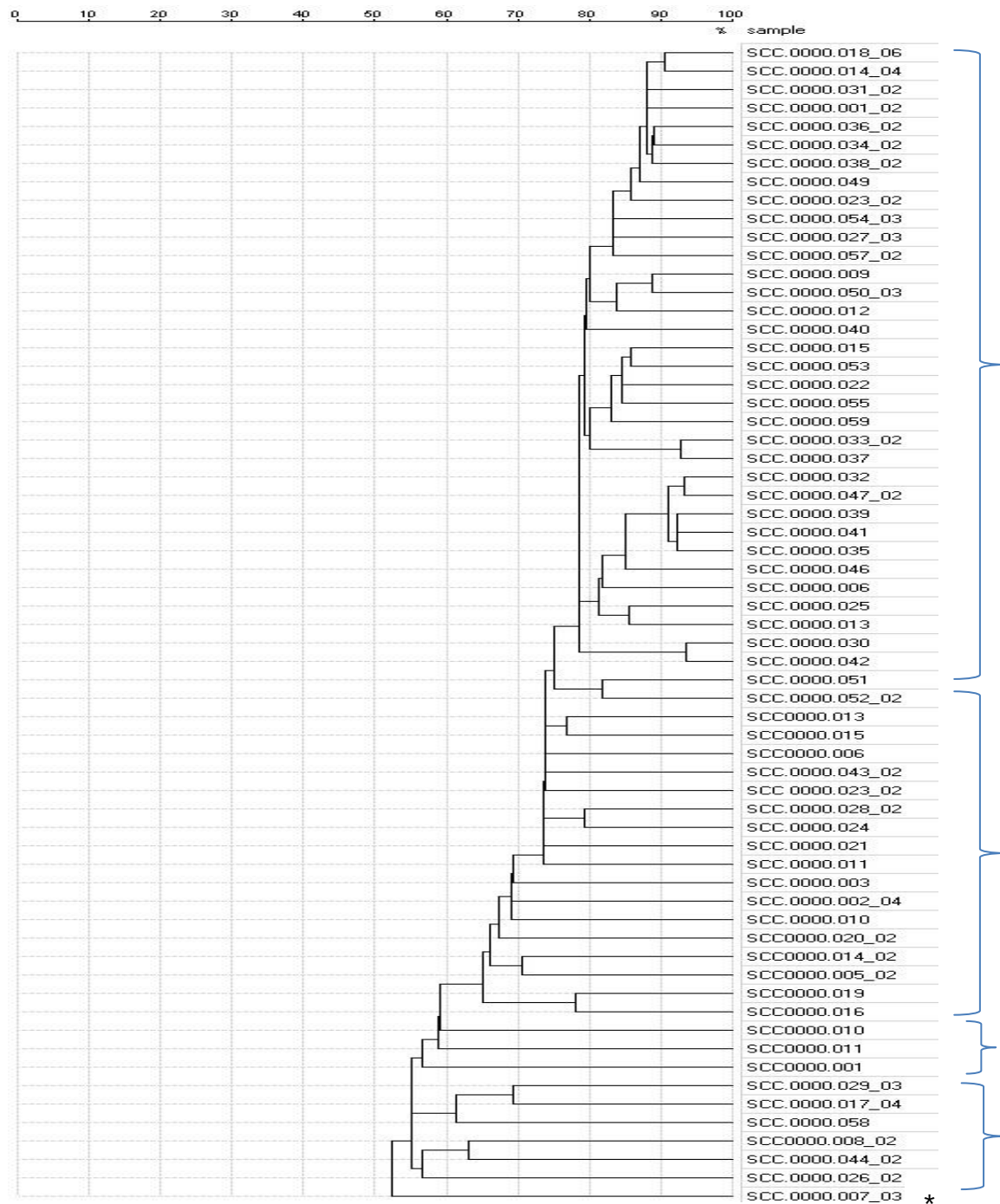


Figura 17: Dendrograma de similaridade espectral entre isolados de *F. verticillioides* com base nos perfis proteômicos por MALDI TOF-MS. As distâncias são medidas em percentagem de similaridade espectral. *Isolado identificado como *Achromobacter* sp.

Tabela 4: Isolados do gênero *Fusarium* identificados pela técnica de MALDI-TOF ICMS.

Número do isolado	Código no MALDI-TOF ICMS	Identificação proteômica	Origem
28	SCC.0000.018	<i>Fusarium</i> sp.	Sertão- Araripina XB 8030
25	SCC.0000.014*	<i>Fusarium</i> sp.	Sertão- Araripina XB 8030
30	SCC.0000.031	<i>Fusarium</i> sp.	Sertão- Araripina XB 8030
23	SCC.0000.001*	<i>Fusarium</i> sp.	Sertão- Araripina XB 8030
22	SCC.0000.036	<i>Fusarium</i> sp.	Sertão- Araripina XB 8030
29	SCC.0000.034	<i>Fusarium</i> sp.	Sertão- Araripina XB 8030
26	SCC.0000.038	<i>Fusarium</i> sp.	Sertão- Araripina XB 8030
20	SCC.0000.049	<i>Fusarium</i> sp.	Sertão- Araripina XB 8030
60	SCC.0000.023	<i>Fusarium</i> sp.	São Francisco- Belém S. F.
27	SCC.0000.054	<i>Fusarium</i> sp.	Sertão- Araripina XB 8030
19	SCC.0000.027	<i>Fusarium</i> sp.	Sertão- Araripina XB 8030
21	SCC.0000.057	<i>F. verticillioides</i>	Sertão- Araripina XB 8030
24	SCC.0000.009	<i>Fusarium</i> sp.	Sertão- Araripina XB 8030
45	SCC.0000.050	<i>Fusarium</i> sp.	Sertão- Araripina CMS 36
59	SCC.0000.012	<i>Fusarium</i> sp.	São Francisco- Belém S. F.
55	SCC.0000.040	<i>F. verticillioides</i>	São Francisco- Belém S. F.
32	SCC.0000.015*	<i>Fusarium</i> sp.	Sertão-Arari. BRS 5036(1)
36	SCC.0000.053	<i>F. verticillioides</i>	Sertão-Arari. BRS 5036(1)
33	SCC.0000.022	<i>Fusarium</i> sp.	Sertão-Arari.BRS 5036(1)
54	SCC.0000.055	<i>Fusarium</i> sp.	São Francisco- Belém S. F.
38	SCC.0000.059	<i>Fusarium</i> sp.	Sertão-Arari. BRS 5036(1)
34	SCC.0000.033	<i>Fusarium</i> sp.	Sertão-Arari. BRS 5036(1)
31	SCC.0000.037	<i>F. verticillioides</i>	Sertão-Arari.BRS 5036(1)
2	SCC.0000.032	<i>Fusarium</i> sp.	Z. da Mata- Goiana (Itap.)
13	SCC.0000.047	<i>Fusarium</i> sp.	Z. da Mata- Goiana (Itap.)
15	SCC.0000.039	<i>Fusarium</i> sp.	Z. da Mata- Goiana (Itap.)
11	SCC.0000.041	<i>F. verticillioides</i>	Z. da Mata- Goiana (Itap.)
3	SCC.0000.035	<i>Fusarium</i> sp.	Z. da Mata- Goiana (Itap.)
6	SCC.0000.046	<i>Fusarium</i> sp.	Z. da Mata- Goiana (Itap.)
7	SCC.0000.006*	<i>Fusarium</i> sp.	Z. da Mata- Goiana (Itap.)
5	SCC.0000.025	<i>Fusarium</i> sp.	Z. da Mata- Goiana (Itap.)
10	SCC.0000.013*	<i>Fusarium</i> sp.	Z. da Mata- Goiana (Itap.)
52	SCC.0000.030	<i>Fusarium</i> sp.	Sertão-Arari. BRS 5036
46	SCC.0000.042	<i>F. verticillioides</i>	Sertão-Arari. BRS 5036
18	SCC.0000.051	<i>Fusarium</i> sp.	São Francisco- Petrolina
53	SCC.0000.052	<i>Fusarium</i> sp.	São Francisco- Belém S. F.

10	SCC.0000.013	<i>Fusarium</i> sp.	Z. da Mata- Goiana (Itap.)
32	SCC.0000.015	<i>Fusarium</i> sp.	Sertão-Arari. BRS 5036(1)
7	SCC.0000.006	<i>Fusarium</i> sp.	Z. da Mata- Goiana (Itap.)
41	SCC.0000.043	<i>Fusarium</i> sp.	Sertão- Araripina CMS 36
14	SCC.0000.026*	<i>Fusarium</i> sp.	Z. da Mata- Goiana (Itap.)
56	SCC.0000.028	<i>Fusarium</i> sp.	São Francisco- Belém S. F.
48	SCC.0000.024	<i>Fusarium</i> sp.	Sertão-Arari. BRS 5036
47	SCC.0000.021	<i>Fusarium</i> sp.	Sertão-Arari. BRS 5036
43	SCC.0000.011*	<i>Fusarium</i> sp.	Sertão- Araripina CMS 36
42	SCC.0000.003	<i>Fusarium</i> sp.	Z. da Mata- Goiana (Itap.)
58	SCC.0000.002	<i>Fusarium</i> sp.	São Francisco- Belém S. F.
51	SCC.0000.010*	<i>Fusarium</i> sp.	Sertão-Arari. BRS 5036
9	SCC.0000.020	<i>Fusarium</i> sp.	Z. da Mata- Goiana (Itap.)
25	SCC.0000.014	<i>Fusarium</i> sp.	Sertão- Araripina XB 8030
50	SCC.0000.005	<i>Fusarium</i> sp.	Sertão-Arari. BRS 5036
57	SCC.0000.019	<i>Fusarium</i> sp.	São Francisco- Belém S. F.
49	SCC.0000.016	<i>Fusarium</i> sp.	Sertão-Arari. BRS 5036
51	SCC.0000.010	<i>Fusarium</i> sp.	Sertão-Arari. BRS 5036
43	SCC.0000.011	<i>Fusarium</i> sp.	Sertão- Araripina CMS 36
23	SCC.0000.001	<i>Fusarium</i> sp.	Sertão- Araripina XB 8030
17	SCC.0000.029	<i>Fusarium</i> sp.	Z. da Mata- Goiana (Itap.)
1	SCC.0000.017	<i>Fusarium</i> sp.	Z. da Mata- Goiana (Itap.)
16	SCC.0000.058	<i>Fusarium</i> sp.	Z. da Mata- Goiana (Itap.)
4	SCC.0000.008	<i>Fusarium</i> sp.	Z. da Mata- Goiana (Itap.)
22	SCC.0000.044	<i>Fusarium</i> sp.	Sertão- Araripina XB 8030
14	SCC.0000.026	<i>Fusarium</i> sp.	Z. da Mata- Goiana (Itap.)
8	SCC.0000.007	Família Alcaligenaceae	Z. da Mata- Goiana (Itap.)

*Isolados que aparecem duas vezes no dendrograma de MALDI-TOF ICMS.

Com exceção apenas do isolado SCC. 0000.007 (correspondendo ao isolado número 8- Zona da Mata- Goiana- Itapirema), que foi identificado como a bactéria *Achromobacter* sp., a maioria dos isolados foram identificados pelo menos ao nível de gênero (*Fusarium* sp.), e outros identificados ao nível de espécie (*Fusarium verticillioides*).

Alguns isolados, identificados pela taxonomia clássica e pela análise molecular como *F. verticillioides*, não foram identificados pela técnica de MALDI-TOF ICMS, uma vez que não foram observados picos suficientes para formação de um espectro e identificação final (isolados número 40- Sertão- Araripina BRS 5036 1 CMS 36; 37- Sertão- Araripina BRS 5036-1; 44- Sertão- Araripina BRS 5036 1 CMS 36 e 12- Zona da Mata- Goiana- Itapirema). Do ponto de vista espectral e de acordo com o agrupamento, todos os isolados foram identificados como *Fusarium* spp, assim como nos resultados obtidos por Santos *et al.* (2011), onde todos os isolados analisados corresponderam fortemente com a identificação proposta pela biologia molecular a partir da análise da amplificação da região ITS.

Pequenas variações durante a preparação de amostras para análise de proteínas/peptídeos pela técnica de MALDI-TOF ICMS afetam a qualidade dos espectros de massa, uma vez que, em virtude da complexidade dos micro-organismos, não há protocolos padronizados para aquisição destes perfis reprodutíveis de proteínas, em particular para os fungos.

Na tentativa de minimizar este problema, Dong *et al.* (2009) desenvolveram um método de preparação da amostra para identificação de *Fusarium* spp. produtoras de micotoxinas, de modo que, com a amostra otimizada, foi possível diferenciar cada esporo fortemente colorido ao nível de espécie.

Membros de muitos gêneros de fungos, tais como *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e também leveduras obtidas de amostras clínicas (ex: *Candida albicans*) têm sido identificados por MALDI-TOF ICMS com sucesso (Silva, 2011; Croxatto *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2012; Firacative *et al.*, 2013; Chalupová *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2013 a e b; Pereira *et al.*, 2013; Simões *et al.*, 2013; Theel, 2013).

Espécies micotoxigênicas de *Fusarium* tornam-se um problema quando alimentos são infectados por estes fungos, e conseqüentemente, as micotoxinas podem entrar nas cadeias alimentares de humanos e animais. Quando os isolados de *F. verticillioides* deste estudo foram analisados pela técnica de MALDI-TOF

ICMS, que analisa caracteres fenotípicos e proteínas ribossomais, um dendrograma similar ao dendrograma gerado pelo uso dos *primers* de ISSR foi obtido, não havendo também agrupamento dos isolados em função da região de origem.

Uma identificação eficiente de espécies de fungos produtores de micotoxinas, como *Fusarium* spp., é de grande importância para agricultura, indústria de alimentos e para medicina. Assim como neste estudo, Kemptner *et al.* (2009) usaram a técnica de MALDI-TOF ICMS para identificação de cinco isolados de *Fusarium* spp. conhecidos por afetarem o crescimento de grãos. Foram testadas diferentes matrizes e solventes orgânicos para otimização da amostra, tendo como melhor resultado o ácido ferúlico (FA) como matriz em 1mL de solvente orgânico acetonitrila (ACN) 0.1% ácido trifluoroacético (TFA) (7:3, v/v). A mistura de esporos com a solução matriz diretamente na placa do MALDI-TOF ICMS deu origem a perfis de proteína/peptídeo altamente reprodutíveis, e as diferenças nos padrões de espectros de massas obtidos permitiram a diferenciação das espécies de *Fusarium*, confirmando sua taxonomia prévia pelo uso da biologia molecular.

Marinach-Patrice *et al.* (2009) realizaram um amplo estudo de identificação com 62 isolados fúngicos obtidos de sítios de infecções em humanos comparando os resultados obtidos com a técnica de MALDI-TOF ICMS com sequenciamento de um gene característico que codifica o fator de alongação 1- α (*Tef-1*), sendo as espécies de *Fusarium* mais frequentemente isoladas de infecções humanas *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* e *F. proliferatum*, identificadas pela técnica de MALDI-TOF ICMS.

Passarini *et al.* (2013) usaram uma abordagem polifásica, incluindo análise morfológica, análise pela técnica de MALDI-TOF ICMS e análise molecular, para identificação de fungos filamentosos presentes na esponja marinha *Dragmacidon reticulatum*. Noventa e oito isolados fúngicos foram obtidos de duas amostras de *Dragmacidon reticulatum*, usando seis meios de cultura diferentes e sendo identificados em nível de gênero. Representantes de *Penicillium* e *Trichoderma* foram os mais diversos e abundantes fungos isolados, e foram submetidos à análise por MALDI-TOF ICMS para refinar a identificação, sendo alguns poucos representantes do gênero *Fusarium* encontrados na segunda amostra analisada.

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, a técnica de MALDI-TOF ICMS pode ser considerada uma metodologia confiável e simples para identificação de espécies de *Fusarium*, uma vez que os resultados obtidos foram semelhantes aos obtidos pela análise taxonômica clássica e molecular, de uma maneira rápida e com procedimentos experimentais simples. Sendo assim, a supracitada técnica pode ser uma ferramenta adicional adequada na taxonomia polifásica de fungos filamentosos. Entretanto, ainda há necessidade de aumentar o banco de dados utilizado para identificação, uma vez nos bancos de dados atuais os espectros de massas de fungos filamentosos ainda são limitados (Rodrigues *et al.* 2011; Passarini *et al.*, 2013).

4.6 DETECÇÃO DE FUMONISINAS B₁ E B₂ POR MALDI-TOF MS

Os espectros de detecção das fumonisinas B₁ e B₂ nos 60 isolados de *F. verticillioides* provenientes de culturas de milho das regiões São Francisco, Sertão e Zona da Mata do Estado de Pernambuco pela utilização da técnica de MALDI-TOF MS estão ilustrados no Anexo I. Todos os isolados deste estudo apresentaram picos com valores de massas moleculares equivalentes à massa molecular das fumonisinas B₁ e B₂.

As condições do ambiente, tais como: a quantidade de nutrientes disponíveis, a temperatura, a atividade da água e do oxigênio, são importantes fatores para produção de metabólitos tóxicos por fungos. Contudo, a produção de micotoxinas é um fator dependente da linhagem e não da espécie, de modo que, dentro de uma determinada espécie pode haver isolados produtores, ou não, de uma determinada micotoxina (Silva, 2013). Neste estudo, todos os isolados avaliados apresentaram produção de micotoxinas, independente da região geográfica.

A produção de fumonisinas por *F. verticillioides* tem sido frequentemente detectada e estudada, porém, por técnicas tradicionais como HPLC (Makun, 2011; Kong *et al.*, 2012; Ferreira *et al.*, 2013). São raros os estudos da avaliação do potencial micotoxigênico de fungos pela técnica de MALDI-TOF MS, como utilizado no presente estudo, sendo este o primeiro relato da detecção de fumonisinas B₁ e B₂ por isolados de *F. verticillioides*.

Os resultados obtidos nesta análise concordam fortemente com os resultados obtidos pela biologia molecular, a partir da amplificação do gene *FUM1*, responsável pela capacidade produtora da micotoxina fumonisina. Todos os isolados apresentaram amplificação deste gene, confirmando assim, o resultado demonstrado pela técnica de MALDI-TOF MS, onde os 60 isolados de *F. verticillioides* apresentaram compostos com peso molecular equivalente a fumonisina B₁ e B₂.

Estudo semelhante foi realizado por Marques (2006), que utilizou pioneiramente a técnica de ionização por MALDI-TOF MS no screening de amostras de amendoim contaminadas pelas micotoxinas de baixo peso molecular aflatoxina e ocratoxina. A técnica de MALDI-TOF MS mostrou-se promissora para execução de screening de micotoxinas nestes grãos, apresentando boa detecção das principais aflatoxinas (B₁, B₂, G₁ e G₂) e ocratoxina. Porém, para obtenção de sensibilidade adequada das micotoxinas estudadas, alguns fatores mostraram-se importantes, tais como a utilização de líquido iônico adequado como matriz (ácido dihidroxibenzoico-DHB), que possibilitou a obtenção de espectros de massas livres de interferentes nas escalas de *m/z* mais baixas.

A alta sensibilidade atribuída à espectrometria de massas por MALDI-TOF MS leva à perspectiva futura de que o método de screening de micotoxinas por esta técnica poderá facilitar a análise de micotoxinas em geral, além do controle de qualidade de produtos agrícolas como amendoins, milho, arroz, e outros produtos de interesse econômico. Para uma resposta rápida às empresas agrícolas, o uso de novas técnicas rápidas e sensíveis, que permitam uma análise direta de micotoxinas em matérias-primas como grãos ou extratos fúngicos, é de fundamental importância, vantagem esta aliada a técnica de MALDI-TOF MS quando comparada a técnicas tradicionais como o HPLC (Marques, 2006; Silva, 2013).

5 CONCLUSÕES

1. As técnicas de identificação morfológica e por *primer* espécie específico confirmaram que os 60 isolados de milho de Pernambuco pertencem à espécie *Fusarium verticillioides*;
2. Todos os isolados apresentam amplificação para o gene *FUM1*, sendo potenciais produtores da micotoxina fumonisina;
3. Os marcadores moleculares ISSR (GTG₅ e GACA₄) utilizados evidenciam grande homogeneidade genética entre os isolados de *Fusarium verticillioides* coletados em três mesorregiões do Estado de Pernambuco, e não houve relação entre grupos e as regiões de origem;
4. A técnica espectral de MALDI-TOF ICMS é eficiente quanto à identificação de *Fusarium* spp., confirmando predominantemente os resultados obtidos pelo uso da taxonomia clássica e da análise molecular;
5. A detecção de micotoxinas produzidas por *Fusarium verticillioides* pelo uso da técnica de MALDI-TOF MS é eficiente, confirmando os resultados obtidos na biologia molecular quanto à capacidade de produção da fumonisina B₁ e B₂.

REFERÊNCIAS

- Abrunhosa, L., Calado, T., Resende, T., Venâncio, A. 2011. A fluorescence-lc method with nda pre-column derivatization for fumonisin B2 determination in black *Aspergilli* cultures. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies* 34:1594–1603.
- Anukul, N., Maneeboon, T., Roopkham, C., Chuaysrinule, C., *et al.* 2013. Fumonisin and T-2 toxin production of *Fusarium* spp. Isolated from complete feed and individual agricultural commodities used in shrimp farming. *Mycotoxin Research* DOI: 10.1007/s12550-013-0182-y.
- Aragão, P.A., Baldacci, E.R., Almeida, M.T.A. 1999. Fungemia por *Fusarium* spp - relato de caso. *Pediatrics* 21: 353-356.
- Armstrong, D W. *et al.* 2001. Ionic Liquids as Matrixes for Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*. 378:3679-3686.
- Arpita Das, Venkataramana, M., Chandranayaka, S., Murali, H.S., *et al.* 2012. Molecular characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* isolates from banana. *Pest Management in Horticultural Ecosystems* 18 (2): 171-178.
- Bacon, C.W., Glenn, A.E., Yates, I.E. 2008. *Fusarium verticillioides*: managing the endophytic association with maize for reduced fumonisins accumulation. *Toxin Reviews* 27: 411-446.
- Barros Lopes, M., Soden, A., Henschke, P. A., Langridge, P. 1996. PCR differentiation of commercial yeast strains using *Intron Splice Site Primers*. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 4514–4520.
- Bayraktar, H., Dolar, F.S., Maden, S. 2008. Use of RAPD and ISSR markers in detection of genetic variation and population structure among *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* Isolates on Chickpea in Turkey. *Journal Phytopathology* 156: 146-154.
- Baysal, O., Siragusa, M., İkten, H., Polat, I., Gümrükcü, E., Yigit, F., Carimi, F.; Teixeira da Silva, J. A. (2009). *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* races and their genetic discrimination by molecular markers in West Mediterranean region of Turkey. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 74, 68–75.
- Baysal, O., Siragusa, M., Gumrukcu, E., Zengin, S., *et al.* 2010. Molecular Characterization of *Fusarium oxysporum* f. *melongenae* by ISSR and RAPD Markers on Eggplant. *Biochemical Genetics* 48:524–537.
- Becerra, V., Paredes, M. 2000. Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. *Agricultura Técnica* 60: 270-281.

- Bernd, L.P. 2006. Modelagem com ênfase no crescimento de *Fusarium verticillioides* e produção de fumonisinas na perda de qualidade do milho. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Londrina, São Paulo.
- Bezuidenhout, S.C., Gelderblom, W.C.A., Gorst-Allman, C.P., Horak, R.M., *et al.* 1988. Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. *Journal of the Chemical Society* 11: 743-745.
- Bhandari, N., Brown, C.C., Sharma, R.P. 2002. Fumonisin B₁-induced localized activation of cytokine network in mouse liver. *Food and Chemical Toxicology* 40: 1483-1491.
- Blechova P., Havlova P., Gajdosova D., Havel J. 2006. New possibilities of matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry to analyze barley malt quality. Highly sensitive detection of mycotoxins. *Environmental Toxicology* 21:403–408.
- Booth, C. 1971. *The genus Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute. GB, Kew. 231 p.
- Booth, C. 1977. *Fusarium*, Laboratory guide to the identification of major species. Commonwealth Mycological Institute. Ferry Lane. Kew, Surrey, England.
- Boutati, E.I., Anaissie, E.J. 1997. *Fusarium*, a Significant Emerging Pathogen in Patients With Hematologic Malignancy: Ten Years' Experience at a Cancer Center and Implications for Management. *Blood* 90: 999-1008.
- Boutigny, A.L., Beukes, I., Small, I., Zuhlke, S., *et al.* 2011. Quantitative detection of *Fusarium* pathogens and their mycotoxins in South African maize. *Plant Pathology* 60: 522-531.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. 1992. *Regras para análise de sementes*. Brasília, DF, 365p.
- Brasileiro, B.T.R.V. 2003. Variabilidade genética em isolados de *Fusarium solani* detectada com a utilização de marcadores moleculares. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- Brown, D.W., Butchko, R.A.E., Proctor, R.H., 2008. Genomic analysis of *Fusarium verticillioides*. *Food Additives and Contaminants* 25: 1158–1165.
- Bussab, W.O.; Miazaki, E.S.; Andrade, D.F. 1990. Introdução à análise de agrupamentos. *Associação Brasileira de Estatística*. 105p.
- Butkeraitis, P. 2003. Efeitos da fumonisina B₁ em codornas poedeiras (*Coturnix coturnix japonica*). Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, USP, Pirassununga, 108p.
- Carneiro-Leão, M.P. 2006. Caracterização molecular (PCR) e infecção de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* e *M. anisopliae* var. *anisopliae* em *Zaprionus*

- indianus*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- Carneiro-Leão, M.P. 2011. Expressão diferencial de genes envolvidos na virulência durante a germinação, conidiogênese e patogênese em *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* e *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- Castro, M.F.P.M., Shephard, G.S., Sewran, V., Vicente, E., Mendonça, T.A., Jordan, A.C. 2004. Fumonisin in Brazilian corn-based foods for infant consumption. *Food Additives and Contaminants* 21: 693-699.
- Catharino, R.R et al. 2005. Aflatoxin Screening by MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* 77: 8155-8157.
- Chalupová J, et al. 2013. Identification of fungal microorganisms by MALDI-TOF mass spectrometry. *Biotechnology Advances*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.11.002>
- Chang, S.C. 2010. Comparação entre isolados de *Fusarium verticillioides* patogênicos de plantas e de humanos por marcadores moleculares e presença do gene *FUM1*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- Chang, S.C., Macêdo, D.P.C., Souza-Motta, C.M., Oliveira, N.T. 2013. Use of molecular markers to compare *Fusarium verticillioides* pathogenic strains isolated from plants and humans. *Genetics and Molecular Research* 12 (3): 2863-2875.
- Cocchi, S., Codeluppi, M., Venturelli, M., Bedini, A., Grottola, A., Gennari, W., Cavrini, F., Benedetto, F.D., Ruvo, N.D., Rumpianesi, F., Gerunda, G.E., Guaraldi, G. 2011. *Fusarium verticillioides* fungemia in a liver transplantation patient: successful treatment with voriconazole. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 71: 438-441.
- COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY (USA). 2003. *Micotoxins: Risks in Plant, Animal, and Human Systems*. Iowa,
- Covarelli, L., Stifano, S., Beccari, G., Raggi, L. 2012. Characterization of *Fusarium verticillioides* strains isolated from maize in Italy: Fumonisin production, pathogenicity and genetic variability. *Food Microbiology* 31: 17-24.
- Cramer, R. A.; Byrne, P. F.; Brick, M. A.; Panella, L.; Wickliffe, E.; Schwartz, H. F. 2003. Characterization of *Fusarium oxysporum* isolates from common bean and sugar beet using pathogenicity assays and random-amplified polymorphic DNA markers. *Journal of Phytopathology* 151 (352–360).
- Croxatto, A., Prod'hom, G., Greub, G. 2012. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiology Reviews* 36: 380–407.

- Cruz, J.V.S. 2010. Ocorrência de aflatoxinas e fumonisinas em produtos à base de milho e milho utilizado como ingrediente de rações para animais de companhia, comercializados na região de Pirassununga, Estado de São Paulo. Tese de Doutorado em Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Pirassununga, 73f.
- De Carolis, E., Posteraro, B., Lass-Flori, C., Vella, A. 2012. Species identification of *Aspergillus*, *Fusarium* and *Mucorales* with direct surface analysis by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clinical Microbiology and Infection* 18(5):475-84.
- Degani, A.L.G., Cass, Q.B., Vieira, P.C. 1998. Cromatografia um breve ensaio. *Cromatografia* 7 (5): 21-25.
- De Hoog, G.S., Guarro, J., Gené, J., Figueras, M.J. 2000. *Atlas of Clinical Fungi*. Centraalbureau voor Schimmel cultures/Universitat Rovira Virgili, Reus, Spain.
- Dilkin. P., Mallmann, C.A., Almeida, C.A.A., et al. 2002. Production of fumonisins by strains of *Fusarium moniliforme* according to temperature, moisture and growth period. *Brazilian Journal of Microbiology* 33: 111-118.
- Dissanayake, M.L.M.C., Tanaka, S., Ito, S. 2009. Fumonisin B1 production by *Fusarium proliferatum* strains isolated from *Allium fistulosum* plants and seeds in Japan. *Letters in Applied Microbiology* 48: 598-604.
- Divakara, S.T., Santosh, P., Aiyaz, M., Ramana, M.V., et al. 2013. Molecular identification and characterization of *Fusarium* spp. associated with sorghum seeds. *Journal of the Science Food and Agriculture* DOI: 10.1002/jsfa.6380.
- Dong, H., Kemptner, J., Marchetti-Deschmann, M., Kubicek, C.P. 2009. Development of a MALDI two-layer volume sample preparation technique for analysis of colored conidia spores of *Fusarium* by MALDI linear TOF mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 395:1373–1383.
- Dorn, B., Forrer, H.R., Jenny, E., Wettstein, F.E., et al. 2011. *Fusarium* species complex and mycotoxins in grain maize from maize hybrid trials and from grower's fields. *Journal of Applied Microbiology* 111: 693–706.
- Elosta, S., Gajdošová, D., Hégrová, B., Havel, J. 2007. MALDI TOF mass spectrometry of selected mycotoxins in barley. *Journal of Applied Biomedicine* 5: 39-47.
- EMBRAPA. Milho e Sorgo: Sistema de produção. Disponível em: <<http://www.cnpms.embrapa.br>> Acesso em: 01 Jul. 2010.
- Fandohan, P., Gnonlonfin, B., Hell, K., Marasas, W.F.O., et al. 2005. Natural occurrence of *Fusarium* and subsequent fumonisina contamination in preharvest and stored maize in Benin, West Africa. *International Journal of Food Microbiology* 99: 173– 183.

- Fanelli, F., Schmidt-Heydt, M., Haidukowski, M., Susca, A., *et al.* 2012. Influence of light on growth, conidiation and fumonisin production by *Fusarium verticillioides*. *Fungal Biology* 116: 241-248.
- Farah, S.B. 2000. DNA segredos e mistérios. São Paulo, Sarvier, 976p.
- Faria, C.B., Abe, C.A.L., Silva, C.N., Tessmann, D.J., *et al.* 2012. New PCR assays for the identification of *Fusarium verticillioides*, *Fusarium subglutinans*, and other species of the *Gibberella fujikuroi* complex. *International Journal of Molecular Science* 13: 115-132.
- Ferreira, M.E, Grattapaglia, D. 1998. Classes de marcadores moleculares para análise genética. In: Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Embrapa-CENARGEN, Brasília, p. 13-67.
- Ferreira, P., Queiroz, V.A.V., Conceição, R.R.V., Miguel, R.A. 2013. Incidência de aflatoxinas e fumonisinas em produtos de milho consumidos no estado de Minas Gerais. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo* 12 (1): 54-60.
- Figueira, E.L.Z. 2003. Purificação e caracterização dos inibidores de amilase em milho (*Zea Mays* L.) visando o controle de *Fusarium verticillioides*. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Londrina, São Paulo.
- Firacative, C., Trilles, L., Meyer, W. 2013. MALDI-TOF MS Enables the Rapid Identification of the Major Molecular Types within the *Cryptococcus neoformans/C. gattii* Species Complex. *Plos One* 7 (5): 1-8.
- Flaherty, J.E., Pirttilä, A.M., Bluhm, B.H., Woloshuck, C.P. 2003. PAC_1 , a pH-regulatory gene from *Fusarium verticillioides*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 5222-5227.
- Freitas, M.B., Ribeiro, J.M.M., Perin, A., Silva Junior, H.R. Silva, A. 2009. Produtividade e incidência de grãos ardidos em híbridos de milho cultivados no Sudoeste de Goiás. *Agrarian* 2(4): 73-78.
- Frisvad, J. C., Smedsgaard, J., Samson, R. A., Larsen, T. O., Thrane, U. 2007. Fumonisin B2 production by *Aspergillus niger*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 9727–9732.
- García, P.M. 2010. Análisis de factores ecofisiológicos que influyen en la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de toxinas en especies de “*fusarium*”. Tese de Doutorado em Biología, Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Ciencias Biológicas, Madrid.
- Gallardo-Reyes, E.D., Ibarra-Moreno, M.I., Sánchez-Mariñez, R.I. 2006. Micobiota de Maíz (*Zea mays* L.) recién cosechado y producción de fumonisina B1 por cepas de *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenb. *Revista Mexicana de Fitopatología* 24 (1): 27-34.

- Gelderblom, W.C.A., Jaskiewicz, K., Marasas, W. F. O., Thiel, P.G., *et al.* 1988. Fumonisin- novel mycotoxins with cancer promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Applied and Environmental Microbiology* 54: 1806-1811.
- Gerlach, W., and H. Nirenberg. 1982. The genus *Fusarium* – A pictorial atlas. Berlin.
- Godoy, P.C. 2004. Diversidade genotípica de cepas de *Fusarium solani* isoladas de episódios de ceratites. Tese de Doutorado em Doenças Infecciosas e Parasitárias, Escola Paulista de Medicina, São Paulo.
- Godoy, P.C, Colombo, A.L. 2004. Biologia e relevância clínica das espécies do gênero *Fusarium* spp. *Prática Hospitalar* 34: 136-140.
- Goertz, A., Zuehlke, S., Spiteller, M., Steiner, U., *et al.* 2010. *Fusarium* species and mycotoxin profiles on commercial maize hybrids in Germany. *European Journal of Plant Pathology* 128: 101-111.
- Gomes, R.R. 2008. *Phomopsis* spp. endófitos de plantas medicinais: diversidade genética e antagonismo ao fungo *Guignardia citricarpa*. Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Genética, Universidade Federal do Paraná.
- Gómez, J.A.G., Ramírez, C.M. 2008. Evaluación preliminar de modelos de infección cruzada por *Fusarium* sp., aislados de procesos patológicos, en plantas, animales y humanos. Trabalho de graduação apresentado como requisito para obtenção do título de microbiólogo agrícola e veterinário e microbiólogo industrial, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C.
- González-Jaén, M.T., Mirete, S., Patiño, B., López-Errasquín, E., Vázquez, C. 2004. Genetic markers for the analysis of variability and for production of specific diagnostic sequences in fumonisin-producing strains of *Fusarium verticillioides*. *European Journal of Plant Pathology*, 110: 525-532.
- Groppe, K., Sanders, J., Wiemken, A., Boller, T. 1995. A microsatellite marker for studying the ecology and diversity of fungal endophytes (*Epichloë* spp.) in Grasses. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 3943-3949.
- Guarro, J., Nucci, M., Akiti, T., Gené, J. 2000. Mixed Infection Caused by Two Species of *Fusarium* in a Human Immunodeficiency Virus-Positive Patient. *Journal of Clinical Microbiology* 38: 3460-3462.
- Gupta, M., Chyi, Y.S., Romero-Severson, J., Owen, J.L. 1994. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple sequence repeats. *Theoretical and Applied Genetics* 89: 998-1006.
- Gurjar, G., Barve, M., Giri, A., Gupta, V. 2009. Identification of Indian pathogenic races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* with gene specific, ITS and random markers. *Mycologia* 101 (4): 484–495.
- Guy-Franck, R., Pâques, F. 2000. Mini- and microsatellite expansions: the recombination connection. *EMBO Reports* 11: 122-126.

- Han, Q., Inglis, G.D., Hausner, G. 2002. Phylogenetic relationships among strains of the entomopathogenic fungus, *Nomuraea riley*, as revealed by partial B-tubulin sequences and inter simple sequence repeat (ISSR) analysis. *Letters and Applied Microbiology* 34: 376-383.
- Harrison, L.R., Colvin, B.M., Greene, J.T., Newman, L.M., Cole-Jr, J.R. 1990. Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B₁, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. *Journal Veterinary Diagnostic Investigation* 2: 217-221.
- Hatsch, D., Phalip, V., Jeltsch, J.M. 2004. Use of genes encoding cellobiohydrolase-C and topoisomerase II as targets for phylogenetic analysis and identification of *Fusarium*. *Research in Microbiology* 155: 290-296.
- Hillenkamp, F., Karas, M.I. 1988. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Analytical Chemistry* 60: 2299-2301.
- Hinojo, M.J., Medina, A., Valle-Algarra, F.M., Gimeno-Adelantado, J.V., et al. 2006. Fumonisin production in rice cultures of *Fusarium verticillioides* under different incubation conditions using an optimized analytical method. *Food Microbiology* 23: 119–127.
- Horká, M., Kubesova, A., Salplachta, J., Zapletalova, E. 2012. Capillary and gel electromigration techniques and MALDI-TOF MS – Suitable tools for identification of filamentous fungi. *Analytica Chimica Acta* 716:155–162.
- Hocking, A.D.; J.I. Pitt. 1980. *Journal Applied & Enviromental Microbiology* 39, 488-492.
- Huggett, J., Dheda, K., Bustin, S., Zumla, A. 2005. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes and Immunity* (6), 279-284.
- IARC. 1993. Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. *World Health Organization*, 56: 397–444, 445–466, 467–488.
- Ingle, A., Ingle, R. 2013. Isolation and identification of *Fusarium oxysporum* infecting Musa plants in Maharashtra region and their molecular characterization. *Asiatic Journal of Biotechnology Resources* 4 (1): 28-34.
- Jaccard, P. 1908. Nouvelles recherches sur la distribution horale. *Bulletin de la Societé Vand des Sciences Naturalles* 44, 223-270.
- Jurado M, Vázquez C, Callejas C, González-Jaén MT, 2006a. Occurrence and variability of mycotoxigenic *Fusarium* species associated to wheat and maize in the South West of Spain. *Mycotoxin Research* 22: 87–91.

- Jurado M, Vázquez C, Marín S, Sanchis V, González-Jaén MT, 2006b. PCR-based strategy to detect contamination with mycotoxigenic *Fusarium* species in maize. *Systematic and Applied Microbiology* 29: 681–689.
- Jurado, M., Marín, P., Magan, N., González-Jaén, M.T. 2008. Relationship between solute and matric potential stress, temperature, growth, and *FUM1* gene expression in two *Fusarium verticillioides* strains from Spain. *Applied and Environmental Microbiology*, v.74, n. 7, p. 2032–2036.
- Karthikeyan,V., Rajaraja, R., Patharjan, S., Karthikeyan, P., Saravanakumar, P., Siva, M., Aruna Bhavani, P.S., Palani, P. 2011. PCR based detection of fumonisin producing strains of *Fusarium verticillioides* and gene related to toxin production. *Current Botany* 2(3): 34-37.
- Kashi, Y., King, D., Soller, M. 1997. Simple sequence repeats as a source of quantitative genetic variation. *Trends in Genetics* 13: 74-78.
- Kawashima, L.M., Soares, L.M.V. 2006. Incidência de fumonisina B₁, aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, ocratoxina A e zearalenona em produtos de milho. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos* 26 (3): 516-521.
- Kemptoner, J., Marchetti-Deschmann, M., Mach, R., Druzhinina, I.S. 2009. Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) preparation techniques for surface characterization of intact *Fusarium* spores by MALDI linear time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrom.* 23: 877–884.
- Knaflewski, M., Golinski, P. K., Kostecki, M., Waskiewicz, A., Weber, Z. 2008. Mycotoxins in asparagus spears and producing them fungi. *Acta Horticulture* 776: 183-189.
- Kong, W., Xie, T., Li, J., Wei, J. *et al.* 2012. Analysis of fumonisins B1 and B2 in spices and aromatic and medicinal herbs by HPLC-FLD with on-line post-column derivatization and positive confirmation by LC-MS/MS. *Analyst* 137: 3166–3174.
- Lacey, J. 1989. Prevention of mold growth and mycotoxin production through control environmental factors. In: *Mycotoxins and Phytotoxins*. Natori, S., Hashimoto, K., Ueno, Y. (Eds.). Elsevier, Amsterdam. p. 161-168.
- Lang, R.M. 2005. Ocorrência de fungos toxigênicos e micotoxinas em erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil. var. *paraguariensis*) comercializada em Santa Catarina. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina.
- Leal, P.C., Cantanhede, K.L., Silva, L.M., Bezerra, G.F.B., Viana, G.M.C.; Nascimento, M.D.S.B. 2005. Micotoxinas do *Fusarium* e seu potencial carcinogênico. *News Lab* 70: 76-88.
- Lee, P J; chen, W; gleber, J C. 2004. Qualitative and quantitative analysis of small amine molecules by MALDI-TOF mass spectrometry through charge derivatization. *Analytical Chemistry* 76: 4888-4893.

- Lee, K., Pan, J.J., May, G. 2009. Endophytic *Fusarium verticillioides* reduces disease severity caused by *Ustilago maydis* on maize. *FEMS Microbiology Letters* 299: 31-37.
- Lenart, A.M., Klimek-Kopyra, A., Boroń, P.M. 2013. Morphological and molecular identification and PCR amplification to determine the toxigenic potential of *Fusarium* spp. isolated from maize ears in southern Poland. *Phytoparasitica* 41:241–248.
- Leslie, J.F.; Summerell, B.A. 2006. *The Fusarium laboratory manual*. Ames, Iowa, 388p.
- Leslie, J.F., Zeller, K.A., Lamprecht, S.C., Rheeder, J.P., Marasas, W.F.O. 2005. Toxicity, pathogenicity, and genetic differentiation of five species of *Fusarium* from sorghum and millet. *The American Phytopathological Society* 95 (3): 275-283.
- Lewin, B. 2001. *Genes VII*. Editora Artmed, Porto Alegre. 955p.
- Li, P., Zhang, Z., Hu, X., Zhang, Q. 2013 (a). Advanced hyphenated chromatographic-mass spectrometry in mycotoxin determination: current status and prospects. *Mass Spectrometry Reviews* 32: 420–452.
- Li, Y., Liang, M., Shu, X., Liu, C., Shu, J. 2013 (b). Differentiation of basidiospores by MALDI-TOF lipid profiling. *International Journal of Mass Spectrometry* 352: 44– 50
- Lieckfeldt, E.; Meyer, W.; Börner, T. 1993. Rapid identification and differentiation of yeasts by DNA and PCR fingerprinting. *Journal of Basic Microbiology* 33, 413-426.
- Lima, N., Santos, I. M., Venancio, A. 1998. Fungos contaminantes na indústria alimentar. *Micoteca da Universidade do Minho*, pp. 9-28, 31-48, 97-116, 119-128.
- Lima, M.L.F. 2005. Caracterização molecular de espécies de *Metarhizium* e patogenicidade sobre *Diatraea saccharalis*. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- Lima-Neto, R.; Santos, C. ; Lima, N. ; Sampaio, Paula ; Pais, Célia ; Neves, R.P. 2013. Application of MALDI-TOF MS for requalification of a Candida clinical isolates culture collection. *Brazilian Journal of Microbiology*.
- Lino, C.M., Silva, L.J.G., Pena, A.L.S., Silveira, M.I. 2006. Determination of fumonisins B1 and B2 in Portuguese maize and maize-based samples by HPLC with fluorescence detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 384: 1214–1220.
- Logrieco, A., Ferracane, R., Haidukowsky, M., Cozzi, G., et al. 2009. Fumonisin B₂ production by *Aspergillus niger* from grapes and natural occurrence in must. *Food Additives and Contaminants* 26 (11): 1495-1500.

- Logrieco, A., Ferracane, R., Visconti, A., Ritieni, A. 2010. Natural occurrence of fumonisin B2 in red wine from Italy. *Food Additives and Contaminants* 27 (8): 1136-1141.
- López-Errasquín, E., Vázquez, C., Jiménez, M., González-Jaén, M.A. 2007. Real-Time RT-PCR assay to quantify the expression of *fum1* and *fum19* genes from the Fumonisin-producing *Fusarium verticillioides*. *Journal of Microbiological Methods* 68: 312-317.
- Lucca Filho, O. 1987. Metodologia dos testes de sanidade de sementes. In: Soave, J.; Wetzel, M.M.V.S. (Ed.). *Patologia de sementes*. Campinas: Fundação Cargil, 276-298.
- Luongo, L., Maccaroni, M., Ferrurini, A., Vitale, S., et al. 2007. Molecular characterization of *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*. *Journal of Plant Pathology* 89: p. 46.
- Maciel, D.B. 2008. Gene de patogenicidade cap20 em isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- Madania, A., Altawil, M., Naffaa, W., Volker, P.H., Hawat, M. 2013. Morphological and molecular characterization of *Fusarium* isolated from maize in Syria. *Journal of Phytopathology* 161: 452-458.
- Magan, N., Aldred, D. 2007. Environmental fluxes and fungal interactions: Maintaining a competitive edge. En: *Stress in yeast and filamentous fungi*. Van West, P., Avery, S. y Stratford, M. (Eds.). Elsevier Ltd., Amsterdam, Holland. Págs. 19-35.
- Magculia, N.J.F., Cumagun, C.J.R. 2011. Genetic diversity and PCR-based identification of potential fumonisin-producing *Fusarium verticillioides* isolates infecting corn in the Philippines *Tropical plant pathology* 36 (4): 225-232.
- Maheshwar, P.K., Moharram, S.A., Janardhana, G.R. 2009. Detection of fumonisin producing *Fusarium verticillioides* in paddy (*oryza sativa* L.) using polymerase chain reaction (PCR). *Brazilian Journal of Microbiology* 40:134-138.
- Makun, H.A., Dutton, M.F., Njobeh, P.B., Phoku, J.Z., et al. 2011. Incidence, phylogeny and mycotoxigenic potentials of fungi isolated from rice in niger state, Nigeria. *Journal of Food Safety* 31: 334–349
- Malosso, E., Waite, I.S., English, L., Hopkins, D.W., O'Donnell, A.G. 2006. Microbial diversity of Antarctic soils determined using a combination of culture isolation, molecular fingerprinting and cloning techniques. *Polar Biology*, 29 (7), 552-561.
- Marasas, W.F.O., Thiel, P.G., Rabie, C.J., Nelson, P.E., Toussoun, T.A. 1986. Moniliformin production in *Fusarium* section *Liseola*. *Mycologia* 78 (2): 242-247.

- Marchetti-Deschmann, M., *et al.* 2012. Using Spores for *Fusarium* spp. Classification by MALDI-Based Intact Cell/Spore Mass Spectrometry. *Food Technology and Biotechnology* 50 (3): 334–342
- Marín, P.G. 2010. Análisis de factores ecofisiológicos que influyen en la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de toxinas en especies de “*Fusarium*”. Tese de doutorado, Universidad Complutense de Madrid, Madrid.
- Marín, S., Sanchis, V., Magan, N. 1995(a). Water activity, temperature, and pH effects on growth of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* isolates from maize. *Canadian Journal of Microbiology* 41: 1063-1070.
- Marín S., Sanchis, V., Vinas, I., Canela, R., Magan, N. 1995(b). Effect of water activity and temperature on growth and fumonisin B₁ and B₂ production by *Fusarium proliferatum* and *F. moniliforme* on maize grain. *Letters in Applied Microbiology* 21: 298-301.
- Marín, P., Magan, N., Vázquez, C., González-Jaén, T. 2010. Differential effect of environmental conditions on the growth and regulation of the fumonisin biosynthetic gene *FUM1* in the maize pathogens and fumonisin producers *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum*. *FEMS Microbiology Letters* 73: 303-311.
- Marinach-Patrice, C., Lethuillier, A., Marly, A., Brossas, J.Y., *et al.* 2009. Use of mass spectrometry to identify clinical *Fusarium* isolates. *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 15: 634–642.
- Marques, L.A. 2006. Aplicação de técnicas avançadas de espectrometria de massas em ciências de alimentos e perfumaria. Dissertação de Mestrado, Instituto de química, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.
- Martins, M.K. 2005. Variabilidade genética de isolados de *Fusarium* spp. e estudo da interação com a planta hospedeira. Tese de doutorado, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, ESALQ, Piracicaba.
- Medeiros, L.V. 2008. Gene *pelB* em isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* provenientes de vários hospedeiros. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- Meirelles, P.G. 2005. *Fusarium verticillioides*: caracterização molecular e detecção em milho através de ensaio imunoenzimático. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Londrina, São Paulo.
- Melo, M.P. 2011. Detecção de espécies de *Fusarium* potencialmente produtoras de micotoxinas em grãos de milho no Nordeste do Brasil. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
- Meyer, W.; Mitchell, T.G. (1995). Polymerase chain reaction fingerprint in fungi three using single primers specific to minisatellites and simple repetitive DNA sequence: strain variation in *Cryptococcus neoformans*. *Electrophoresis* 6, 1649-1656.

- Minami, L., Meirelles, P.G., Hirooka, E.Y., Ono, E.Y.S. 2004. Fumonisin: efeitos toxicológicos, mecanismo de ação e biomarcadores para avaliação da exposição. *Semina: Ciências Agrárias* 25 (3): 207-224.
- Mirete, S., Vázquez, C., Mulé, G., Jurado, M., González-Jaén, M.T. 2004. Differentiation of *Fusarium verticillioides* from banana fruits by IGS and EF-1 sequence analyses. *European Journal of Plant Pathology*, 110: 515-523.
- Mogensen, J.M., Nielsen, K.F., Samson, R.A., Frisvad, J.C., Thrane, U. 2009. Effect of temperature and water activity on the production of fumonisins by *Aspergillus niger* and different *Fusarium* species. *BMC Microbiology* doi:10.1186/1471-2180-9-281.
- Mogensen, J.M., Moler, K.A., Freiesleben, P.V., Labuda, R., et al. 2011. Production of fumonisins B₂ and B₄ in *Tolypocladium* species. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 38 (9):1329-1335.
- Montiel, H.V. 2004. Patógenos emergentes en micosis cutáneas y sistémicas. *Dermatología Venezolana* 42: 4-18.
- Moreno, E.C., Garcia, G.T., Ono, M.A., Vizoni, E., et al. 2009. Co-occurrence of mycotoxins in corn samples from the Northern region of Paraná State, Brazil. *Food Chemistry* 116: 220-226.
- Mulé, G., Susca, A., Stea, G., Moretti, A. 2004. A species-specific PCR assay based on the calmodulin partial gene for identification of *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. subglutinans*. *European Journal of Plant Pathology* 110: 495-502.
- Nayaka, S.C., Shankar, U., Niranjana, S.C., Wulff, E.G., et al. 2010. Detection and quantification of fumonisins from *Fusarium verticillioides* in maize grown in southern India. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 26: 71-78.
- Nicolaisen, M., Supronienė, S., Nielsen, L.K., Lazzaro, I., et al. 2009. Real-time PCR for quantification of eleven individual *Fusarium* species in cereals. *Journal of Microbiological Methods* 76: 234-240.
- Nirenberg, H.I. 1976. Untersuchungen über die morphologische und biologische Differenzierung in der *Fusarium*-Section *Liseola*. Berlin-Dahlem: *Mitt Biol Bundesanst für Land- und Forstwirt.* 169: 1-117.
- Noonim, P., Mahakarnchanakul, W., Nielsen, K.F., Frisvad, J.C., Samson, R.A. 2009. Fumonisin B₂ production by *Aspergillus niger* in Thai coffee beans. *Food Additives and Contaminants* 26 (1): 94-100.
- Novais, C.M., Pires-Alves, M. 2004. PCR em tempo real. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento* 33: 10-13. Nucci, M., Anaissie, E. 2002. Cutaneous Infection by *Fusarium* Species in Healthy and Immunocompromised Hosts: Implications for Diagnosis and Management. *CID* 35: 909-920.

- Nucci, M., Anaissie, E. 2002. Cutaneous Infection by *Fusarium* Species in Healthy and Immunocompromised Hosts: Implications for Diagnosis and Management. *CID* 35: 909-920.
- Oliveira, N., dos Santos, T., Lacerda Durães, N., Alkimim, E., et al. 2011. Uso de Marcadores ISSR em populações patogênicas e não patogênicas de *Fusarium* spp. provenientes de Bananais do Norte de Minas Gerais. *Fórum de Ensino, Pesquisa, Extensão e Gestão*.
- Ono, E.Y.S., Fungaro, M.H.P., Sofia, S.H., Miguel, T.A., et al. 2010. *Fusarium verticillioides* Strains Isolated from Corn Feed: Characterization by Fumonisin Production and RAPD Fingerprinting. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 53 (4): 953-960.
- Orsi, R. B., Corrêa, B., Pozzi, C. R., Schammas, A. E., et al. 2000. Mycoflora and occurrence of fumonisins in freshly harvested and stored hybrid maize. *Journal of Stored Products Research* 36 (1): 75-87.
- Osweiler, G.D., Ross, P.F., Wilson, T.M., Nelson, P.E., et al. 1992. Characterization of an epizootic of pulmonary edema in swine associated with fumonisin in corn screenings. *Journal Veterinary Diagnostic Investigation* 4: 53-59.
- Otoni, J.L. 2008. Análise da incidência de *Fusarium* spp.toxigênicos e de níveis de fumonisina em grãos ardidos de milho híbrido. Dissertação de Mestrado, Universidade Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, ESALQ, Piracicaba.
- Palmero, D., González, M.C., Iglesias, C., Ruíz, G., Tello, J. C. 2008. Effects of water potential on spore germination and viability of *Fusarium* species. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35: 1411-1418.
- Pamphile, J.A., Azevedo, J. L. 2002. Molecular characterization of endophytic strains of *Fusarium verticillioides* (= *Fusarium moniliforme*) from maize (*Zea mays* L). *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 18: 391–396.
- Passarini, M.R.Z., Santos, C., Lima, N., Berlinck, R.G.S., Sette, L.D. 2013. Filamentous fungi from the Atlantic marine sponge *Drumacidon reticulatum*. *Archives of Microbiology* 195 (2): 99-111.
- Patiño, B., Mirete, S., Vázquez, C., Jiménez, M., et al. 2006. Characterization of *Fusarium verticillioides* strains by PCR-RFLP analysis of the intergenic spacer region of the rDNA. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86:429–435.
- Pelizza, S.A., Stenglein, S.A., Cabello, M.N., Dinolfo, M.I., et al. 2011. First Record of *Fusarium verticillioides* as an Entomopathogenic Fungus of Grasshoppers. *Journal of Insect Science* 11 (70): 1-8.
- Pereira, L.; Dias, N.; Santos, C.; Lima, N. 2013. The use of MALDI-TOF ICMS as an alternative tool for *Trichophyton rubrum* identification and typing. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 31:1.

- Pereiro, M.J., Labandeira, J., Toribio, J. 1999. Plantar hyperkeratosis due to *Fusarium verticillioides* in a patient with malignancy. *Clinical and Experimental Dermatology* 24: 175–178
- Pfenning, L.H. 2002. O gênero *Fusarium*: novas tendências na sistemática e patossistemas emergentes. *Fitopatologia Brasileira* 27: 21-23.
- Picot, A., Barreau, C., Pinson-Gadais, L., Caron, D., et al. 2010. Factors of the *Fusarium verticillioides*-maize environment modulating fumonisin production. *Critical Reviews in Microbiology* 36 (3): 221–231.
- Pierce, B.A. 2004. *Genética, um enfoque conceitual*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.
- Pozzi, C.R., Corrêa, B., Gambale, W., Paula, C. R., et al. 1995. Post-harvest and stored corn in Brazil: mycoflora interaction, abiotic factors and mycotoxins occurrence. *Food Additives and Contaminants* 12 (3): 313-319.
- 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. *Fungal Genetics and Biology* 27: 100–112.
- Proctor, R.H., Brow, D.W., Plattner, R.D., Desjardins, A.E. 2003. Co- expression of 15 contiguous genes delineates a fumonisin biosynthetic gene cluster in *Gibberella moniliformis*. *Fungal Genetics and Biology* 27: 100-112.
- Proctor, R.H., Busman, M., Seo, J.A., Lee, Y.W., Plattner, R.D. 2008. A fumonisin biosynthetic gene cluster in *Fusarium oxysporum* strain O-1890 and the genetic basis for B versus C fumonisin production. *Fungal Genetics and Biology*, 45: 1016-1026.
- Queiroz, B., Pereyra, C.M., Keller, K.M., Almeida, T., et al. 2013. Fungal contamination and determination of fumonisins and aflatoxins in commercial feeds intended for ornamental birds in Rio de Janeiro, Brazil. *Letters in Applied Microbiology* 57: 405-411.
- Reis, T.A., Zorzete, P., Pozzi, C.R., Silva, V.N., et al. 2010. Mycoflora and fumonisina contamination in Brazilian sorghum from sowing to harvest. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90: 1445–1451.
- Reyes-Velázquez, W.P., Figueroa-Gómez, R.M., Barberis, M., Reynoso, M.M., et al. 2011. *Fusarium* species (section Liseola) occurrence and natural incidence of beauvericin, fusaproliferin and fumonisins in maize hybrids harvested in Mexico. *Mycotoxin Research* 27:187–194.
- Richard, G.F., Hennequin, A.T., Dujon, B. 1999. Trinucleotide repeats and other microsatellites in yeasts. *Research Microbiology* 150: 589-602.
- Rocha, L.O., Reis, G.M., Silva, V.N., Braghini, R., et al. 2012. Molecular characterization and fumonisin production by *Fusarium verticillioides* isolated from

corn grains of different geographic origins in Brazil. *International Journal of Food Microbiology* 31: 9-21.

- Rodrigues, P., Santos, C., Venâncio, A., Lima, N. 2011. Species identification of *Aspergillus* section *Flavi* isolates from Portuguese almonds using phenotypic, including MALDI-TOF ICMS, and molecular approaches. *Journal of Applied Microbiology* 111: 877-892.
- Rohlf, F.J. 1988. NTSYS-*pc*: Numerical taxonomy and multivariate analysis system. NY: Exeter Software, *Applied Biostatistics*.
- Rupollo, G., Gutkoski, L.C., Martins, I.R., et al. 2006. Efeito da umidade e do período d.e armazenamento hermético na contaminação natural por fungos e a produção de micotoxinas em grãos de aveia. *Ciência e Agrotecnologia* 30: 118-125.
- Ryu, D., Munimbazi, C., Bullerman, L.B. 1999. Fumonisin B₁ Production by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* as affected by cycling temperatures. *J. Food Protect.*, 62: 1456-1460.
- Sampietro, D.A., Martin, P., Iglesias, J., Presello, D.A. et al. 2010. A molecular based strategy for rapid diagnosis of toxigenic *Fusarium* species associated to cereal grains from Argentina. *Fungal Biology* 114: 74-81.
- Sánchez-Rangel, D., Sanjuan-Badillo, A., Plasencia, J. 2005. Fumonisin production by *Fusarium verticillioides* isolated from maize in Mexico and development of a polymerase chain reaction to detect potential toxigenic strains in grains. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 53: 8565-8571.
- Santos, C., Paterson, R.R.M., Venâncio, A., Lima, N. 2009. Filamentous fungal characterizations by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Applied Microbiology* 108: 375–385.
- Santos, C., Lima, N. 2010. A Identificação de Fungos pela Espectrometria de Massa Através da Técnica de MALDI TOF ICMS. *Anais do VI Cong Bras Micol* (Eds.: J.C. Dianese, L.T.P. Santos), Sociedade Brasileira de Micologia, CD-Rom, pag. 566-574.
- Santos C, Lima N, Sampaio P, Pais C. 2011. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight intact cell mass spectrometry (MALDI-TOF ICMS) to detect emerging pathogenic *Candida* species. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 71: 304-308.
- Santos, C.; Ventura, J.A.; Pereira, L.; Lima, N. 2012. A utilização da técnica de MALDI-TOF MS na identificação de fitopatógenos e no diagnóstico de doenças de plantas. *Revisão Anual de Patologia de Plantas* 20: 387-400.
- Schiabel, V.C. 2004. Genética e toxicidade de *Fusarium verticillioides* em grãos de milho (*Zea Mays* L.) sob plantio direto e convencional. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Londrina, São Paulo.

- Seefelder, W., Gossmann, M., Humpf, H. U. 2002. Analysis of fumonisin B₁ in *Fusarium proliferatum* infected asparagus spears and garlic bulbs from Germany by liquid chromatography_electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (10): 2778-2781.
- Serafini, L.A., Barros, N.M., Azvedo, J.L. 2002. Biotecnologia na agricultura e na agroindústria. Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul.
- Seyfarth, F., Ziemer, M., Sayer, H.G., Burmester, A. 2008. The use of ITS DNA sequence analysis and MALDI-TOF mass spectrometry in diagnosing an infection with *Fusarium proliferatum*. *Experimental Dermatology* 17: 965–971.
- Sforza, S., Dall'Asta, C., Marchelli, R. 2006. Recent advances in mycotoxin determination in food and feed by hyphenated chromatographic techniques/mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* 25: 54–76.
- Silva, M. 2007. Avaliação da presença de fungos e micotoxinas na tecnologia de pós colheita do milho. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Londrina, São Paulo.
- Silva, V.N., Araújo, J., Durigon, E.L., Corrêa, B. 2007. Sequence variability in the *FUM1* gene of *Fusarium verticillioides* strains. *Canadian Journal of Microbiology* 53: 446-449.
- Silva, D. M., Batista, L.R., Rezende, E.F., Fungaro, M.H.P., et al. 2011. Identification of fungi of the genus *Aspergillus* section *Nigri* using polyphasic taxonomy. *Brazilian Journal of Microbiology* 42: 761-773.
- Silva, F.C. 2012. Taxonomia polifásica de *Aspergillus* seção *Flavi* e aplicação de óleos essenciais para controle de fungos aflatoxigênicos. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais.
- Silva, R.L.C. 2013. Espécies de *Penicillium* em solos de caatinga e mata atlântica, produção de tanase e detecção do potencial micotoxigênico. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- Simões, M.F; Santos, C; Lima, N. 2013. Structural Diversity of *Aspergillus* (Section *Nigri*) Spores. *Microscopy and Microanalysis* 19: 1151-1158.
- Sleno, L; A Volmer, D. 2005. Some fundamental and technical aspects of the quantitative analysis of pharmaceutical drugs by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 19:1936.
- Somarin, Y.M., Bertuzzi, T., Battilani, P., Pietri, A. 2012. Aflatoxin and fumonisin contamination of yam flour from markets in Nigeria. *Food Control* 25: 53-58.
- Souza, A.E.F. 2007. Atividade antimicrobiana de extratos de alho e capim-santo sobre o desenvolvimento de *Fusarium moniliforme* isolado de grãos de milho. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

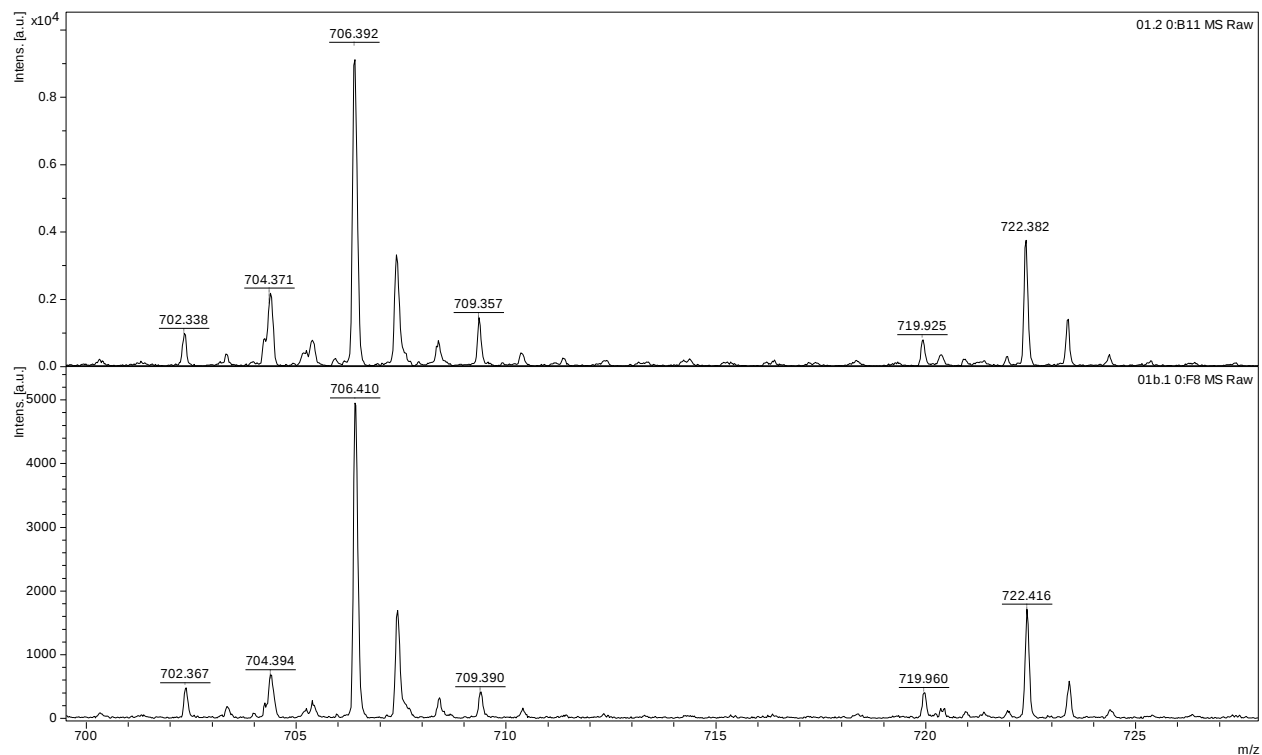
- Sreenivasa, M.Y., González-Jaen, M.T., Dass, R.S., Raj, A.P.C., Janardhana, G.R. 2010. A PCR-Based Assay for the Detection and Differentiation of Potential Fumonisin Producing *Fusarium verticillioides* Isolated from Indian Maize Kernels. *Food Biotechnology* 22:160–170.
- Stockmann-Juvala, H., Savolainen, K. 2008. A review of the toxic effects and mechanisms of action of fumonisin B1. *Human and Experimental Toxicology* 27: 799–809.
- Storari, M., Dennert, F.G., Bigler, L., Gessler, C., Broggini, G.A.L. 2012. Isolation of mycotoxins producing black aspergilli in herbal teas available on the Swiss market. *Food Control* 26: 157-161.
- Stumpf, R., Santos, J., Gomes, L.B., Silva, C.N., et al. 2013. *Fusarium* species and fumonisins associated with maize kernels produced in Rio Grande do Sul State for the 2008/09 and 2009/10 growing seasons. *Brazilian Journal of Microbiology* 44: 89-95.
- Sydenham, E.W., Thiel, P.G., Marasas, W.F.O., Shephard, G.S., et al. 1990. Natural occurrence of some *Fusarium* mycotoxins in corn from low and high esophageal cancer prevalence areas of the Transkei, Southern Africa. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 38 (10): 1900-1903.
- Tan, M.K., Niessen, L.M. 2003. Analysis of rDNA ITS sequences to determine genetic relationships among, and provide a basis for simplified diagnosis of *Fusarium* species causing crown rot and head blight of cereals. *Mycological Research* 107: 811–821.
- Theel, E.S. 2013. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization- Time of Flight Mass Spectrometry for the Identification of Bacterial and Fungal Isolates. *Clinical Microbiology Newsletter* 35 (19): 155-161.
- Theumer, M.G., López, A.G., Masih, D.T., Chulze, S.N., Rubinstein, H.R. 2002. Immunobiological effects of fumonisin B1 in experimental subchronic mycotoxicoses in rats. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 9: 149-155.
- Thiel, P.G., Marasas, W.F.O., Sydenham, E.W., Shephard, G.S., Gelderblom, W.C.A.; Nieuwenhuis, J.J. 1991. Survey of fumonisin production by *Fusarium* species. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 1089-1093.
- Tiago, P. V., Carneiro-Leão, M. P., Lima, M. L. A., Oliveira, N. T., Luna-Alves Lima, E. A. 2011. Polymorphism in *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae) based on internal transcribed spacer-RFLP, ISSR and intron markers. *Genetics and Molecular Research* 10 (3): 1565-1575.
- Torres, H. 2003. Infecciones em imunocomprometidos: Infecciones fúngicas emergentes. *Antibióticos e infección* 11: 49-54.
- Uegaki, R., Kobayashi, H., Tohno, M., Tsukiboshi, T. 2012. Identification of mycotoxin-producing *Fusarium* spp. isolated from corn and the changes in

- concentration of fumonisin during the cultivation period. *Grassland Science* 58: 121–126.
- Varga, J., Kocsubé, S., Suri, K., Szigeti, Gy., Szekeres, A., Varga, M., Tóth, B., Bartók, T. 2010. Fumonisin contamination and fumonisin producing black *Aspergilli* in dried vine fruits of different origin. *International Journal of Food Microbiology* 143: 143–149.
- Varga, J., Kocsubé, S., Suri, K., Szigeti, G., Szekereset et al. 2011. Fumonisin contamination and fumonisin producing black *Aspergilli* in dried vine fruits of different origin. *International Journal of Food Microbiology* 143: 143–149.
- Vargas, E.A., Castro, P.L., Silva, C.M.G. 2001. Co-occurrence of aflatoxins B₁, B₂, G₁, G₂, zearalenone and fumonisin B1 in Brazilian corn. *Food Additives and Contaminants* 18: 981–986.
- Visentin, I., Tamietti, G., Valentino, D., Portis, E., et al. 2009. The ITS region as a taxonomic discriminator between *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum*. *Mycological Research* 113: 1137–1145.
- Viswanathan, R., Poongothai, M., Malathi, P. 2011. Pathogenic and Molecular Confirmation of *Fusarium sacchari* Causing Wilt in Sugarcane. *Sugar Tech* 13 (1): 68–76.
- Von Bargen, S., Martinez, O., Schadock, I., Eisold, A.M., Gossmann, M., Buttner, C. 2009. Genetic Variability of phytopathogenic *Fusarium proliferatum* associated with crown rot in *Asparagus officinalis*. *Journal of Phytopathology* 157: 446–456.
- Wang, E., Norred, W.P., Bacon, C.W., Riley, R.T., Merrill, A.H. 1991. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. *Journal of Biological Chemistry* 266: 14486–14490.
- Wang, J., Zhou, Y., Wang, Q. 2008. Analysis of mycotoxin fumonisins in corn products by high-performance liquid chromatography coupled with evaporative light scattering detection. *Food Chemistry* 107: 970–976.
- Wang, J., Wang, X., Zhou, Y., Du, L., Wang, Q. 2010. Fumonisin detection and analysis of potential fumonisin-producing *Fusarium* spp. in asparagus (*Asparagus officinalis* L.) in Zhejiang Province of China. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90: 836–842.
- Wang, Y., He, C.H., Zheng, H., Zhang, H.B. 2012. Characterization and comparison of fumonisin B1-protein conjugates by six methods. *International Journal of Molecular Science* 13 (1): 84–96.
- Waskiewicz, A., Beszterda, M., Golinski, P. 2012. Occurrence of fumonisins in food – an interdisciplinary approach to the problem. *Food Control* 26: 491–499.
- Wild, C.P., Gong, W.W. 2010. Mycotoxins and human disease: a largely ignored global health issue. *Carcinogenesis* 31: 71–82.

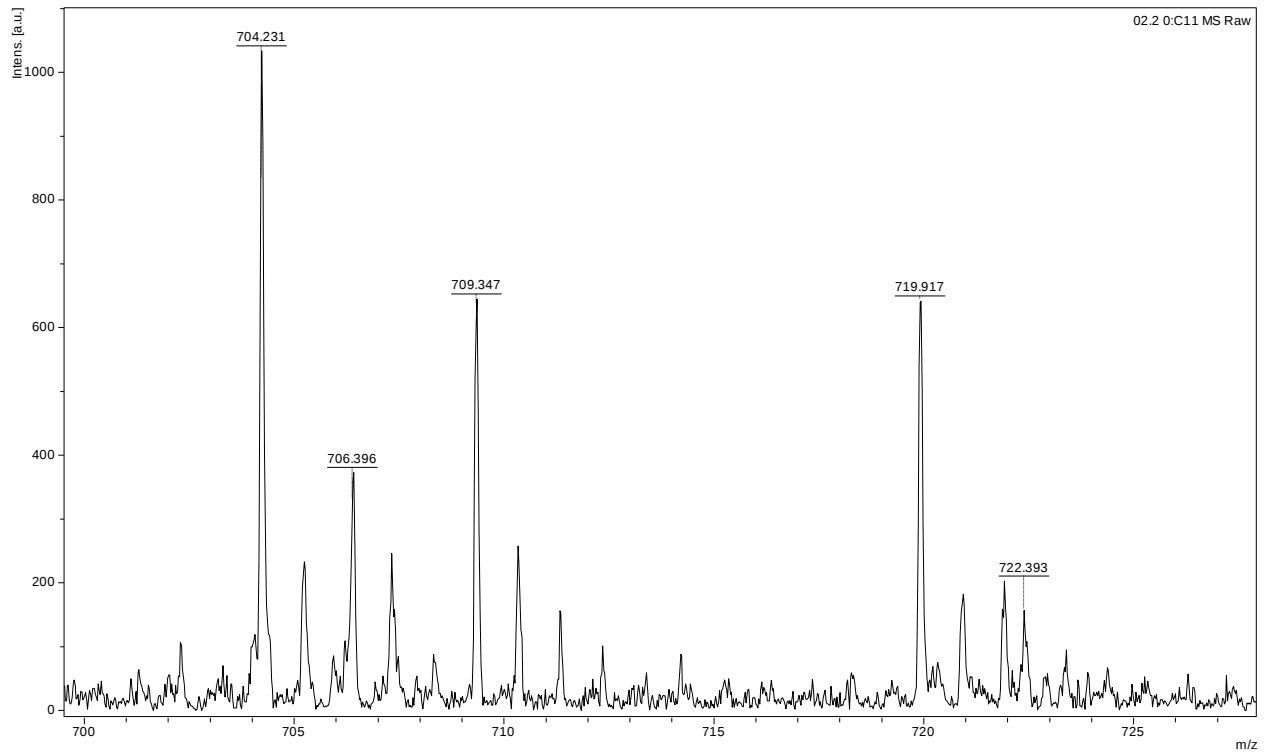
- Wollenweber, H.W, Reinking, O.A. 1935. *Die Fusarien, ihre Beschreibung, Schadwirkung und Bekämpfung*. Verlag Paul Parey, Berlin.
- Wong, M.L., Medrano, J.F. 2005. Relative PCR for mRNA quantification. *Biotechniques* 39: 75-85.
- Wulff, E.G., Sorensen, J.L., Lübeck, M., Nielsen, K.F., Thrane, U., Torp, J. 2010. *Fusarium* spp. associated with rice Bakanae: ecology, genetic diversity, pathogenicity and toxigenicity. *Environmental Microbiology* 12 (3): 649–657.
- Yang, F., Svensson, B., Finnie, C. 2011. Response of germinating barley seeds to *Fusarium graminearum*: The first molecular insight into *Fusarium* seedling blight. *Plant Physiology and Biochemistry* 49: 1362 - 1368.
- Yoshizawa, T., Yamashita, A., Luo, Y. 1994. Fumonisin occurrence in corn from high- and low-risk areas for human esophageal cancer in China. *Applied and Environmental Microbiology* 60 (5): 1626-1629.
- Xavier, J.J.M. 2007. Desenvolvimento de métodos para multi-toxinas por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrômetro de massa / massa. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Paraná.
- Zhang, L., Wang, J., Zhang, C., Wang, Q. 2013. Analysis of potential fumonisin-producing *Fusarium* species in corn products from three main maize-producing areas in eastern China. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 93: 693–701.

APÊNDICE

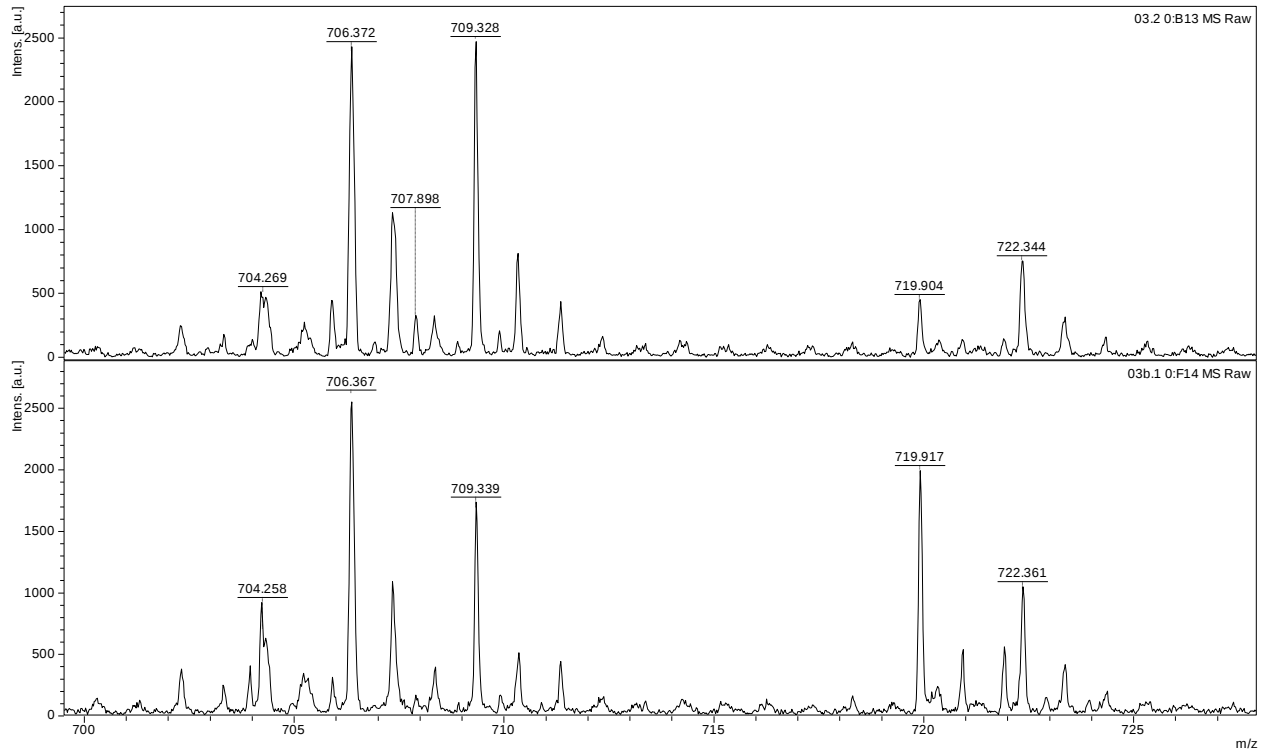
Espectros de detecção das fumonisinas B₁ e B₂ em isolados de *F. verticillioides* provenientes de culturas de milho do Estado de Pernambuco pela utilização da técnica de MALDI-TOF MS.

Amostra 01

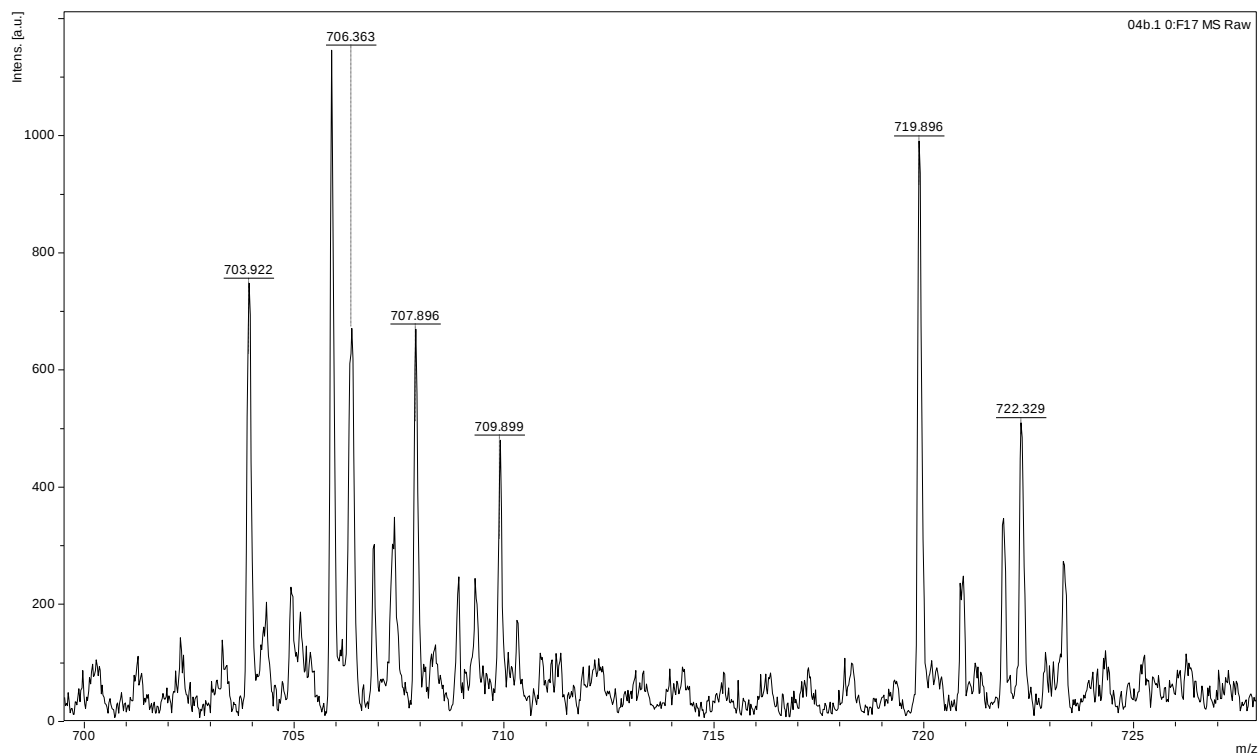
Amostra 02



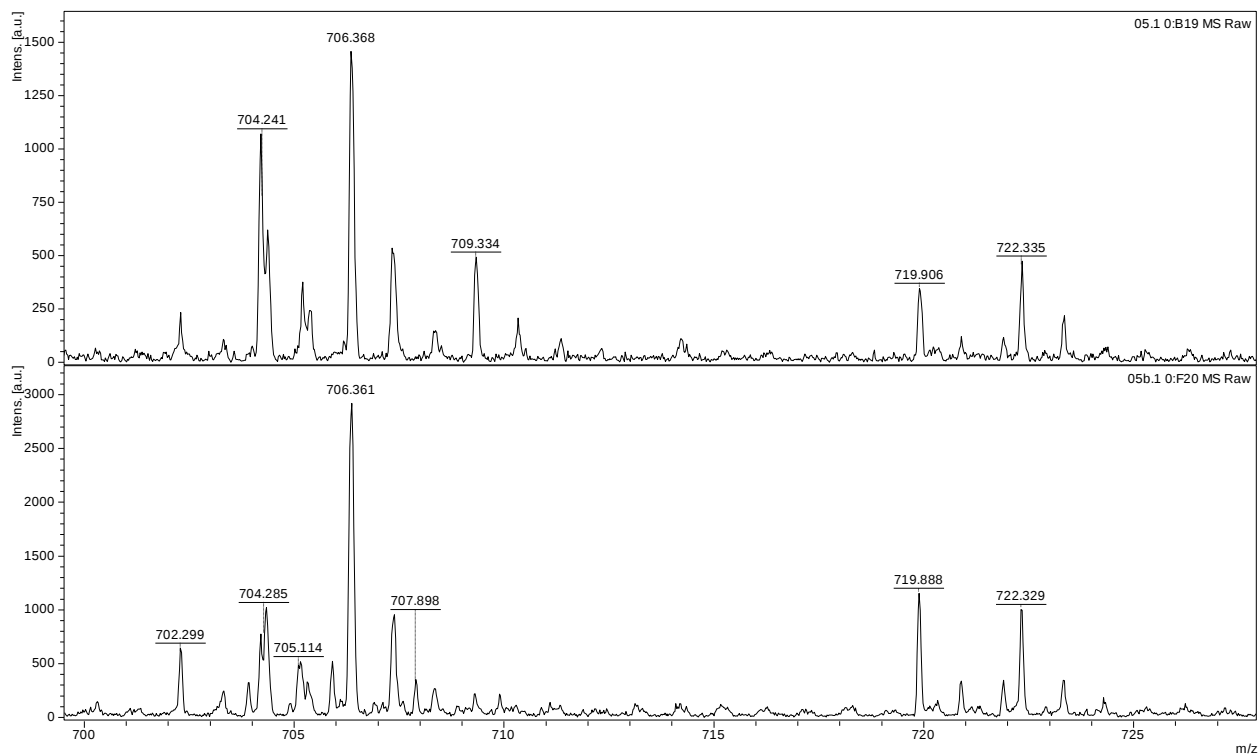
Amostra 03



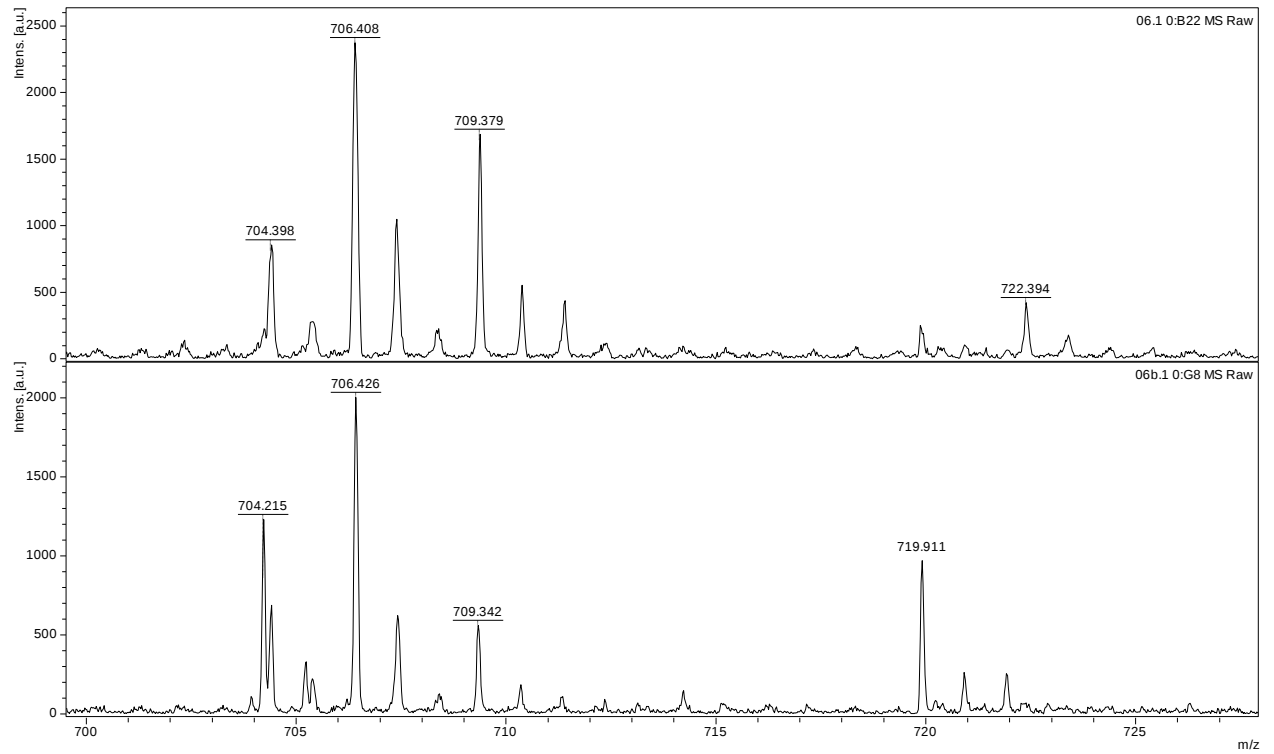
Amostra 04



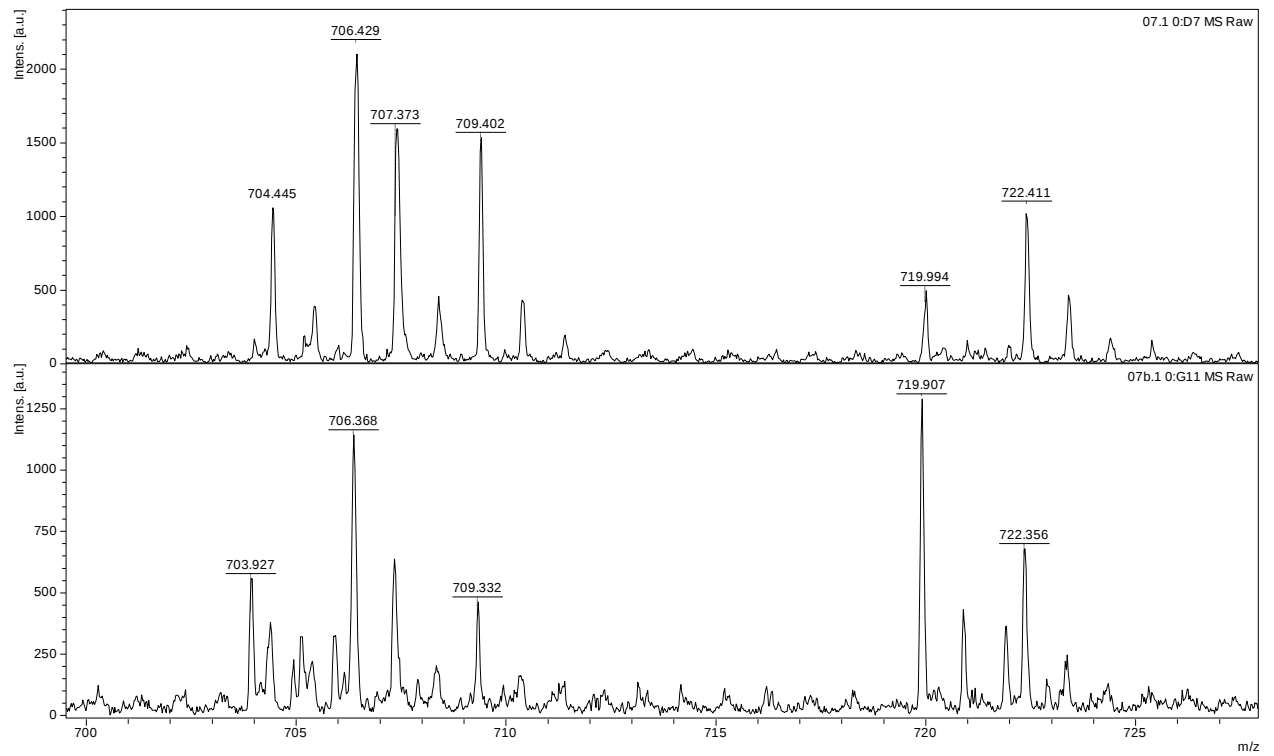
Amostra 05



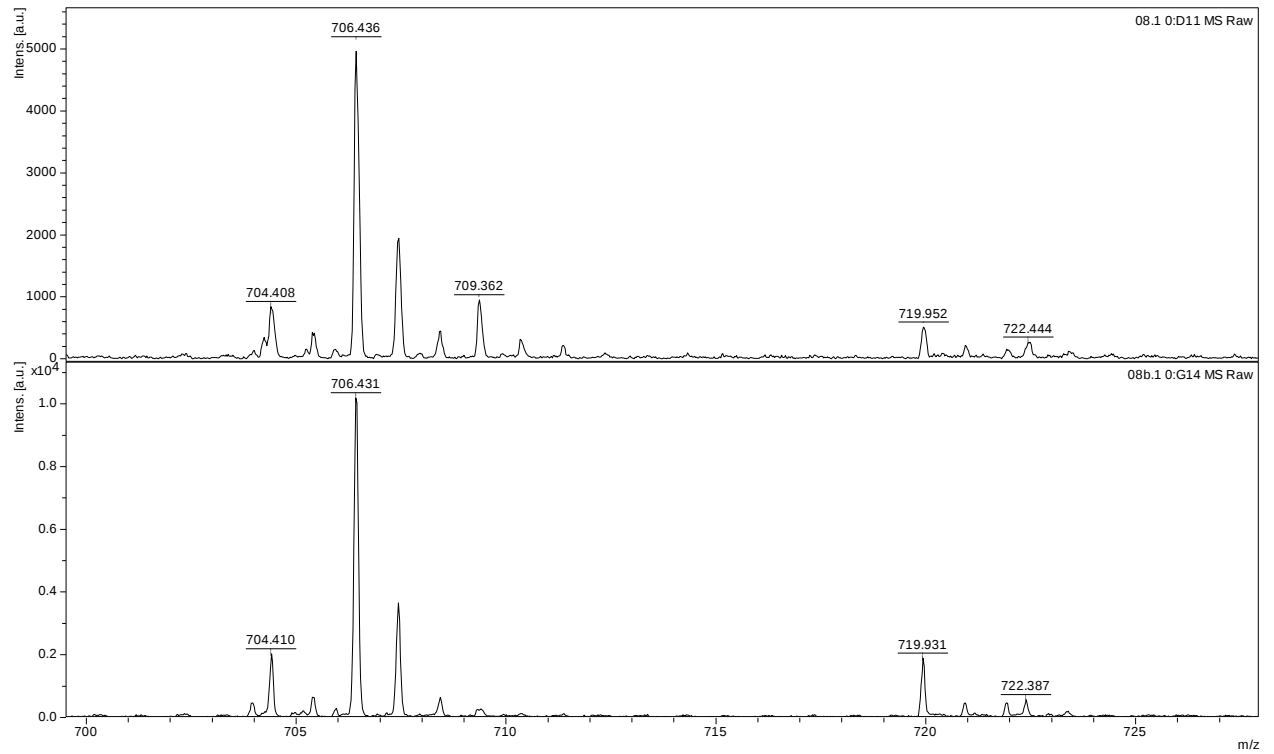
Amostra 06



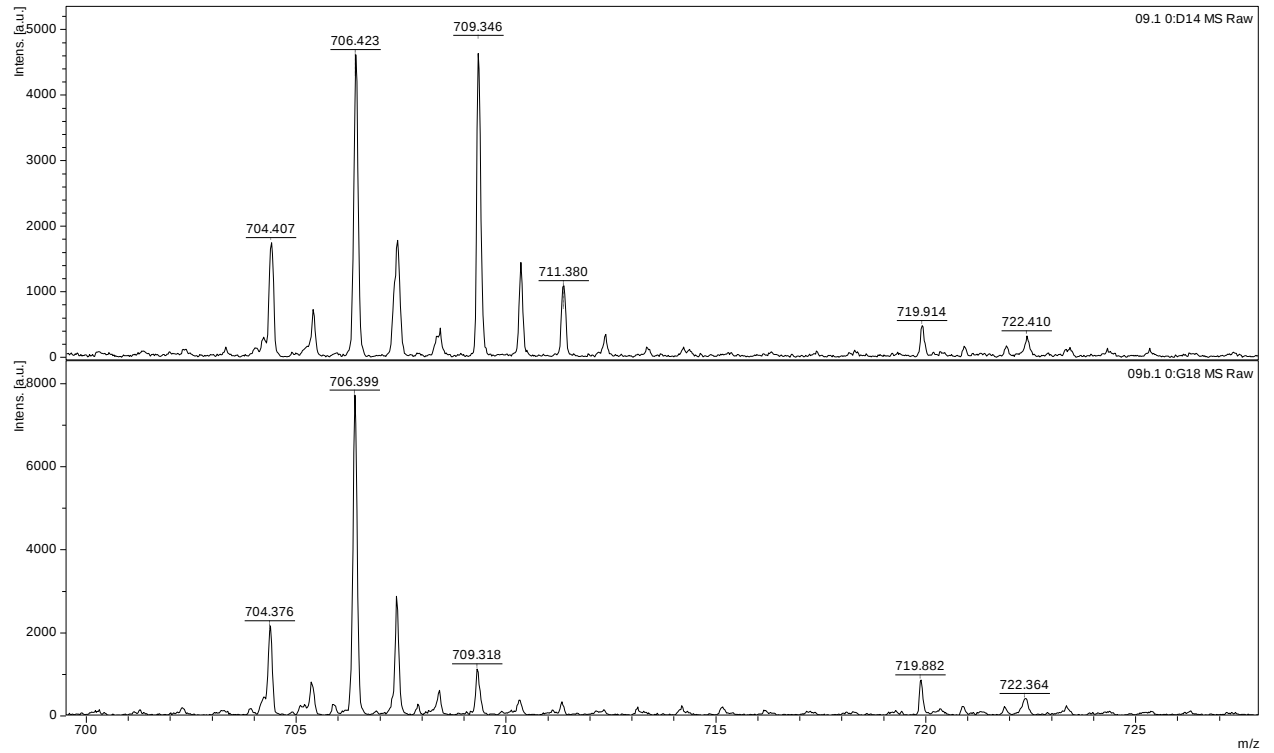
Amostra 07



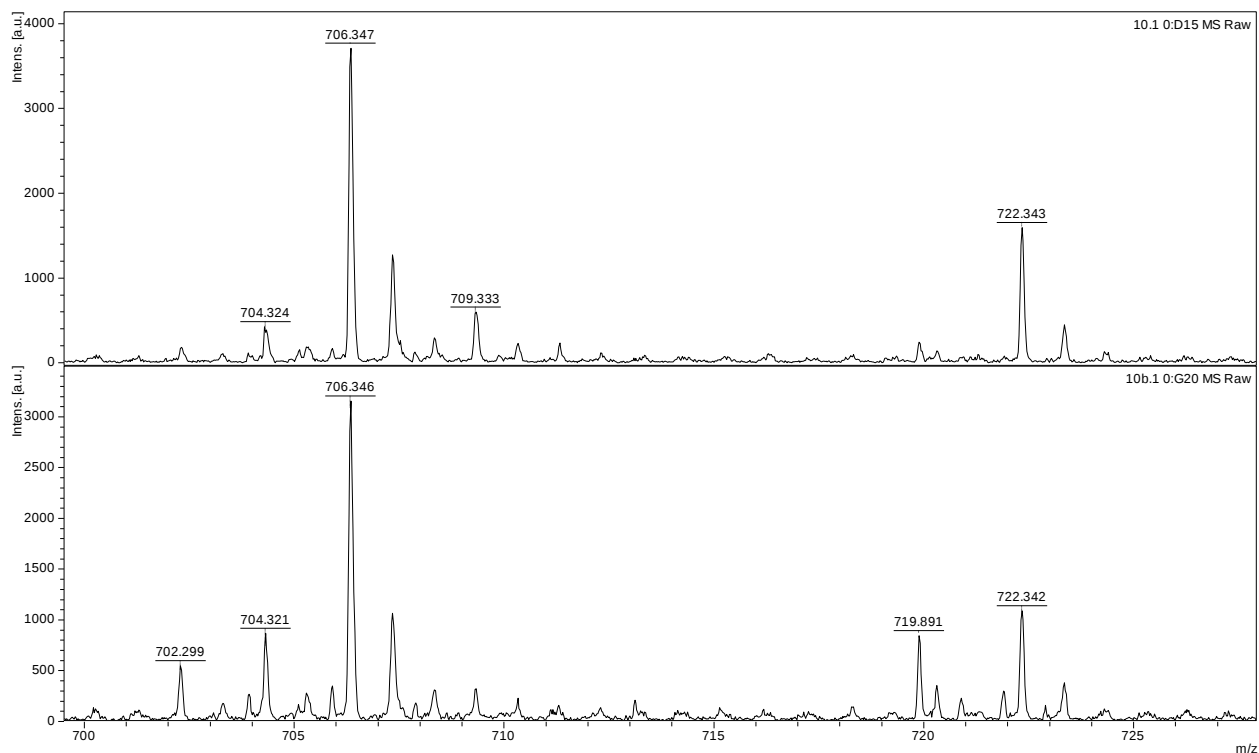
Amostra 08



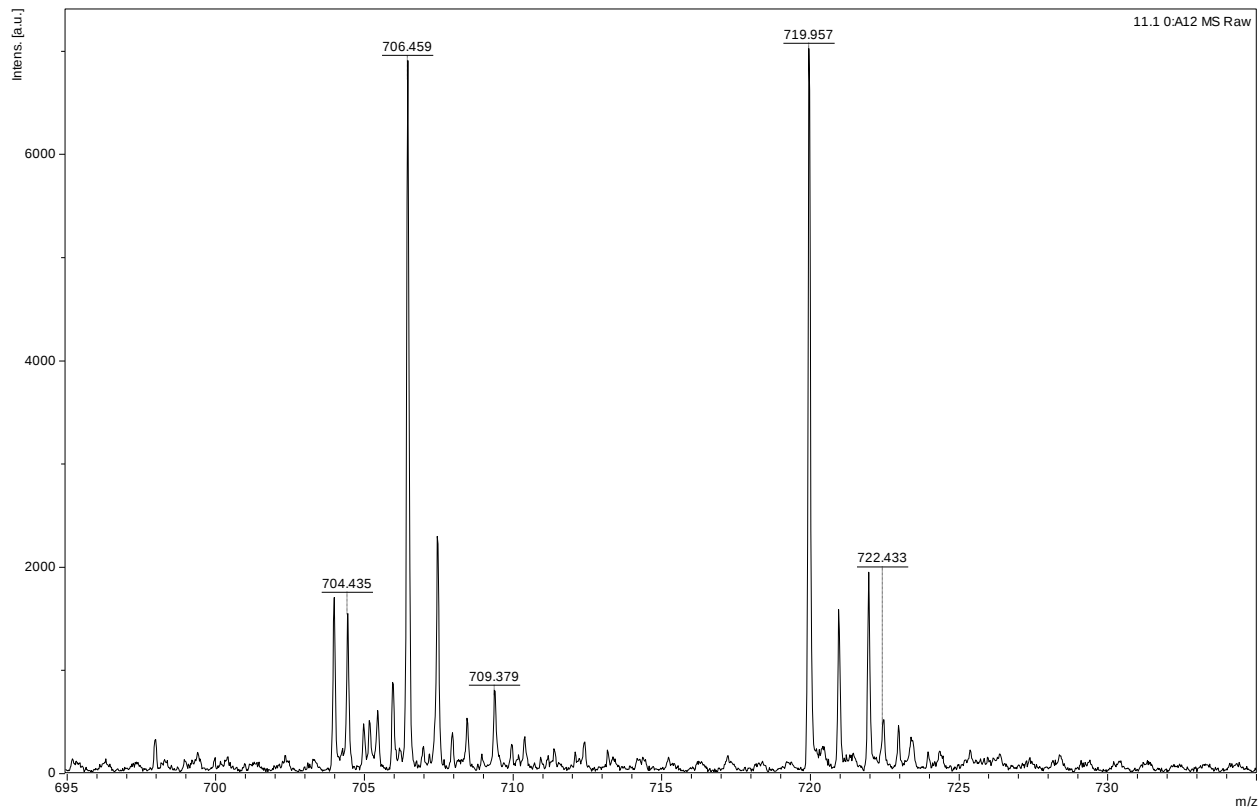
Amostra 09



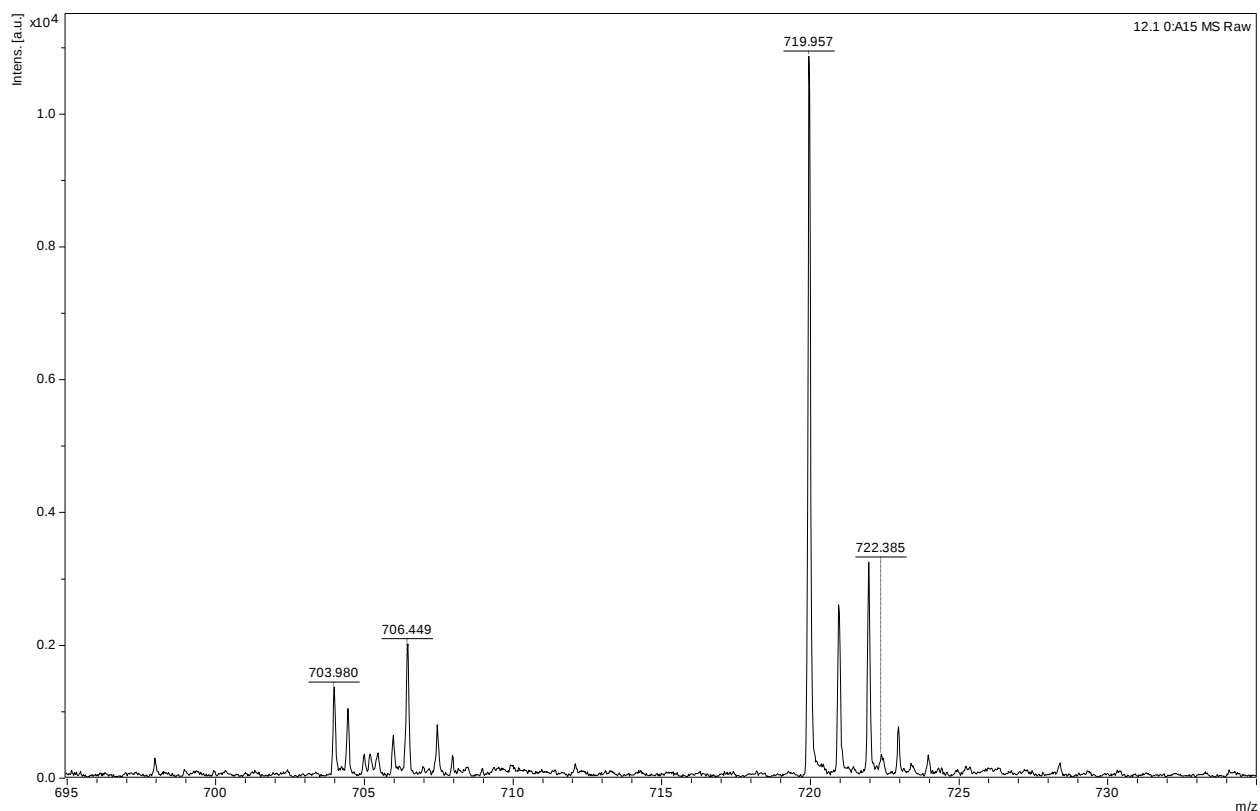
Amostra 10



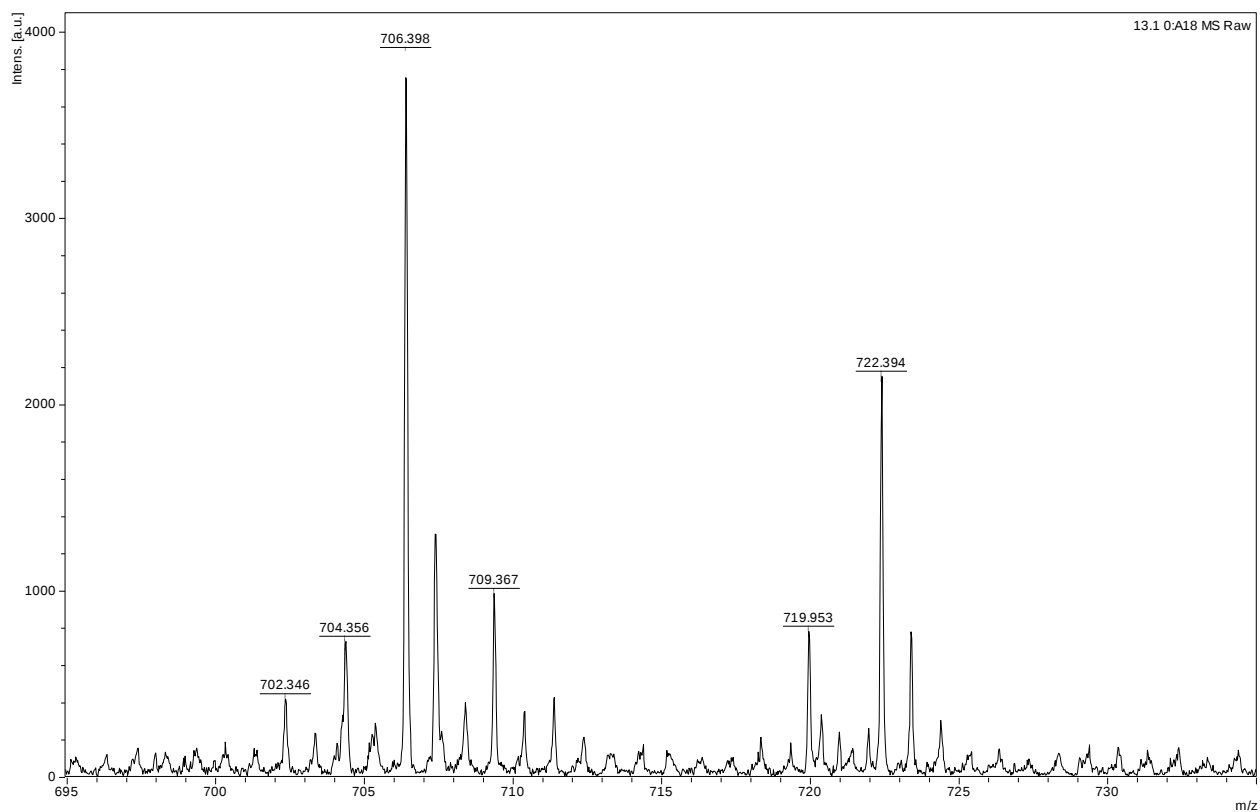
Amostra 11



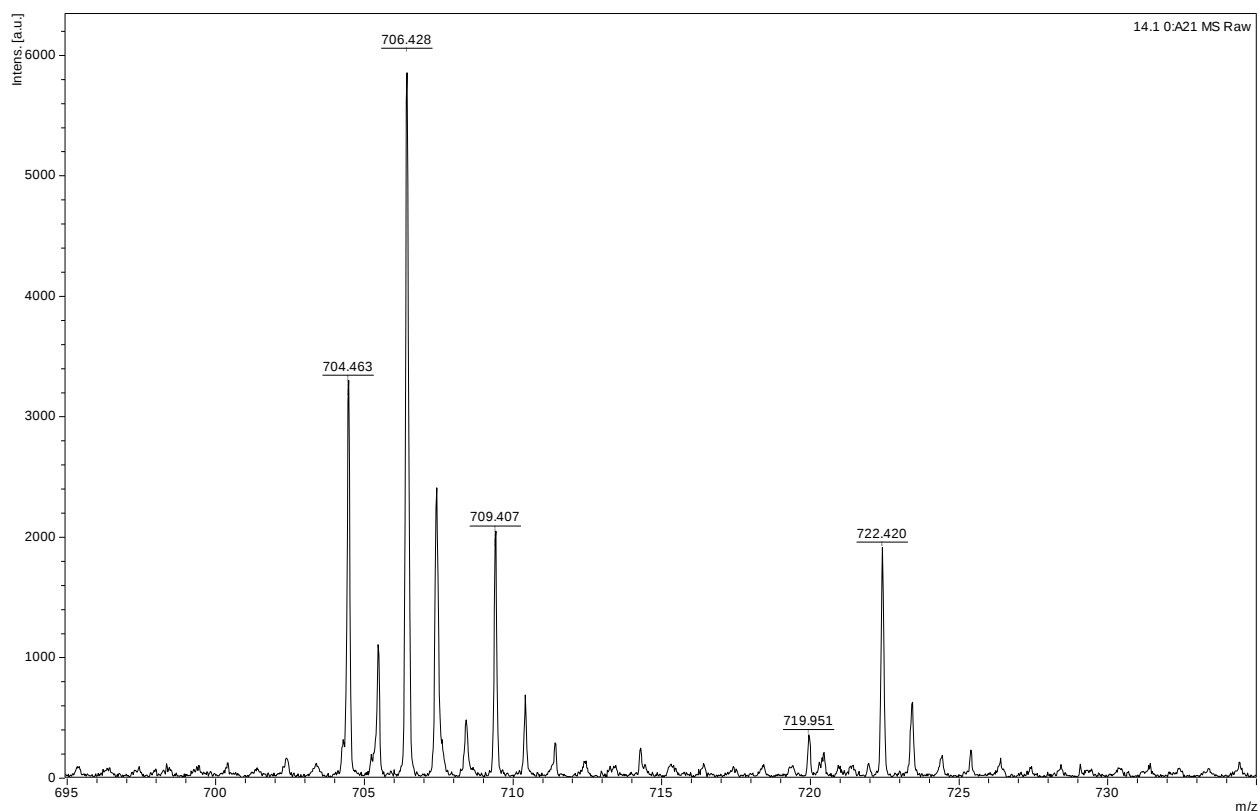
Amostra 12



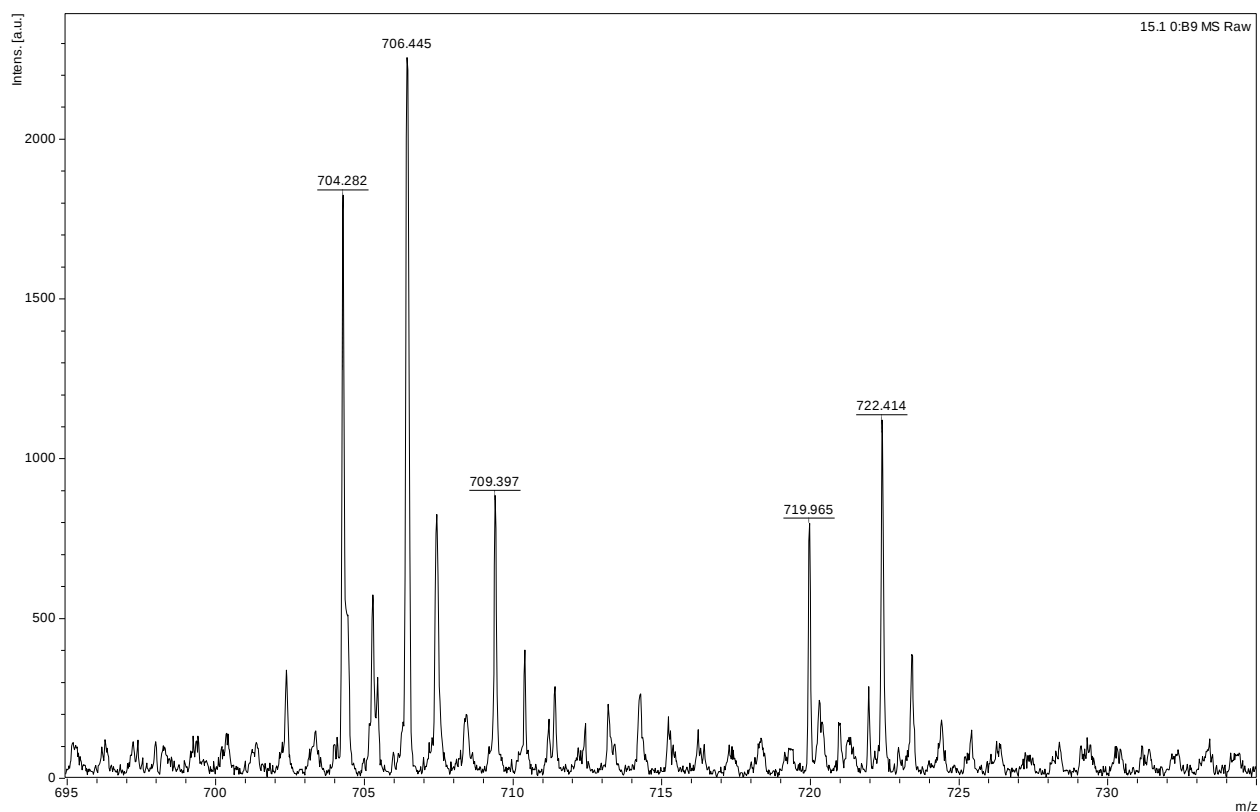
Amostra 13

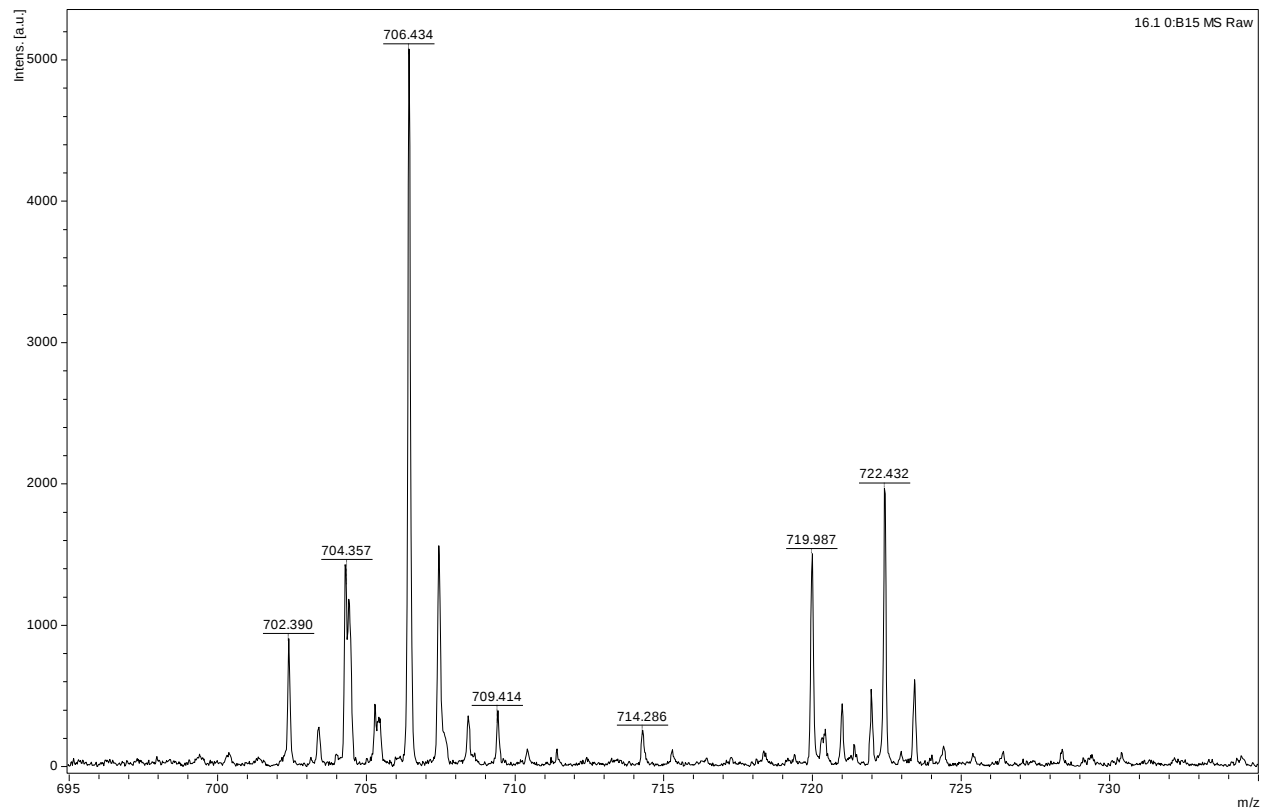
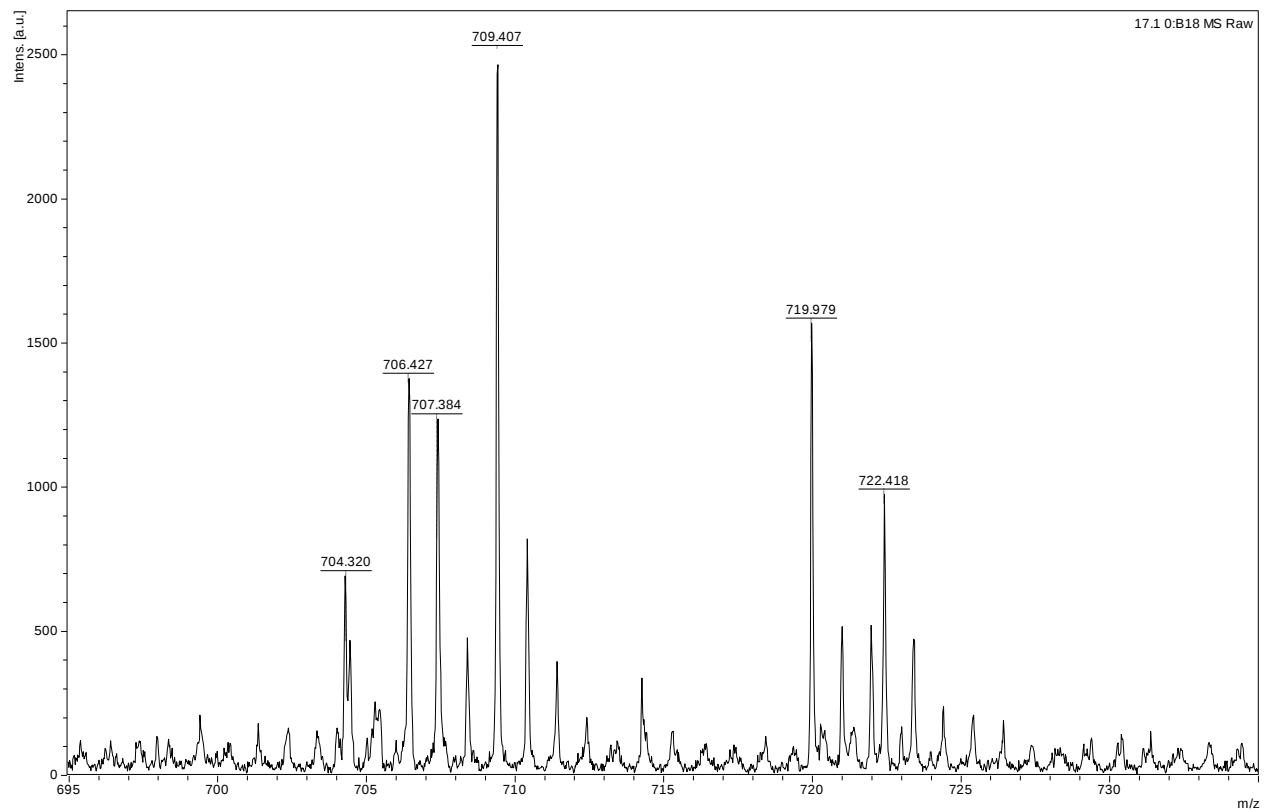


Amostra 14

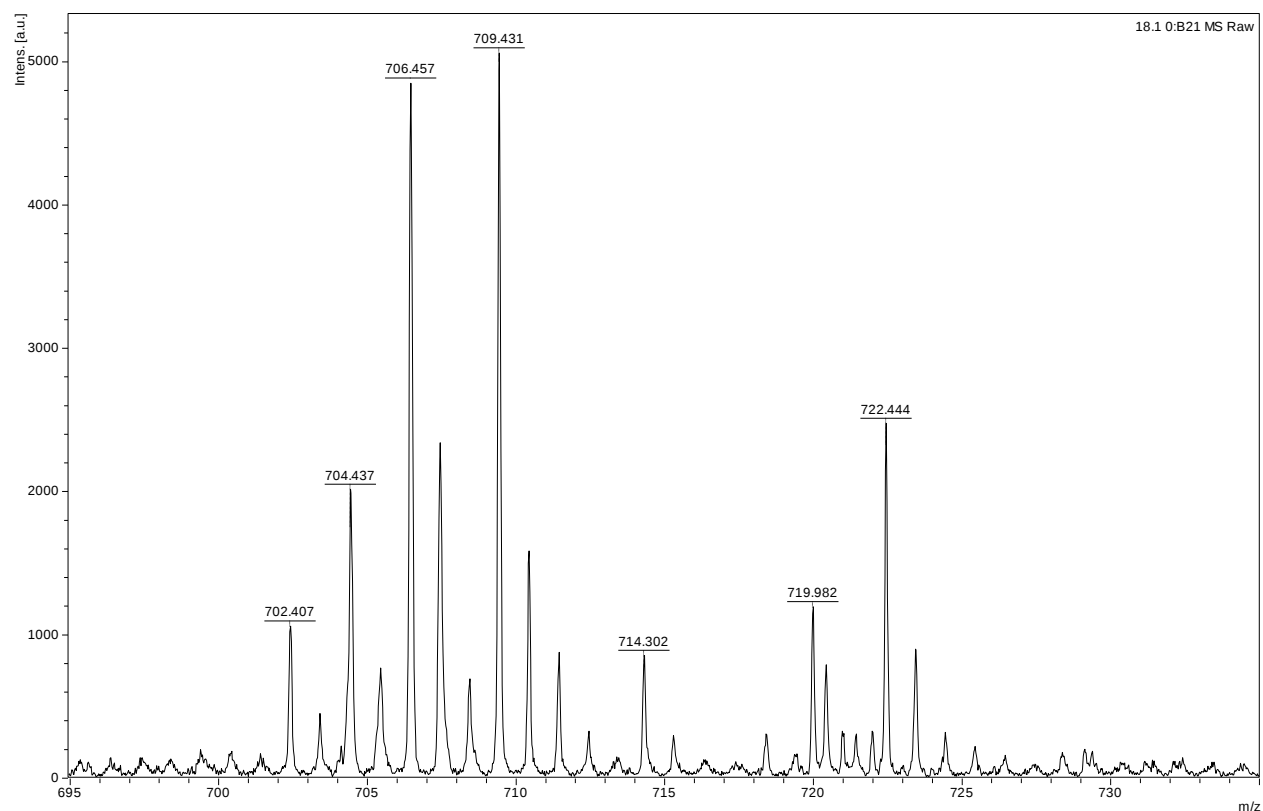


Amostra 15

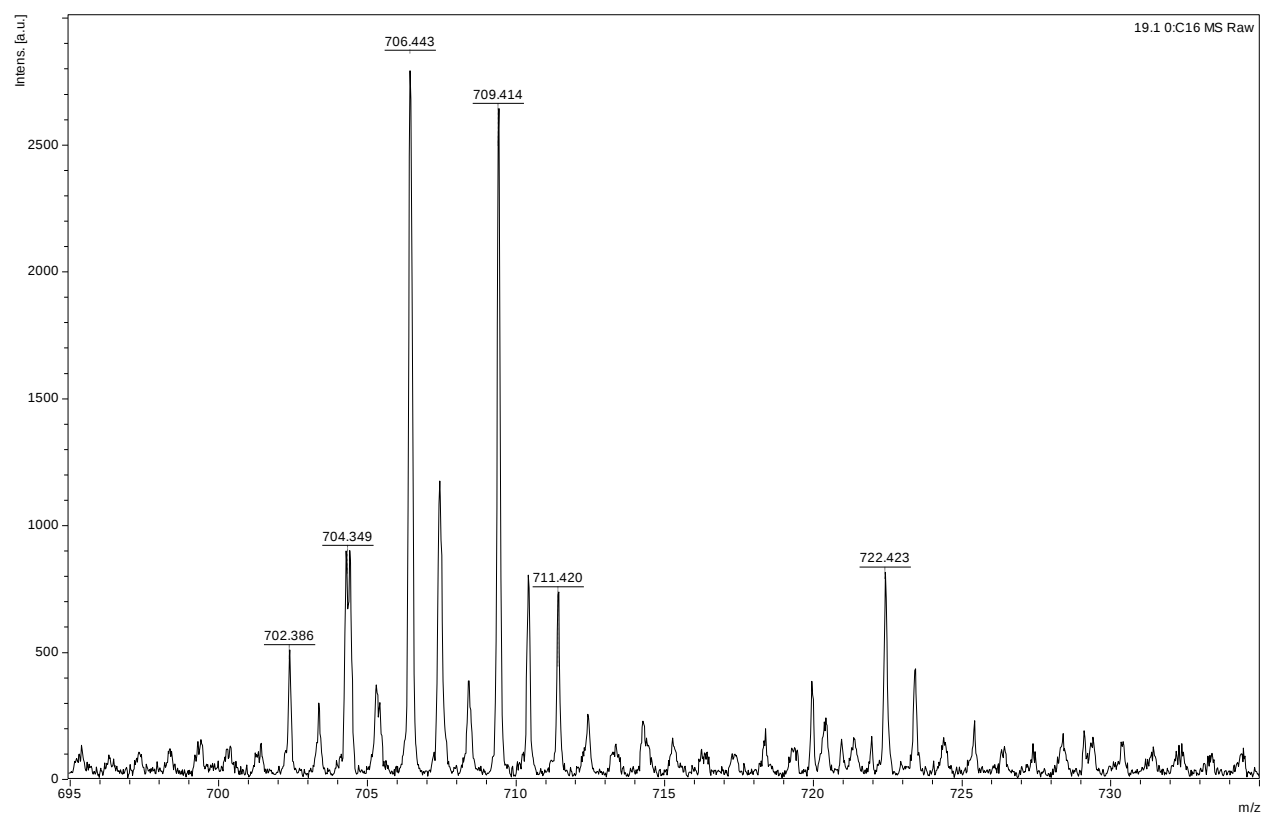


Amostra 16**Amostra 17**

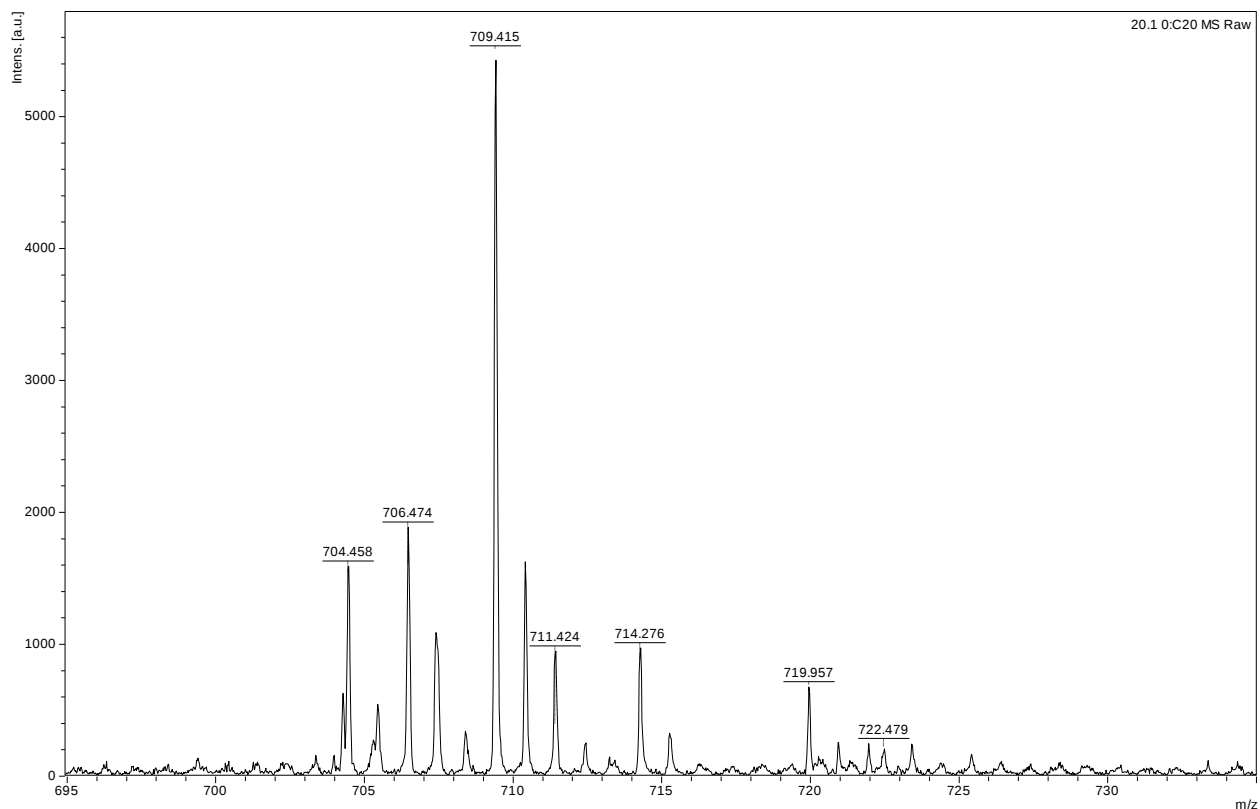
Amostra 18



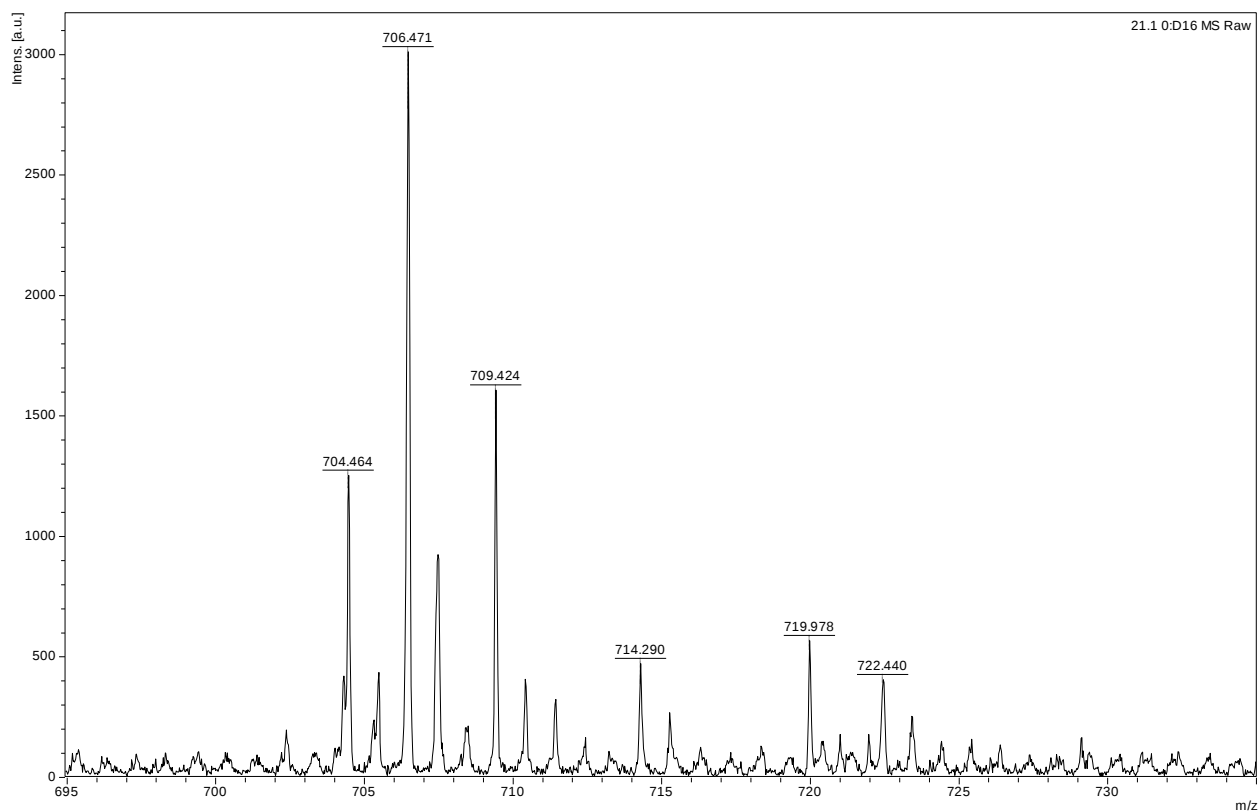
Amostra 19



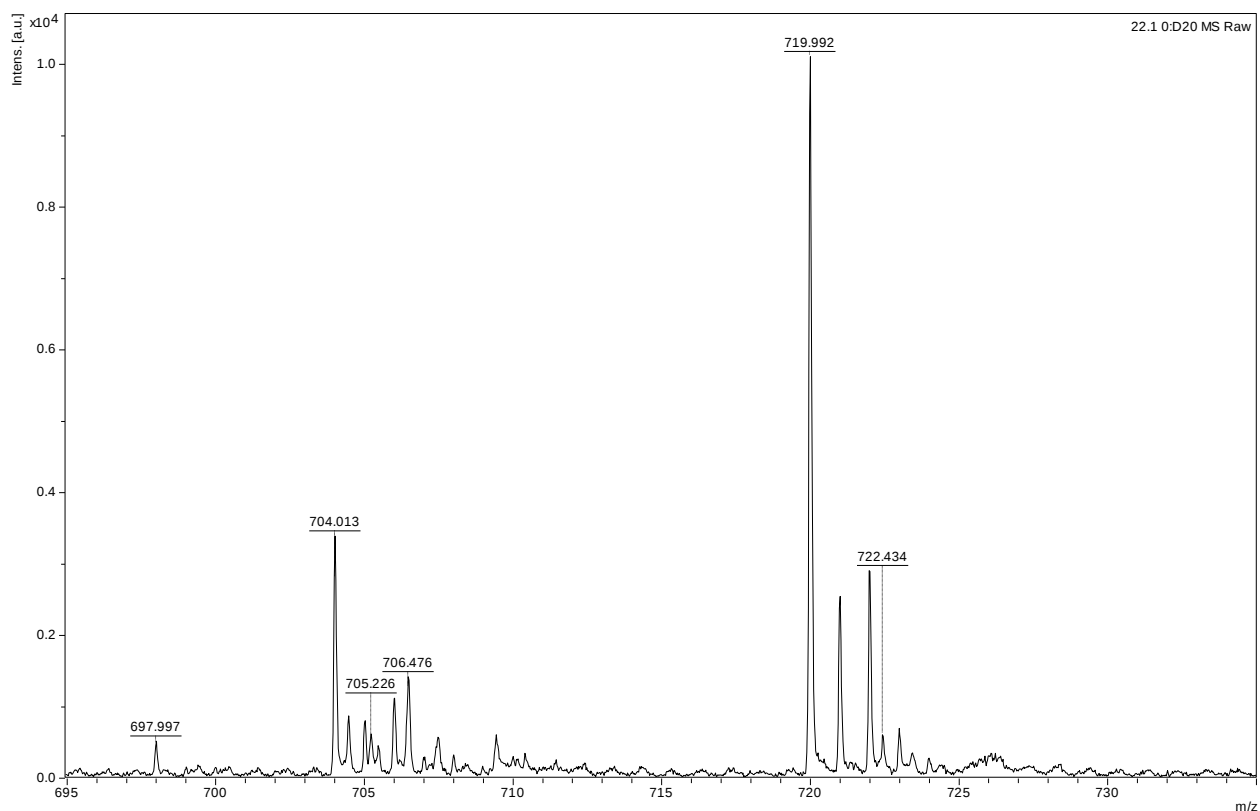
Amostra 20



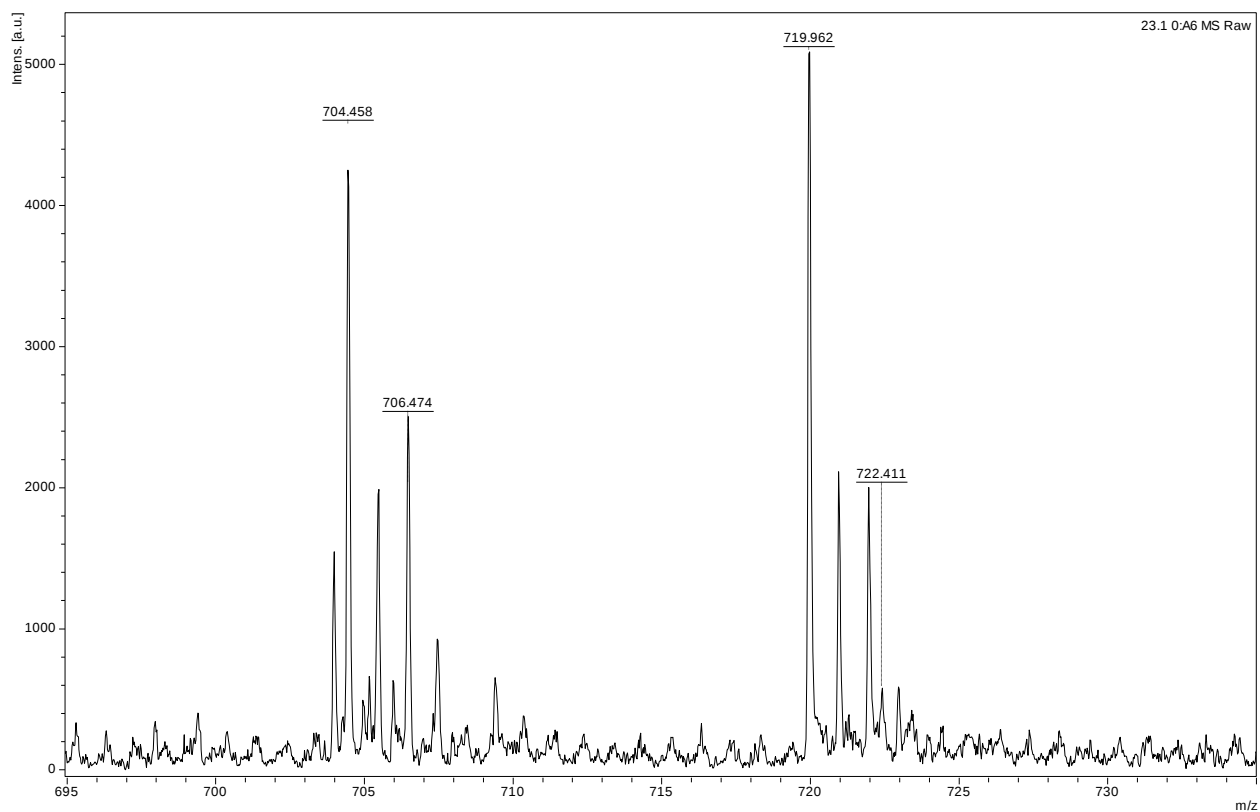
Amostra 21



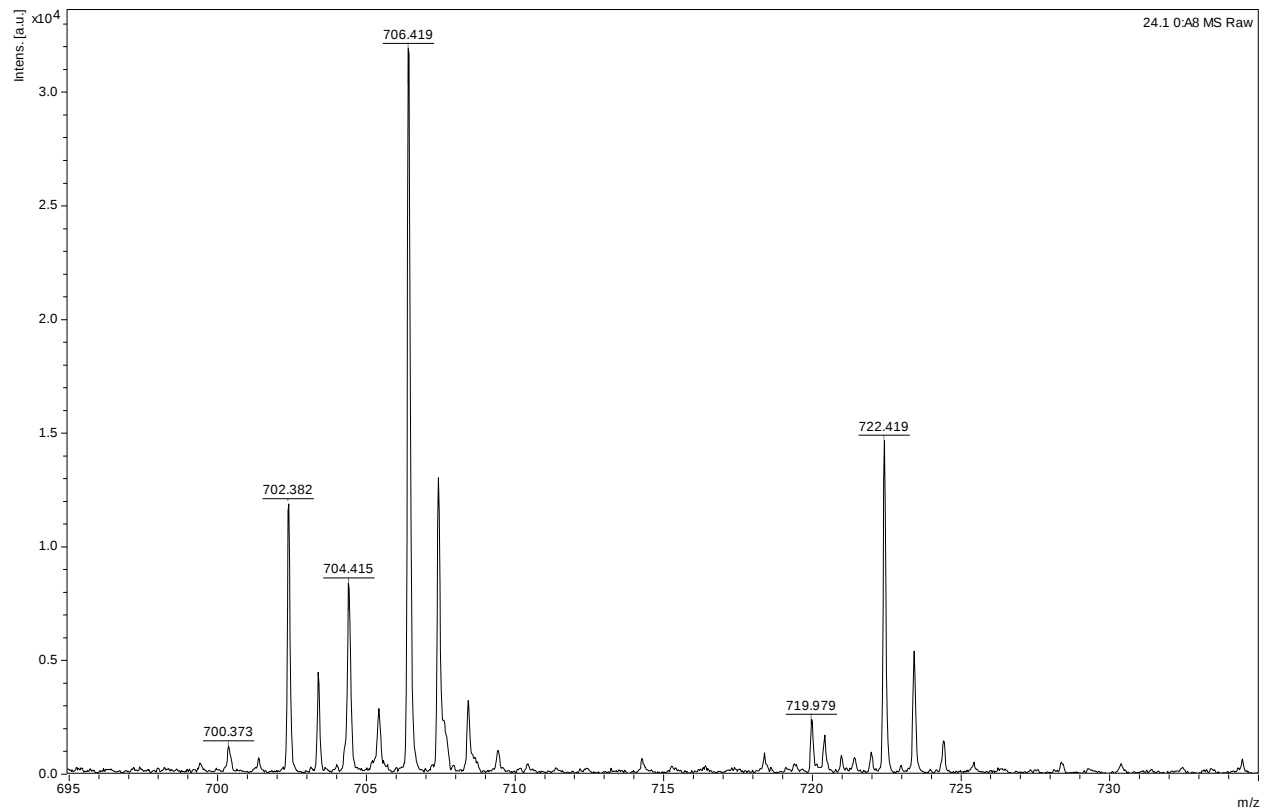
Amostra 22



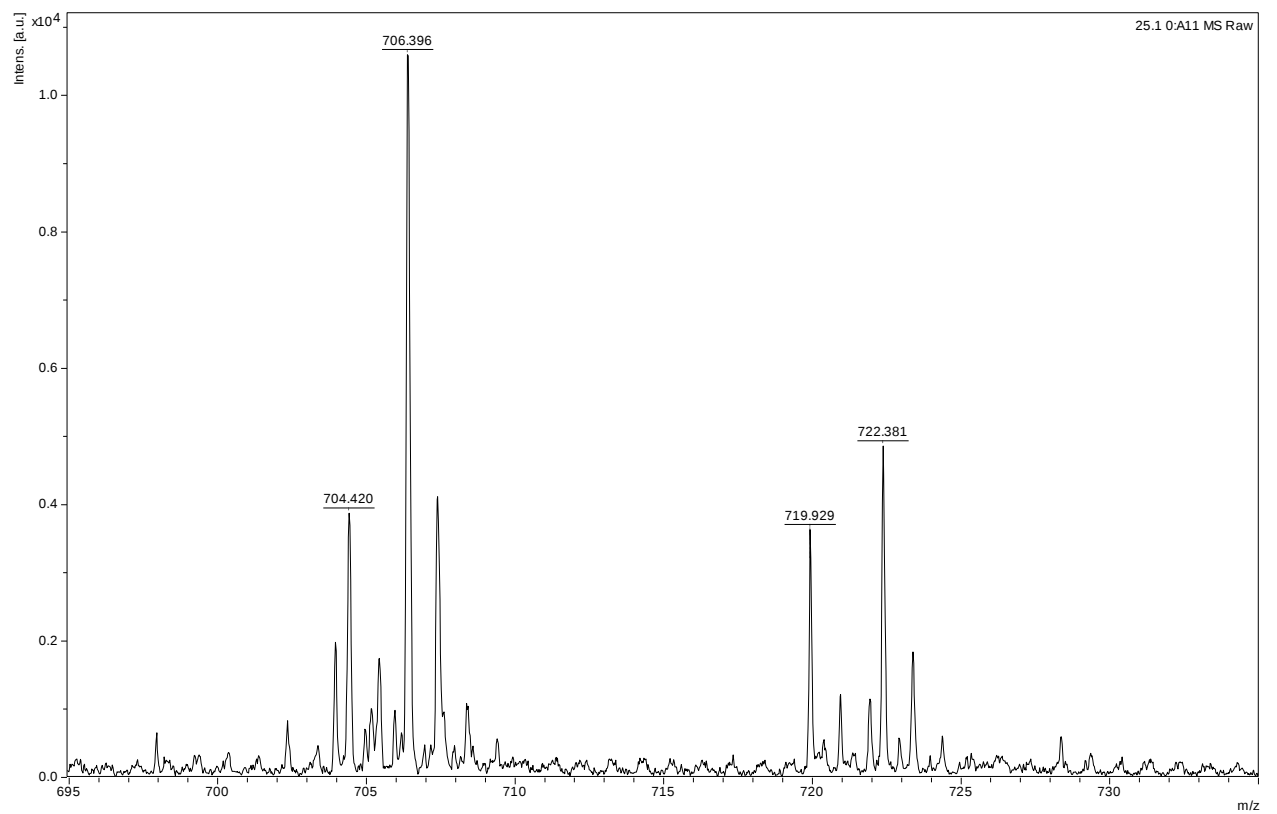
Amostra 23



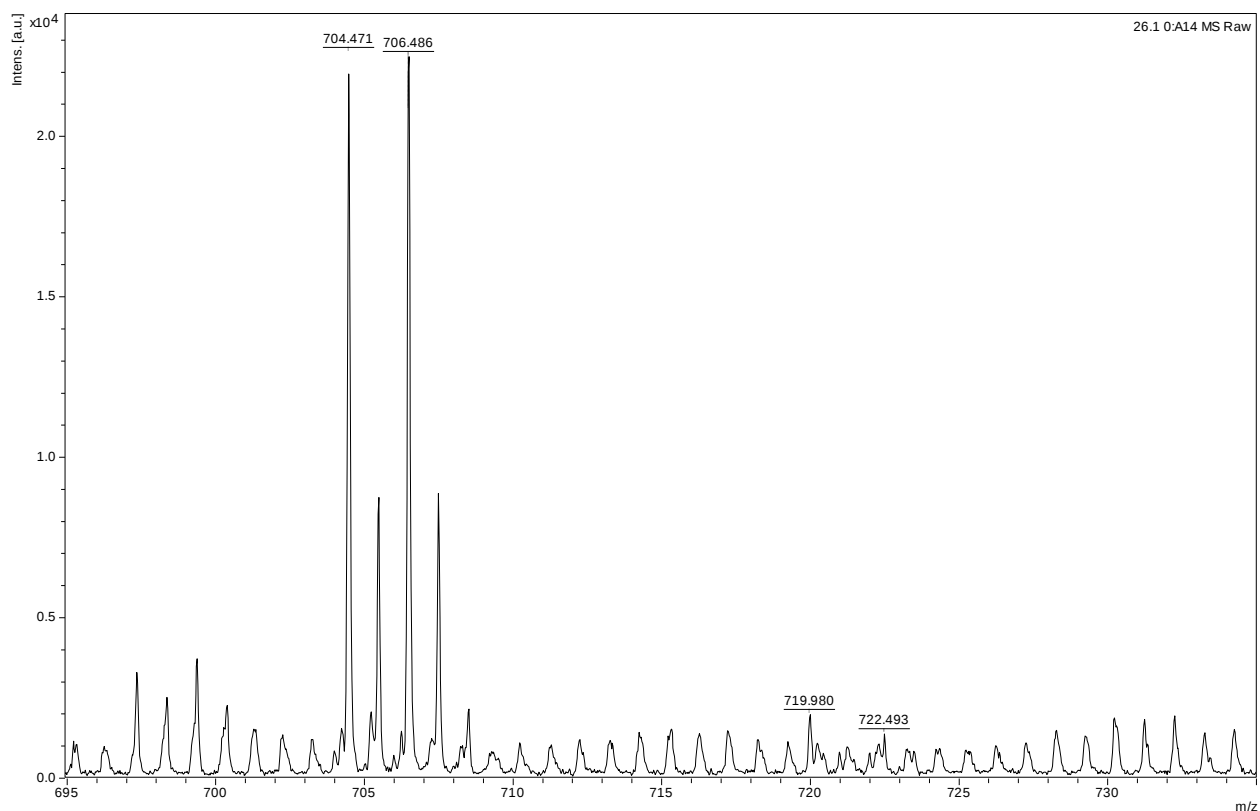
Amostra 24



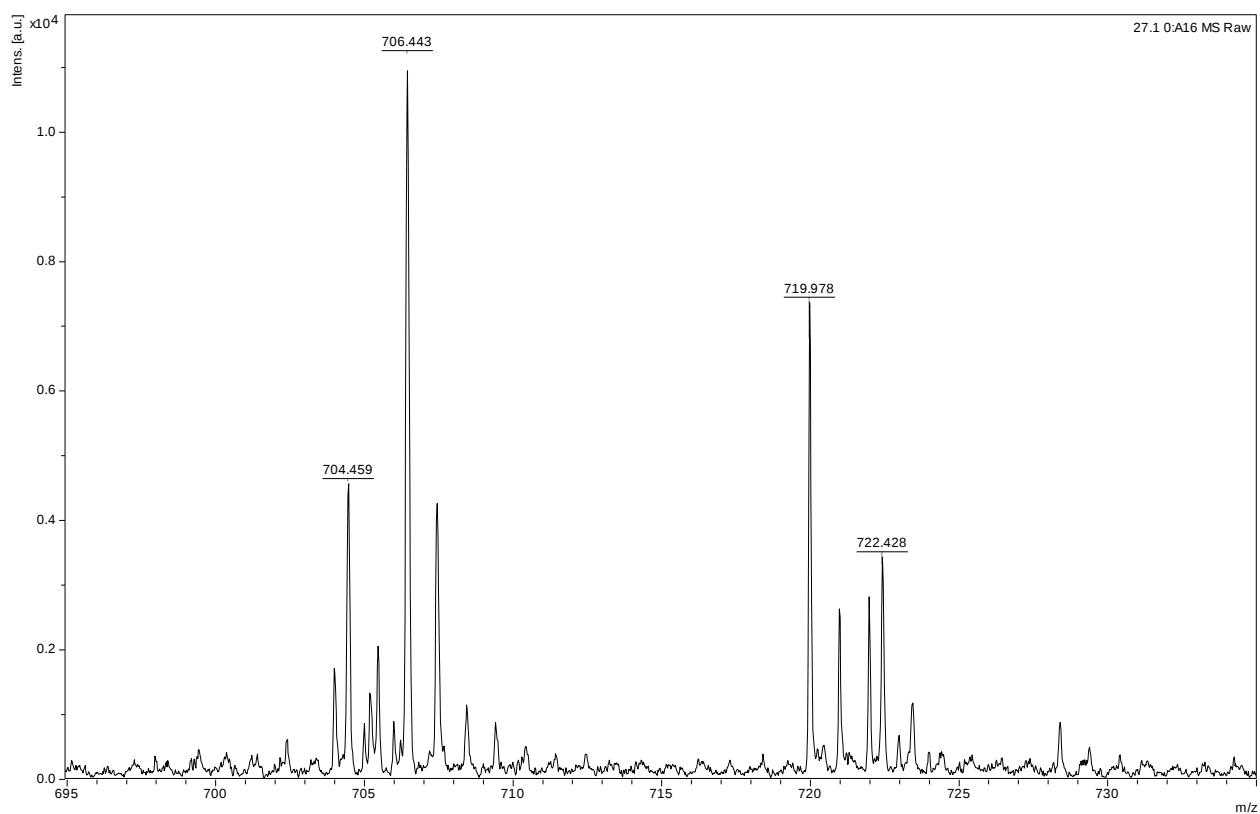
Amostra 25



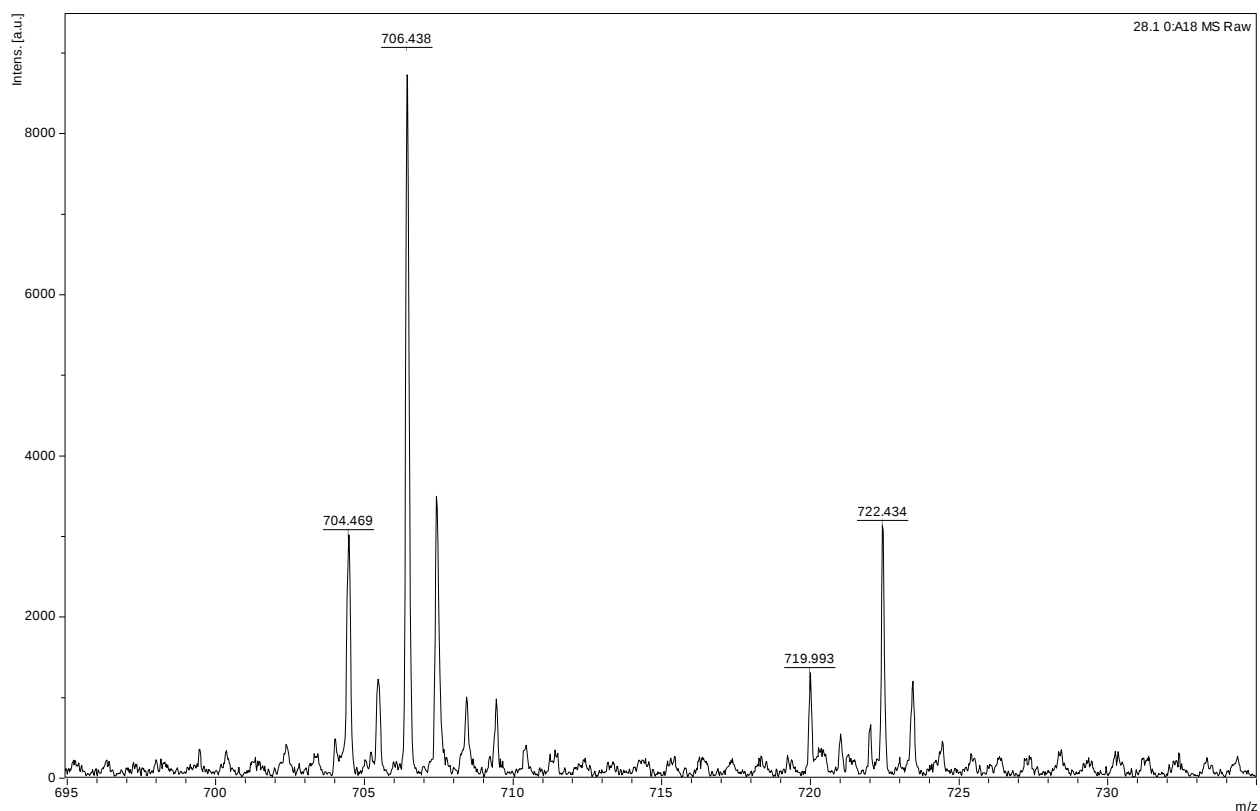
Amostra 26



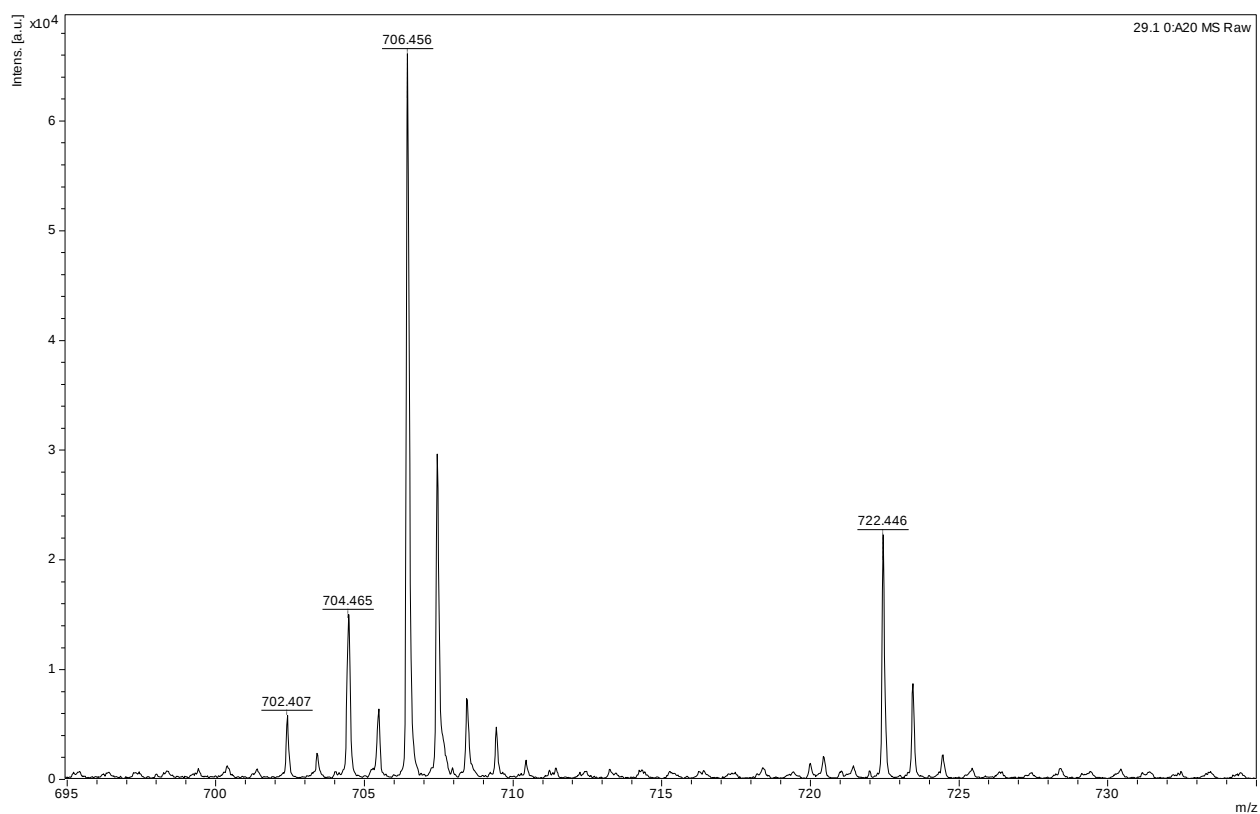
Amostra 27



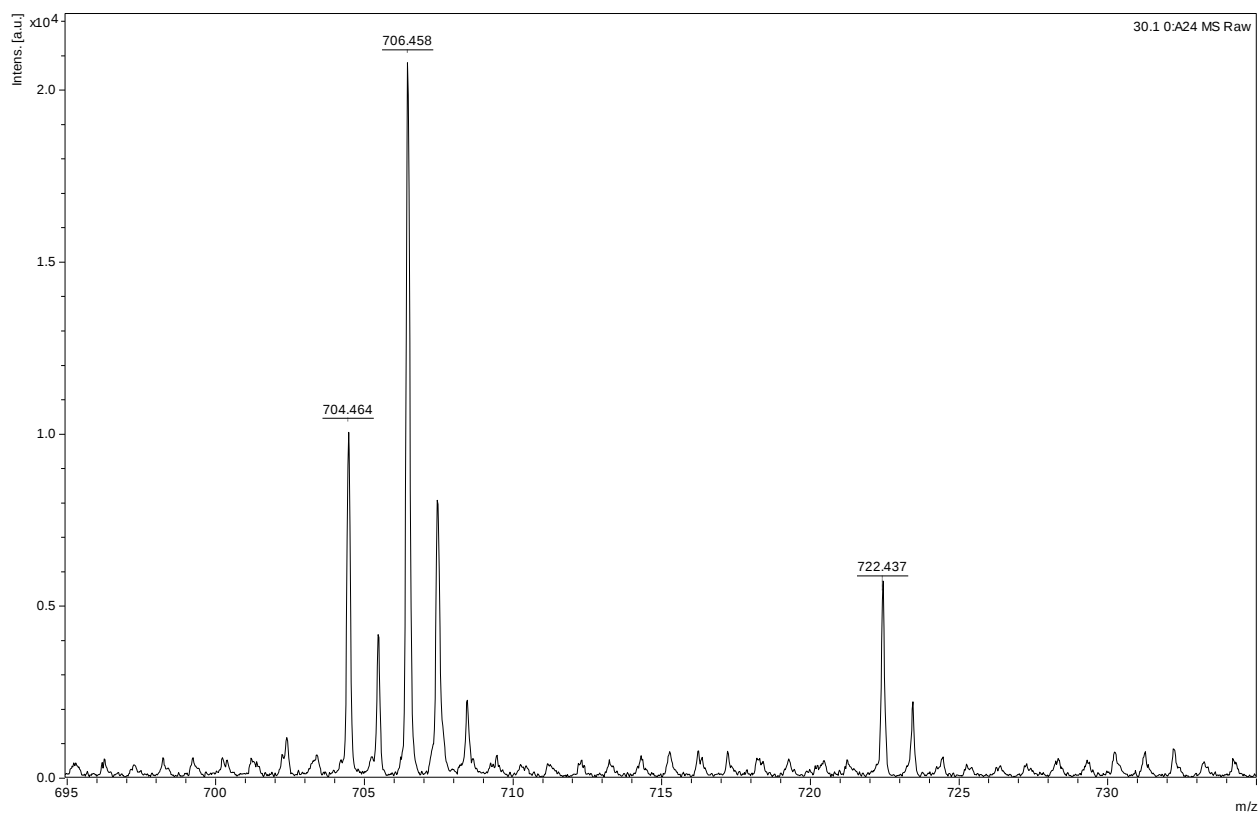
Amostra 28



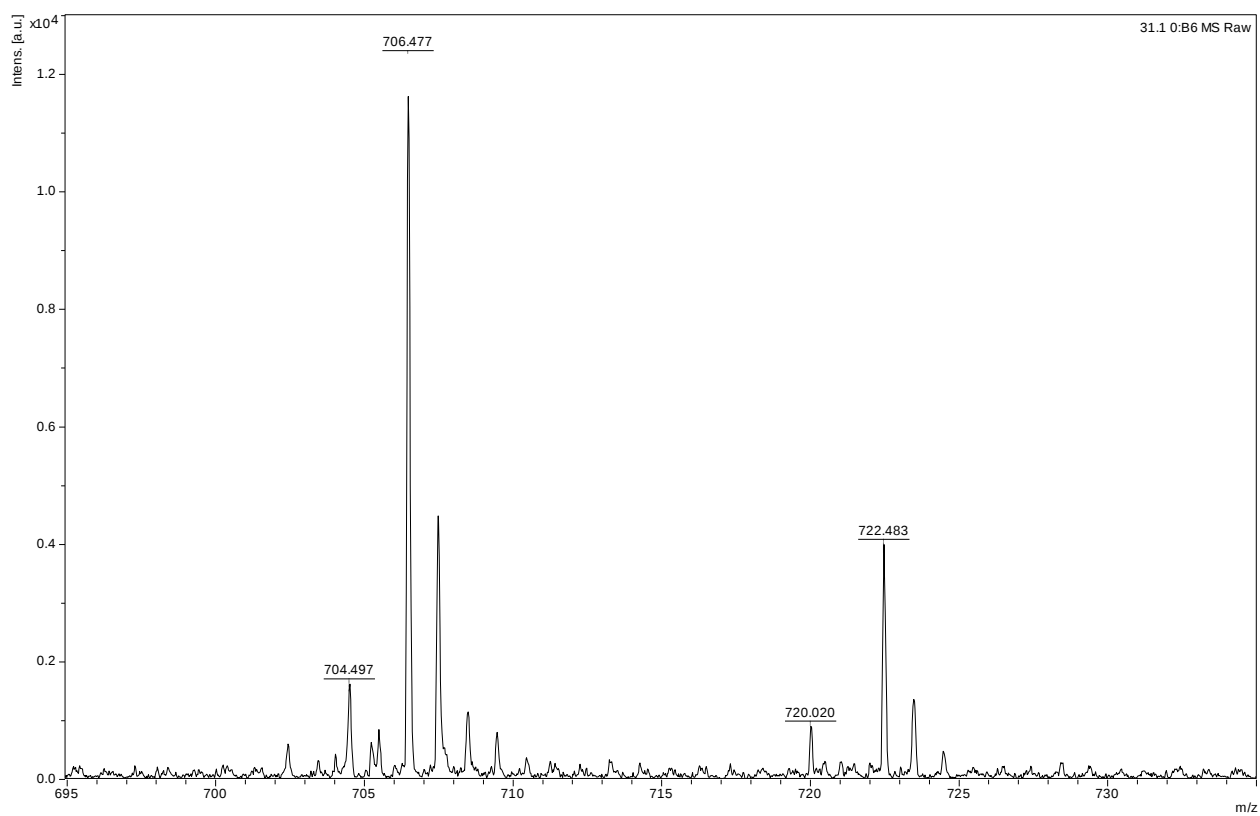
Amostra 29



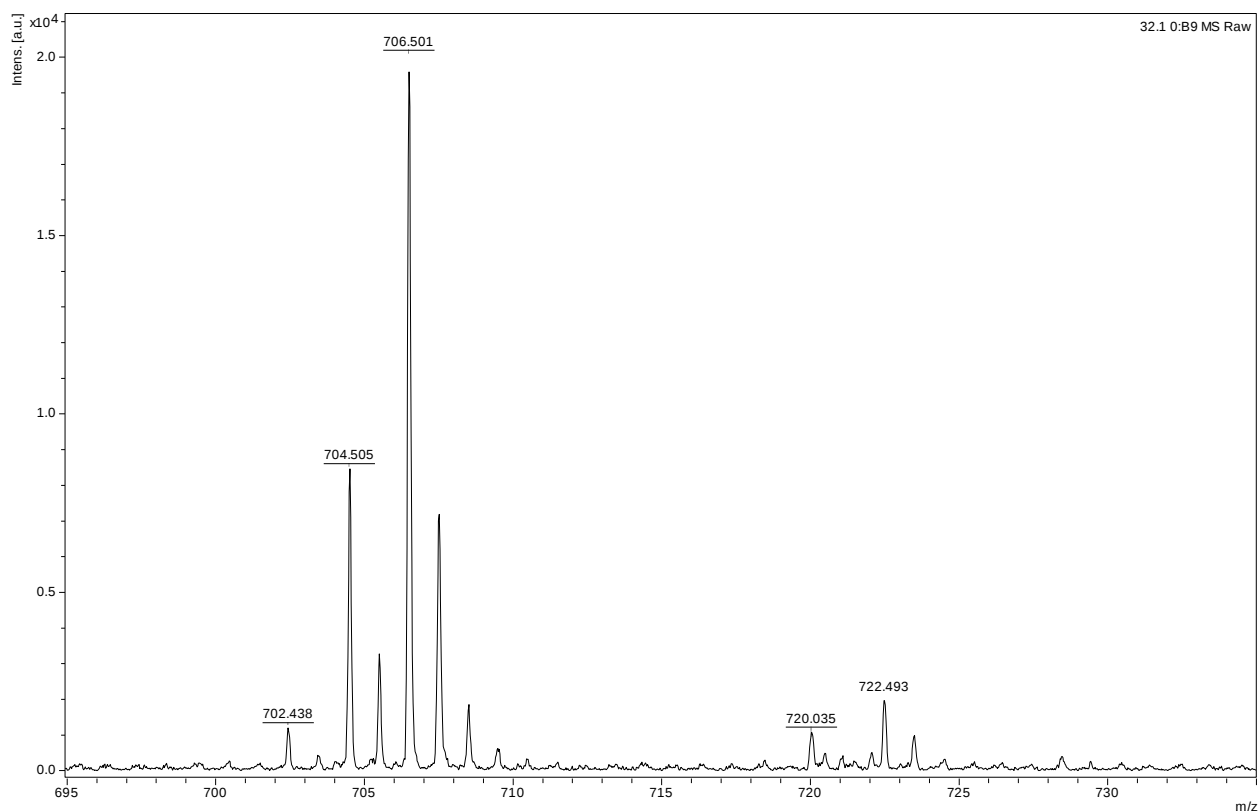
Amostra 30



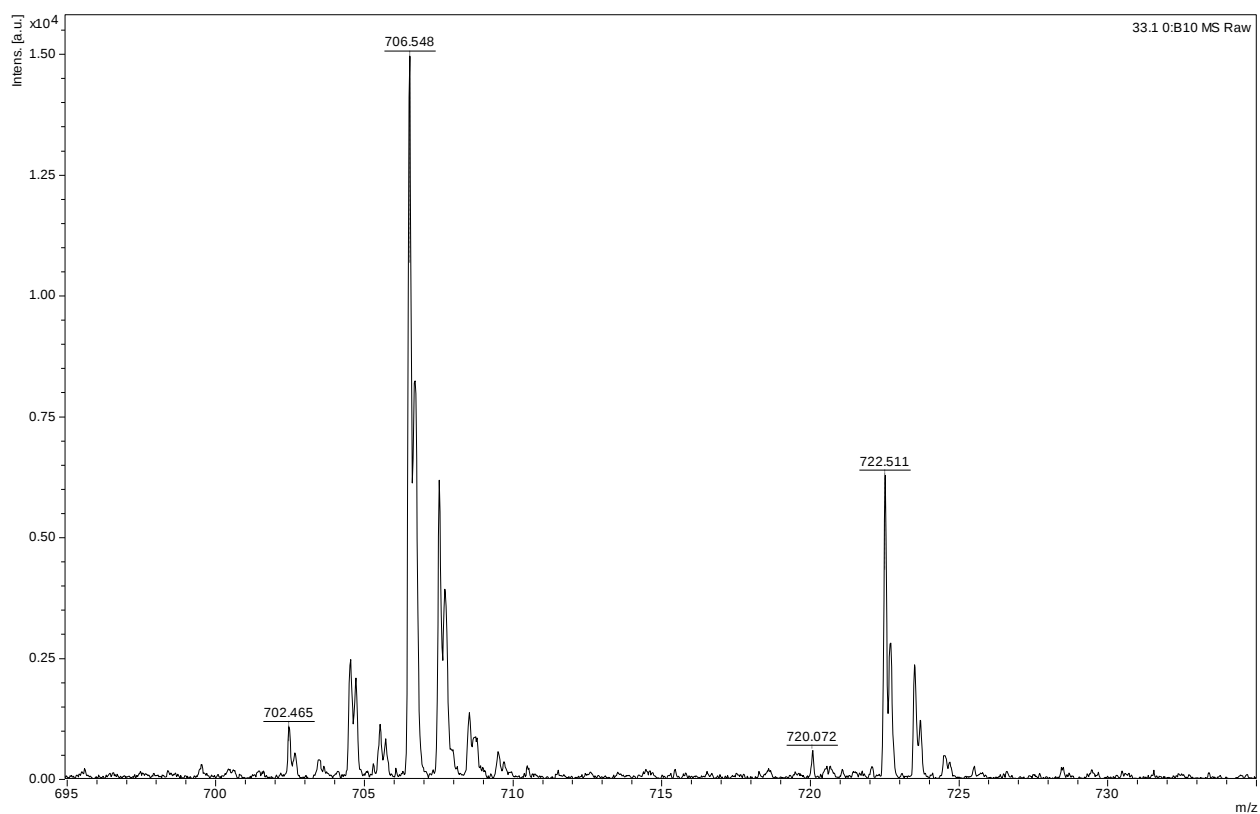
Amostra 31



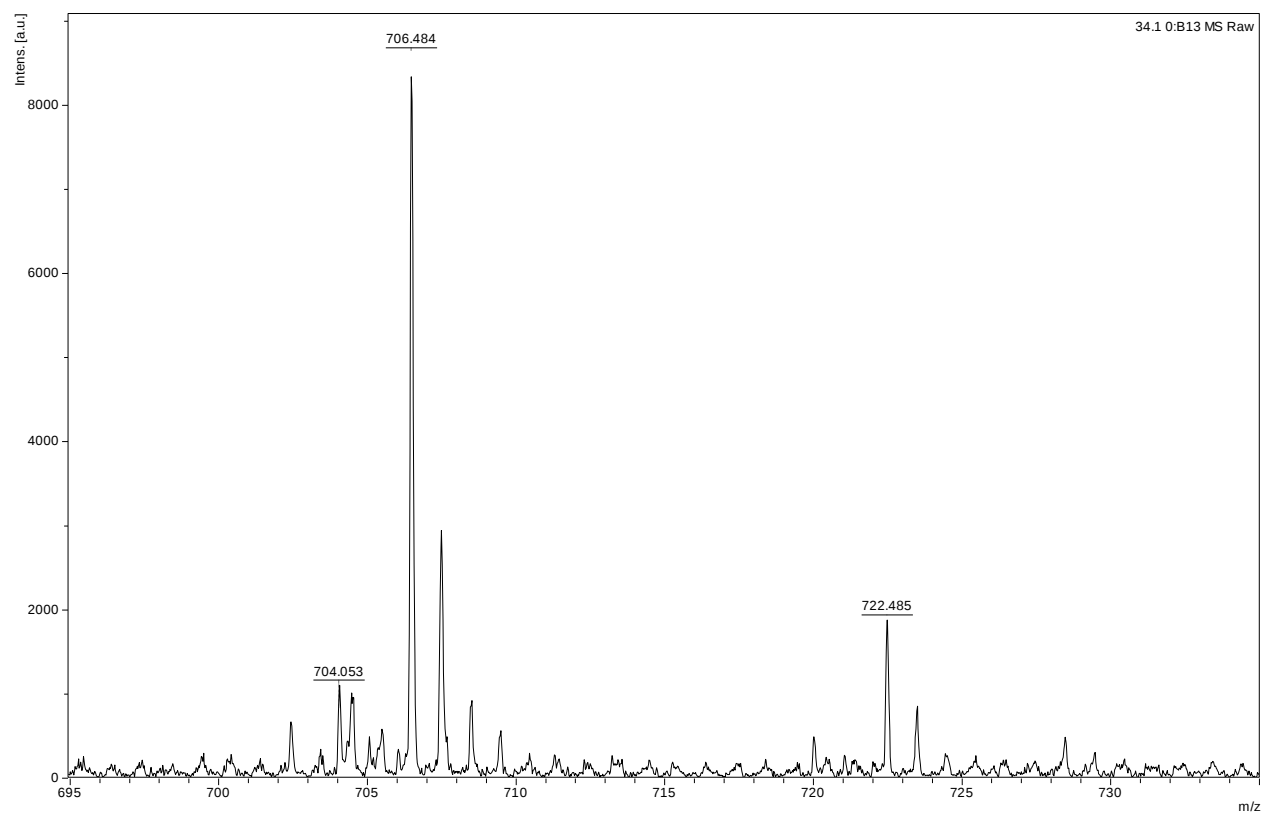
Amostra 32



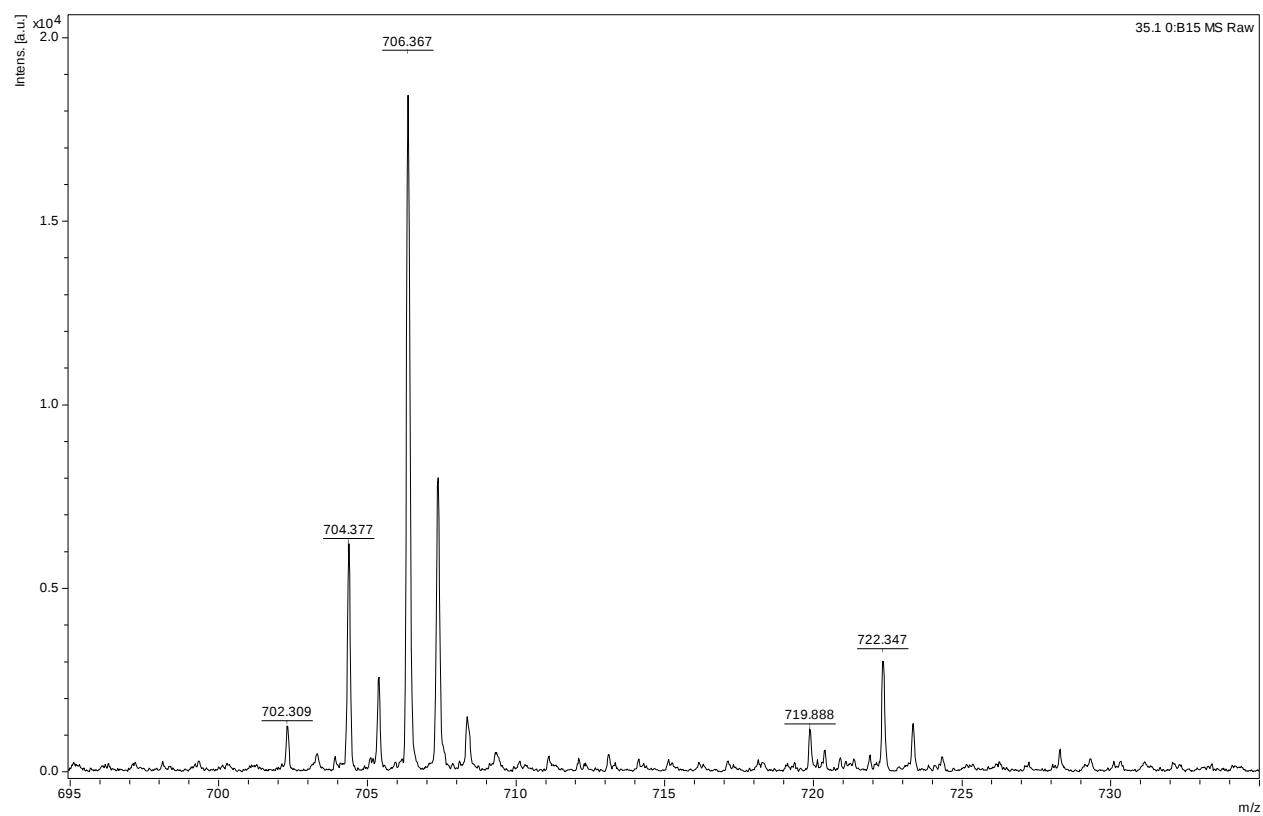
Amostra 33



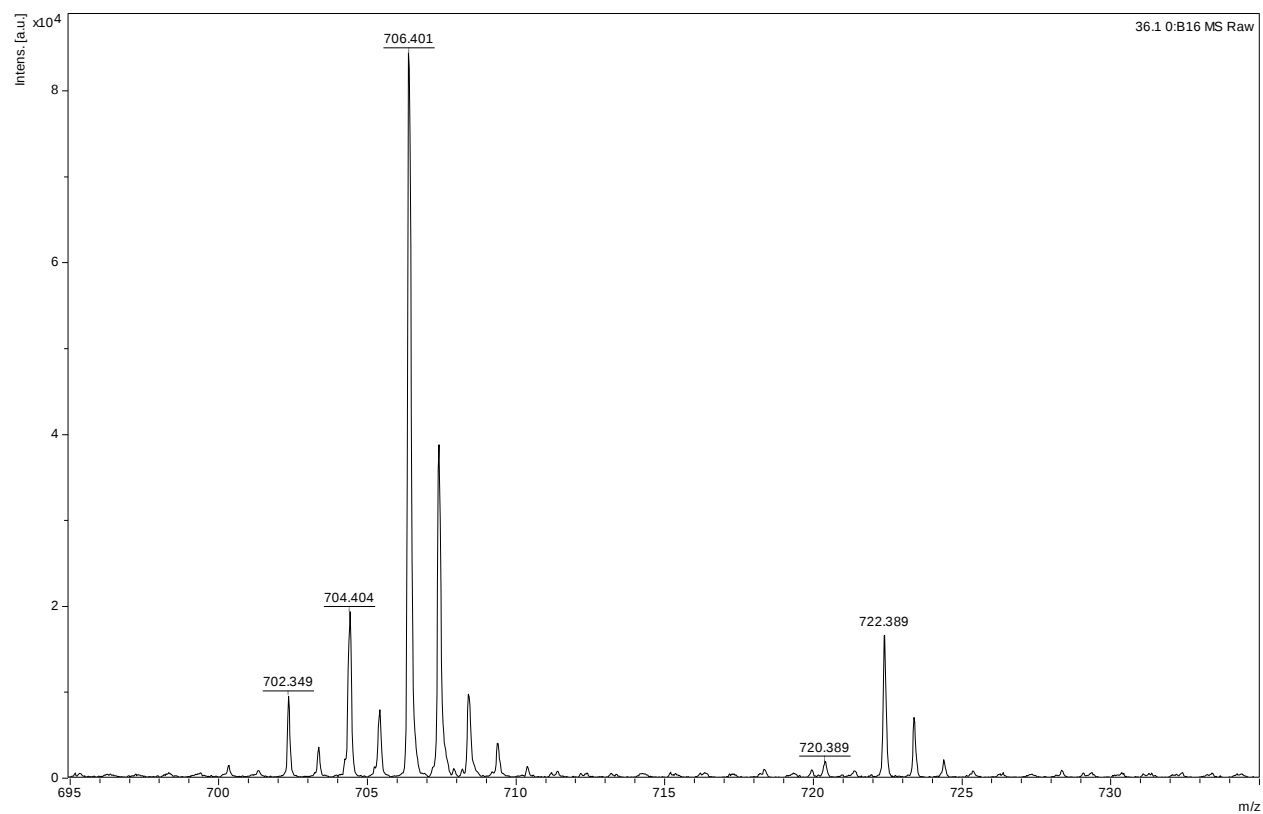
Amostra 34



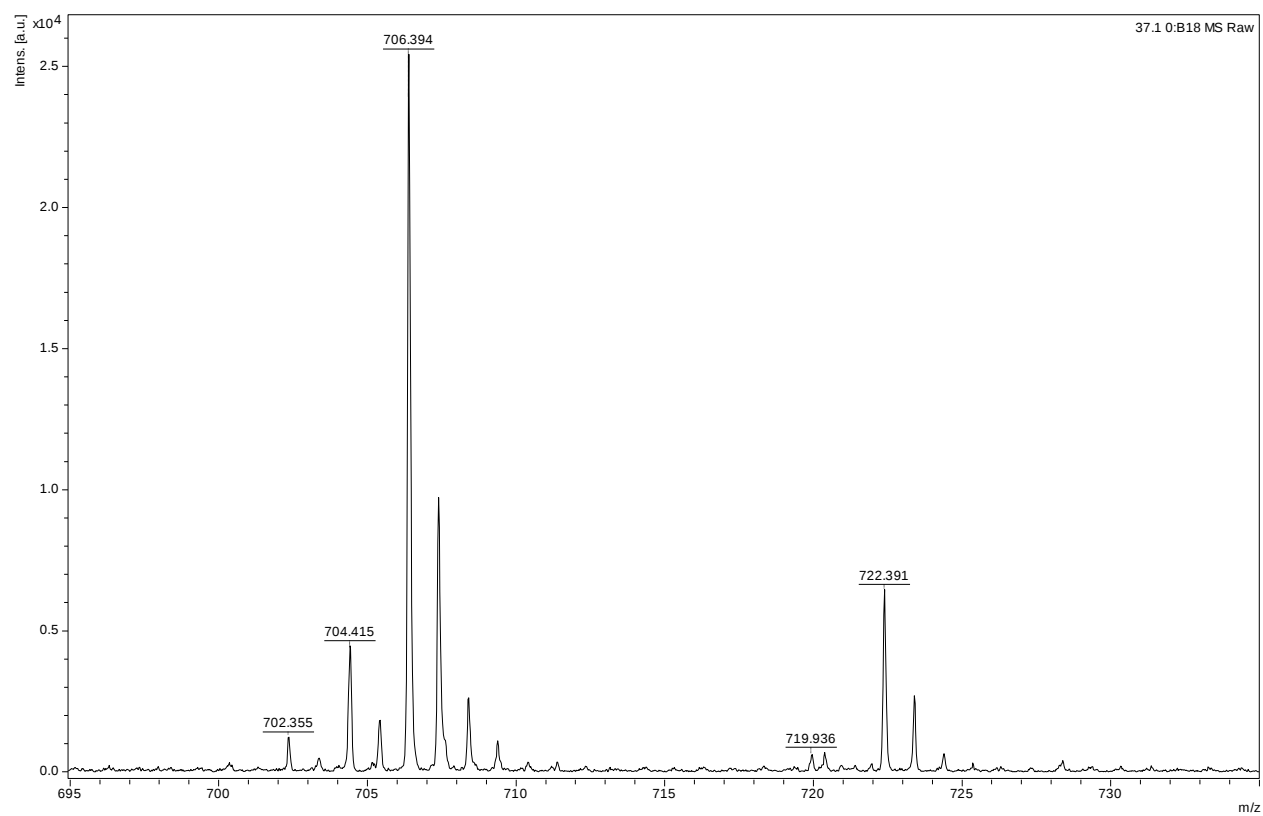
Amostra 35



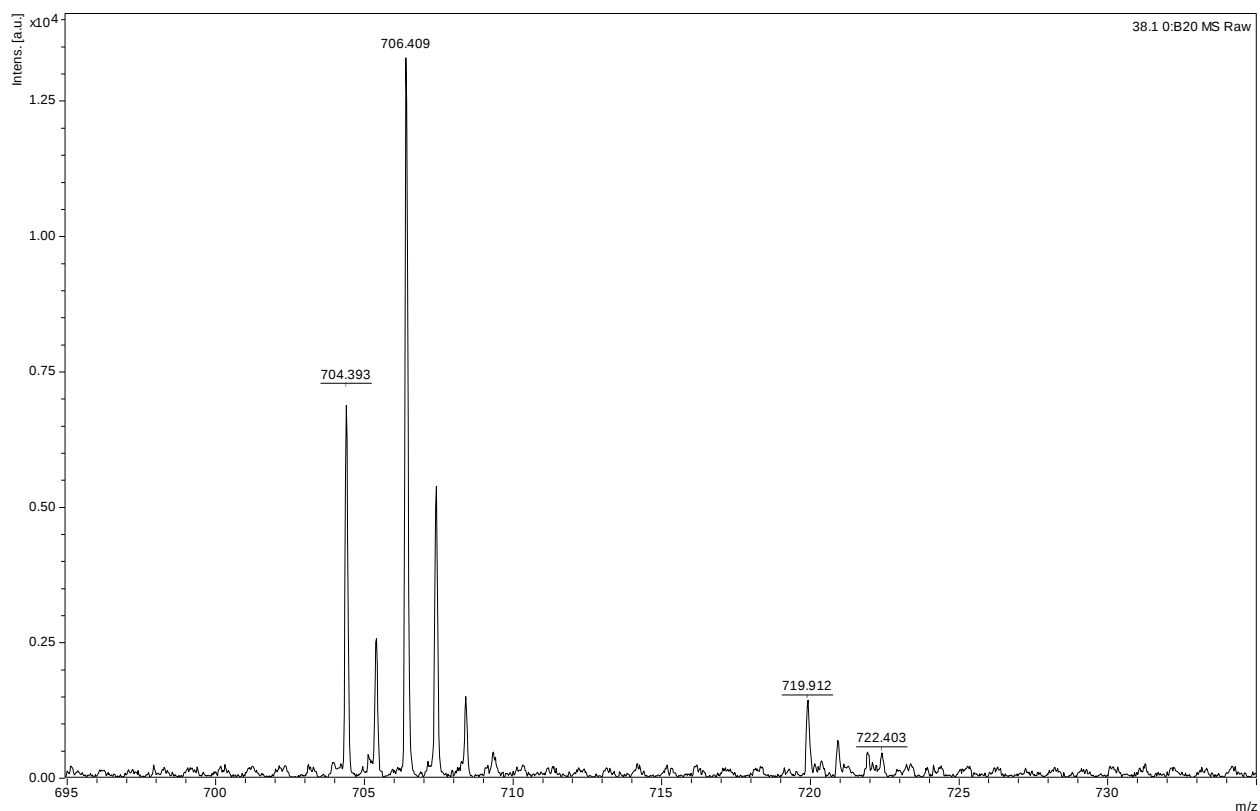
Amostra 36



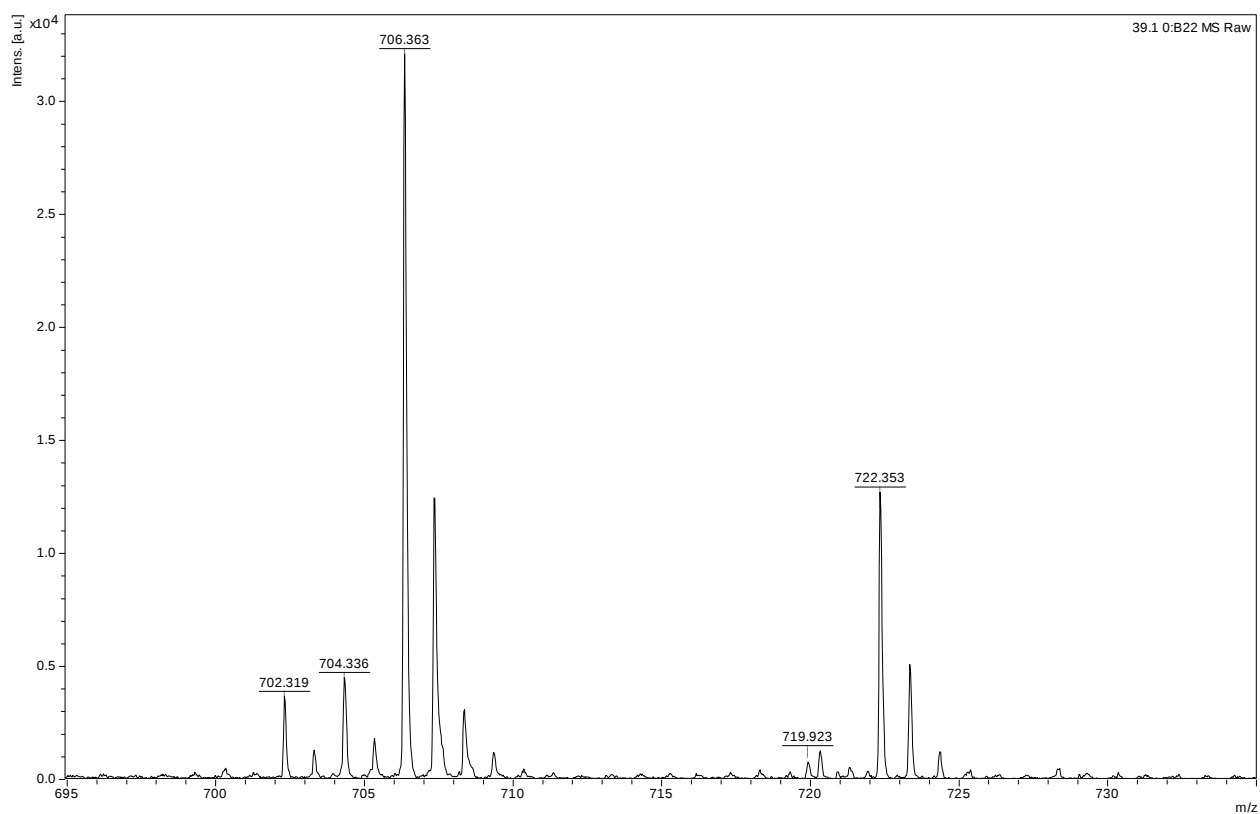
Amostra 37



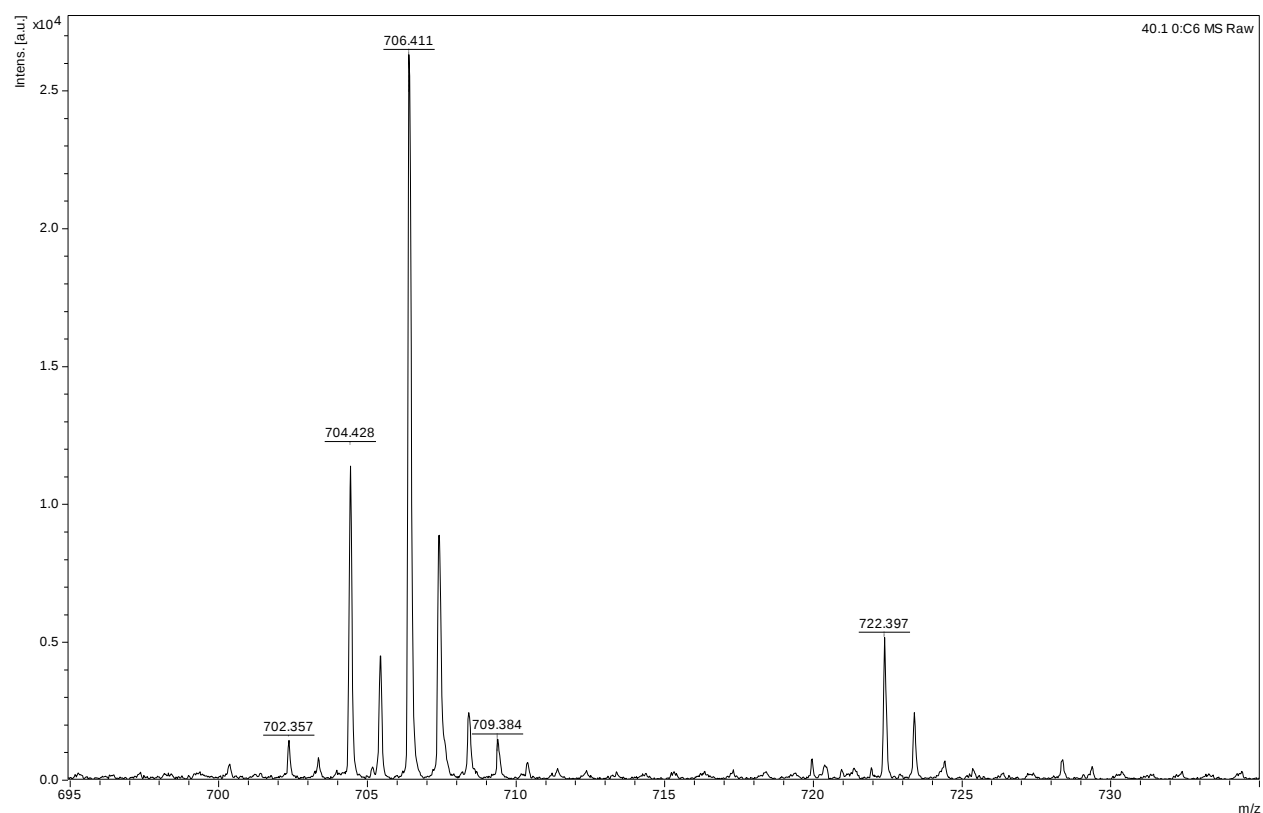
Amostra 38



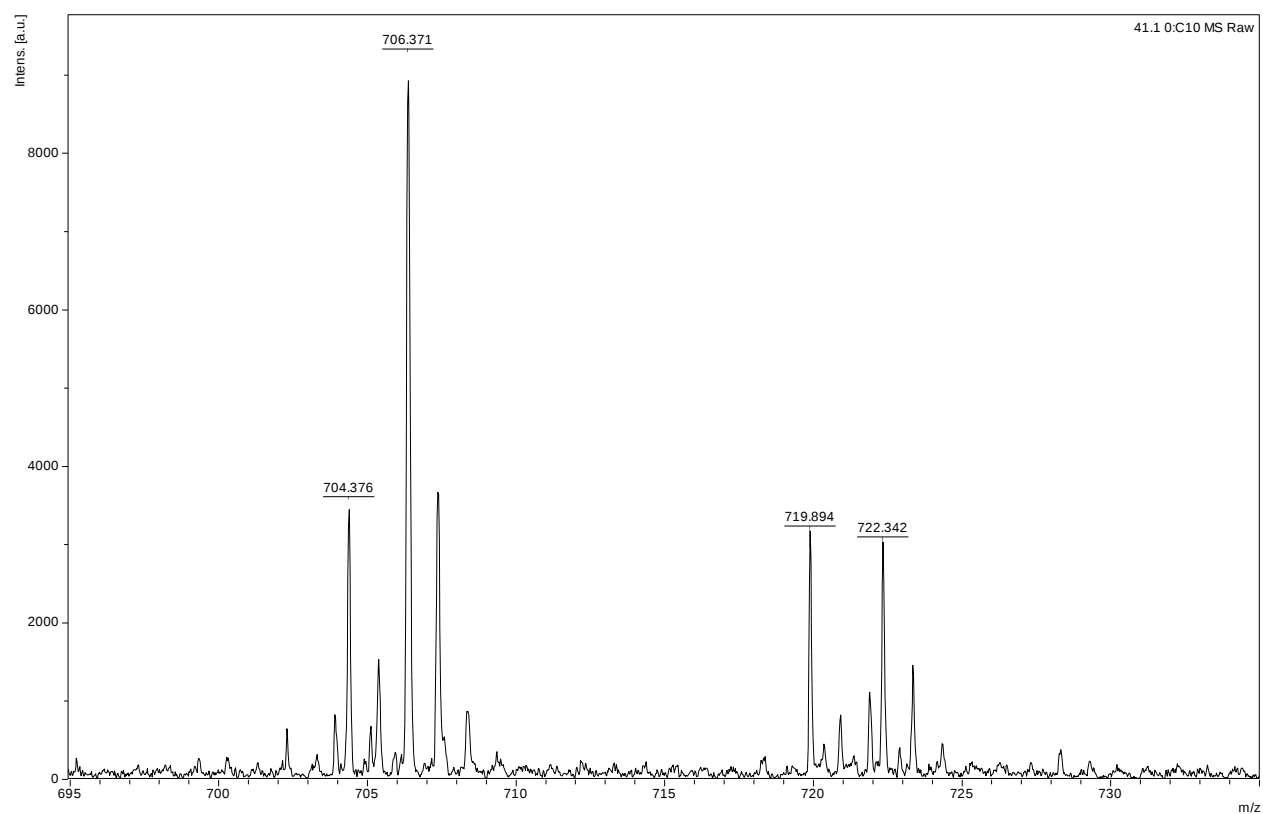
Amostra 39

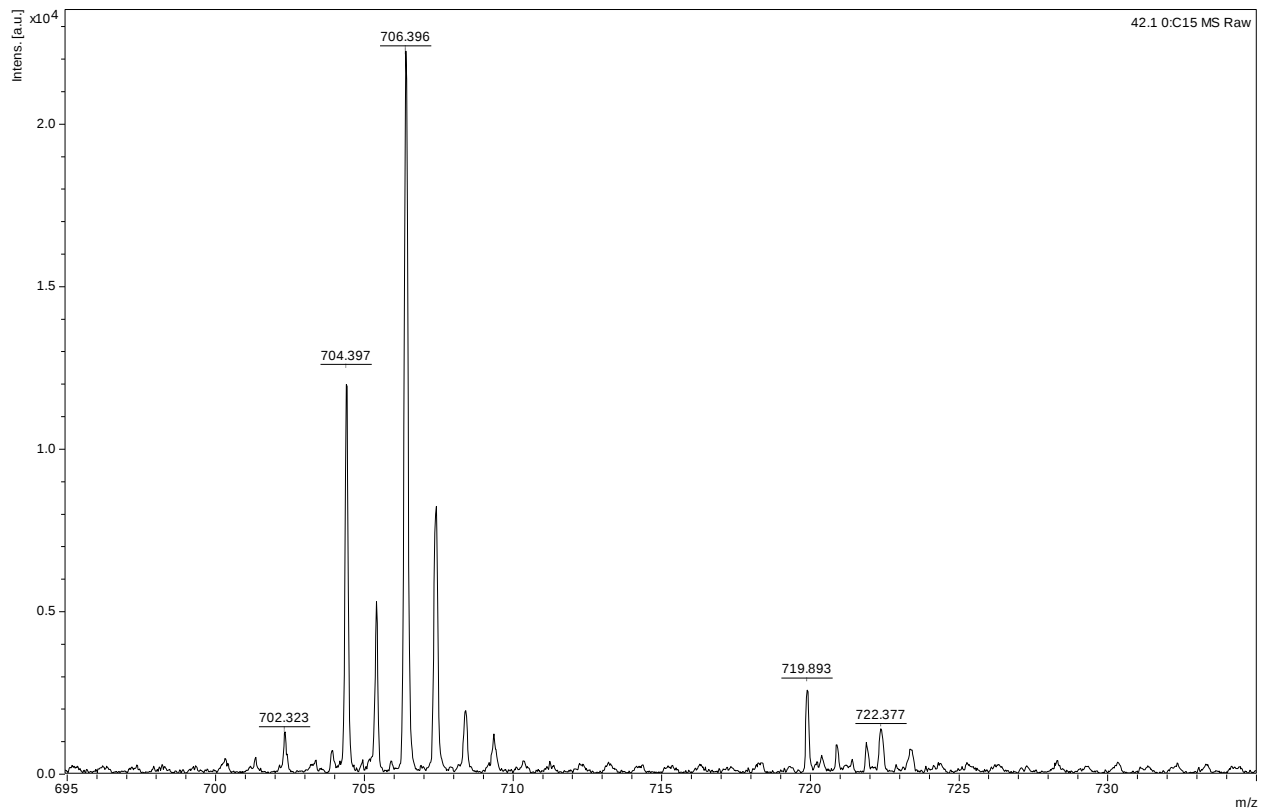
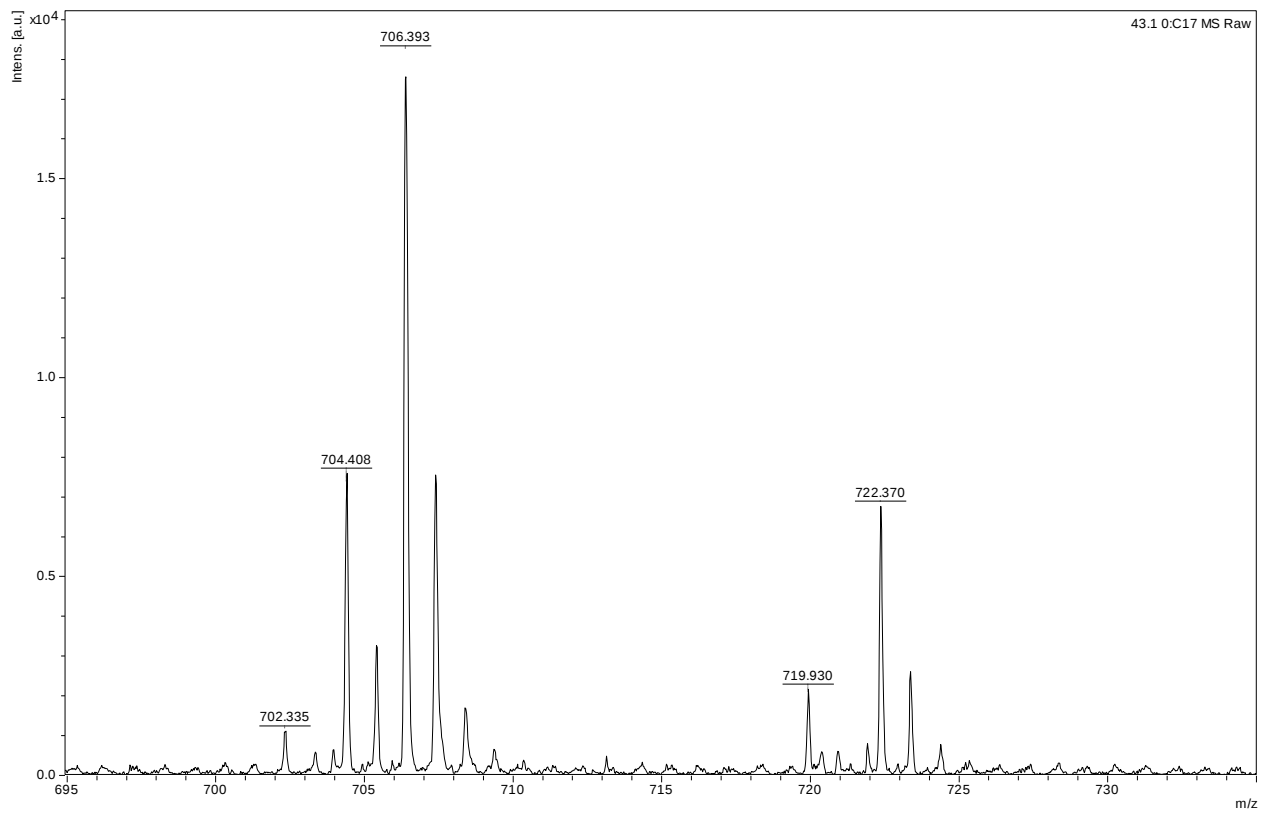


Amostra 40

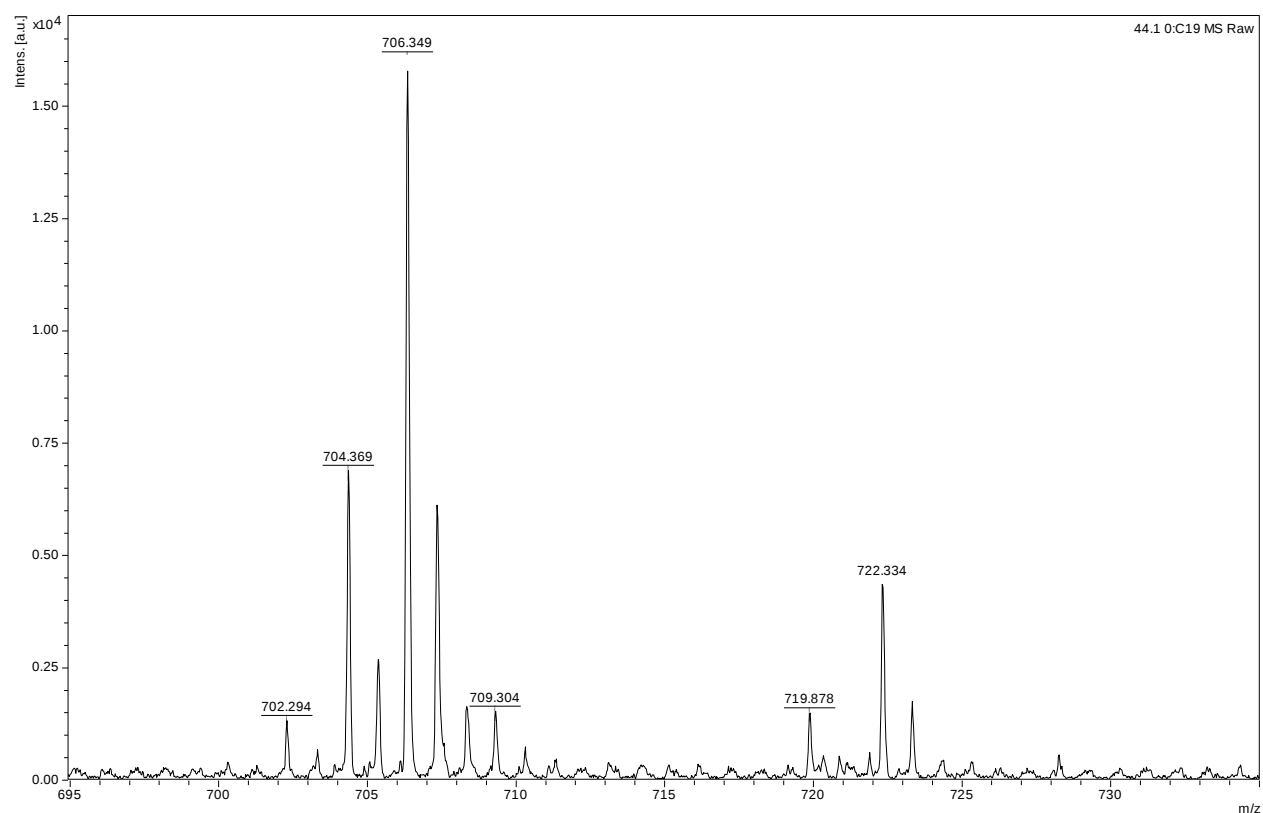


Amostra 41

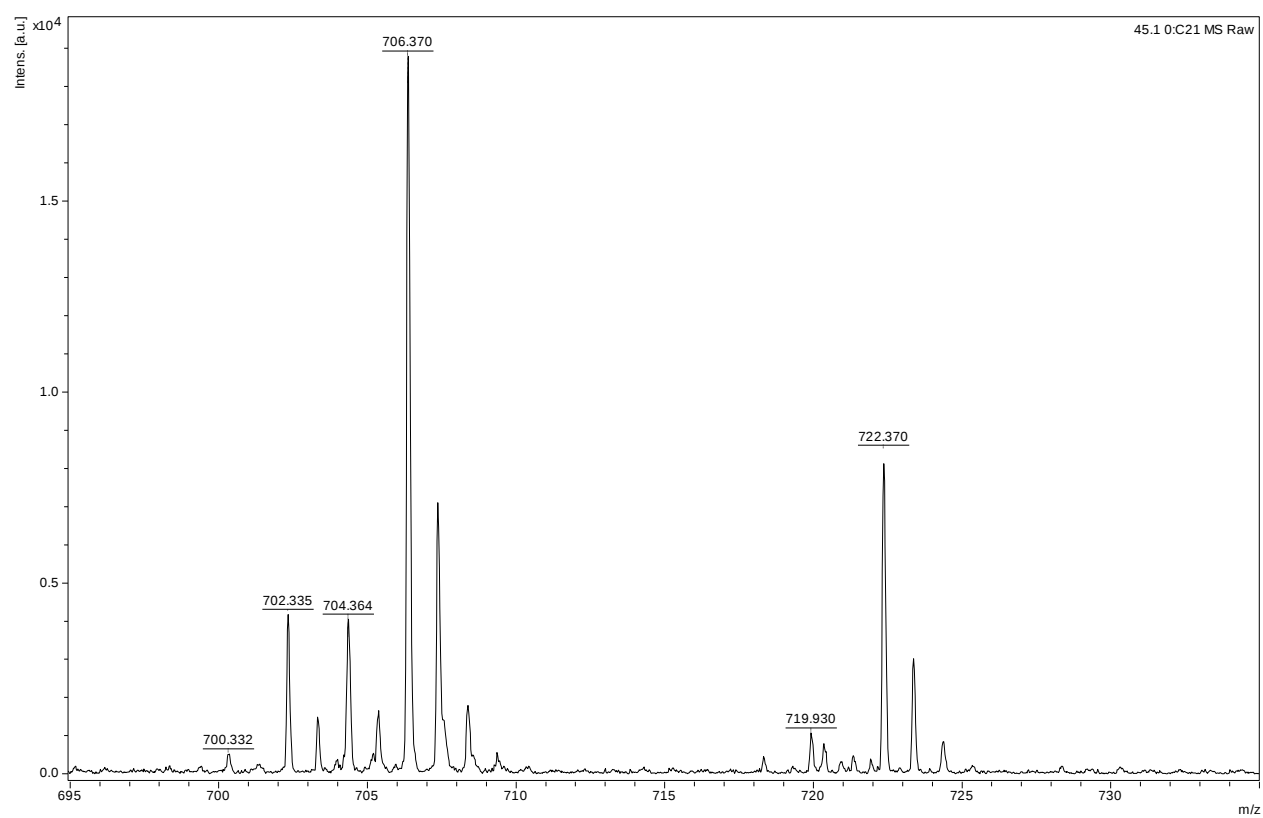


Amostra 42**Amostra 43**

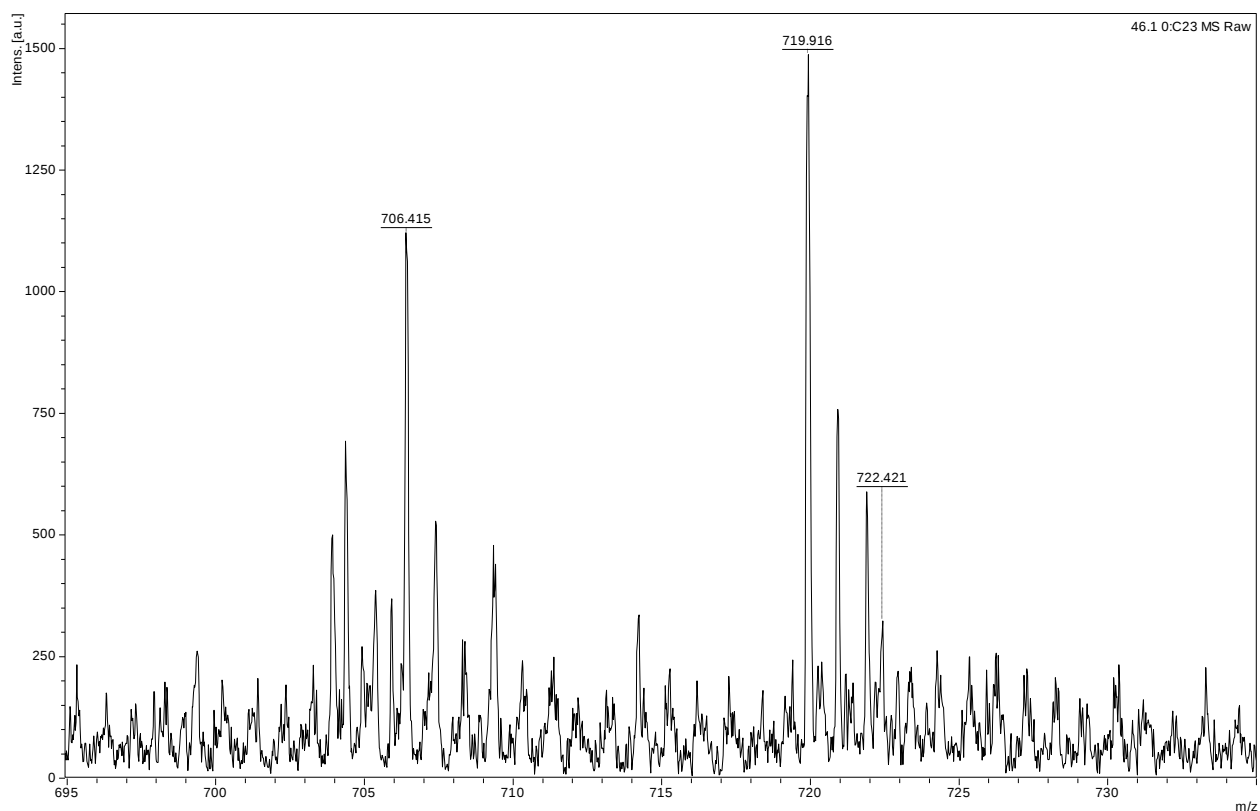
Amostra 44



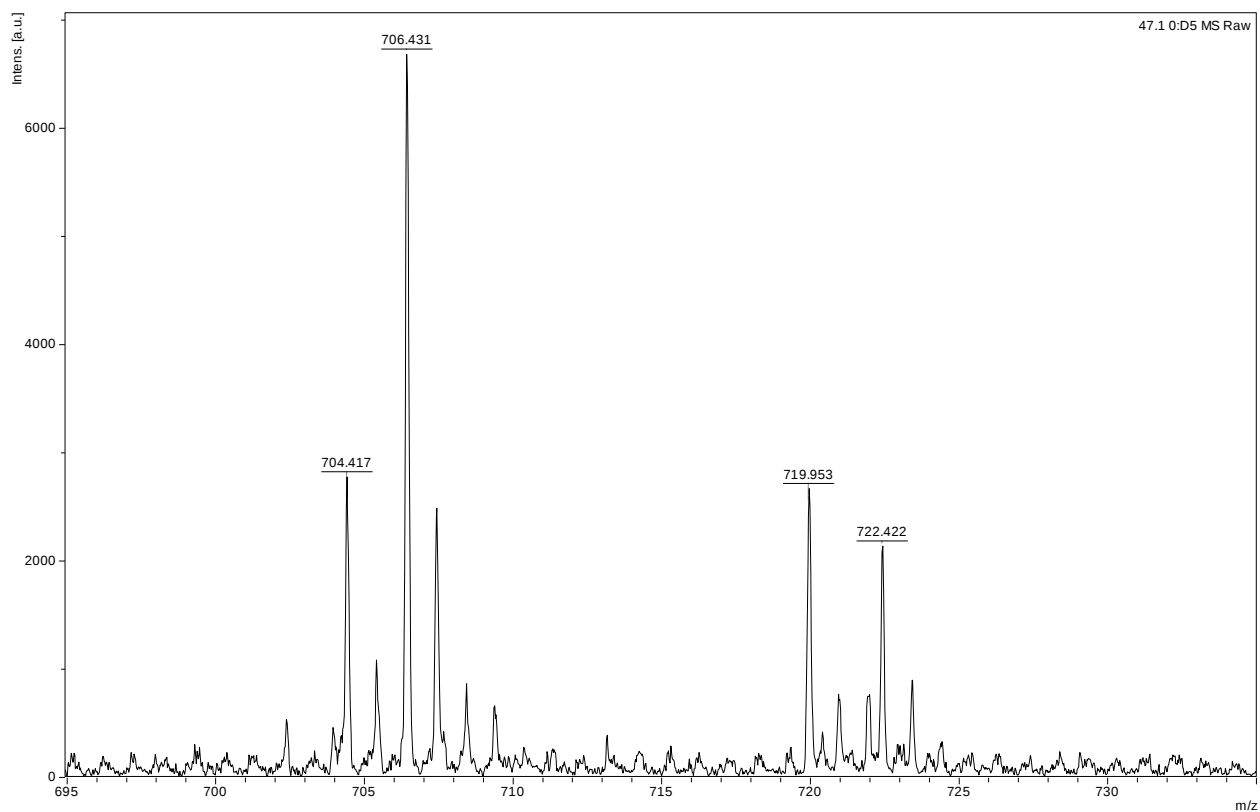
Amostra 45



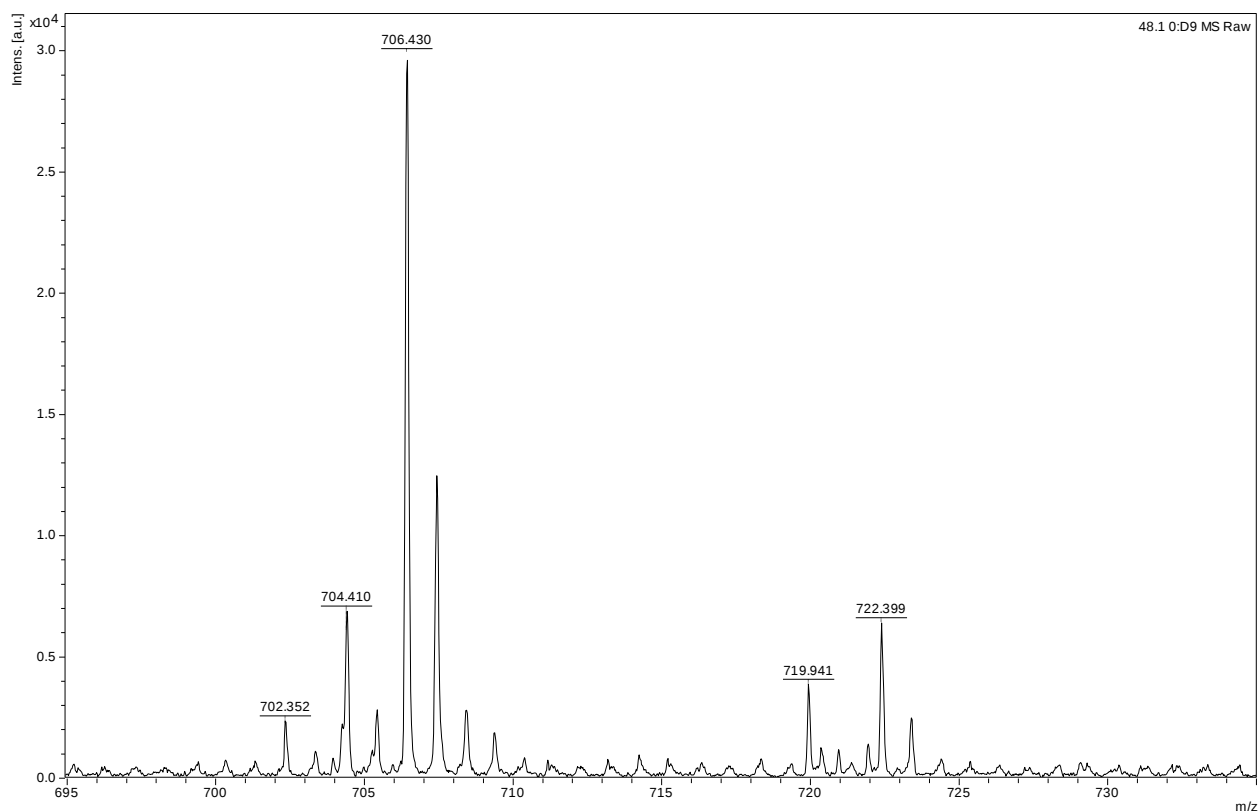
Amostra 46



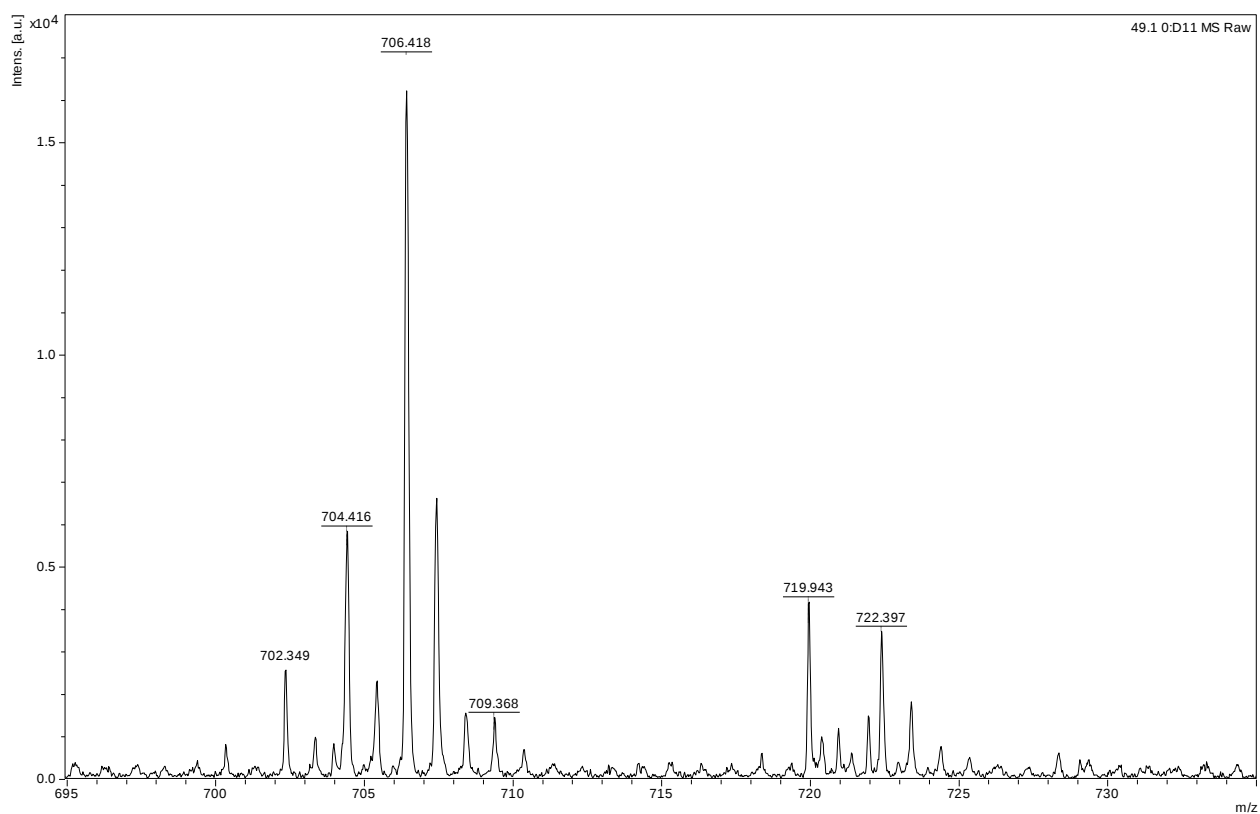
Amostra 47

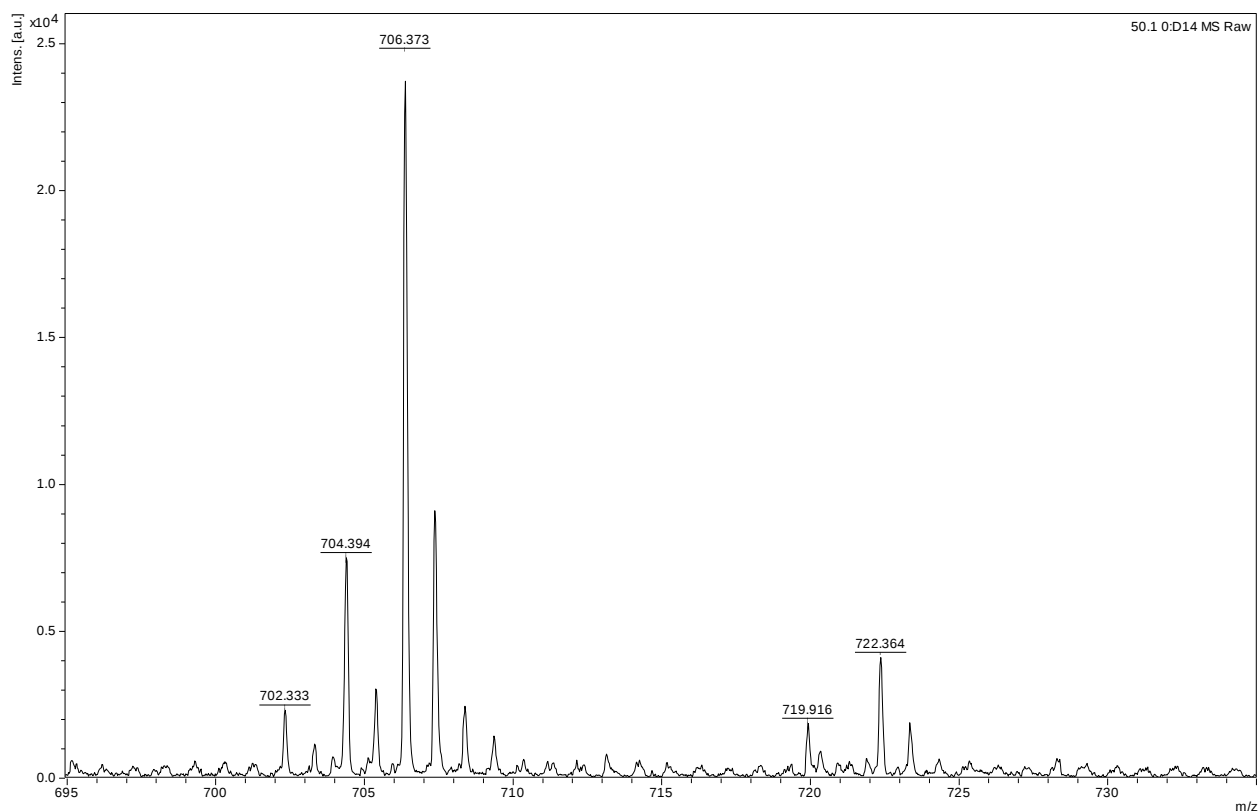
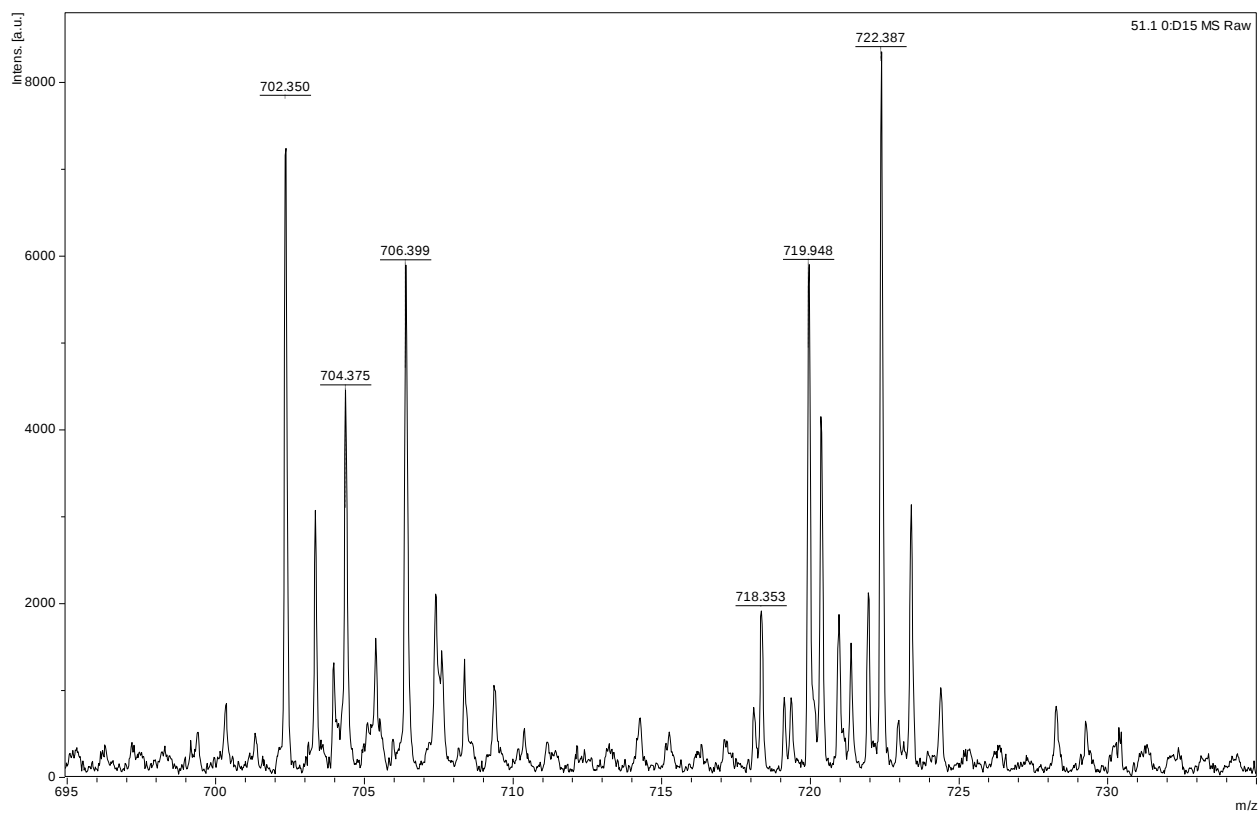


Amostra 48

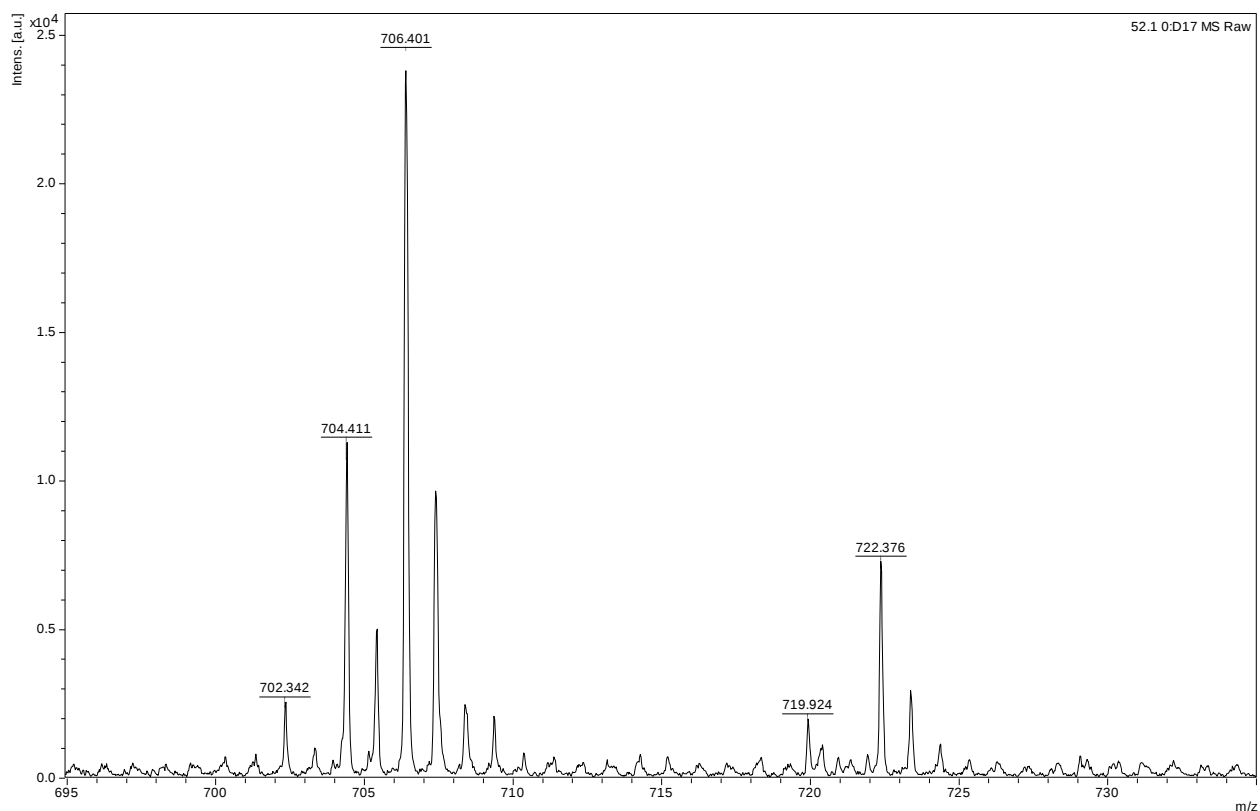


Amostra 49

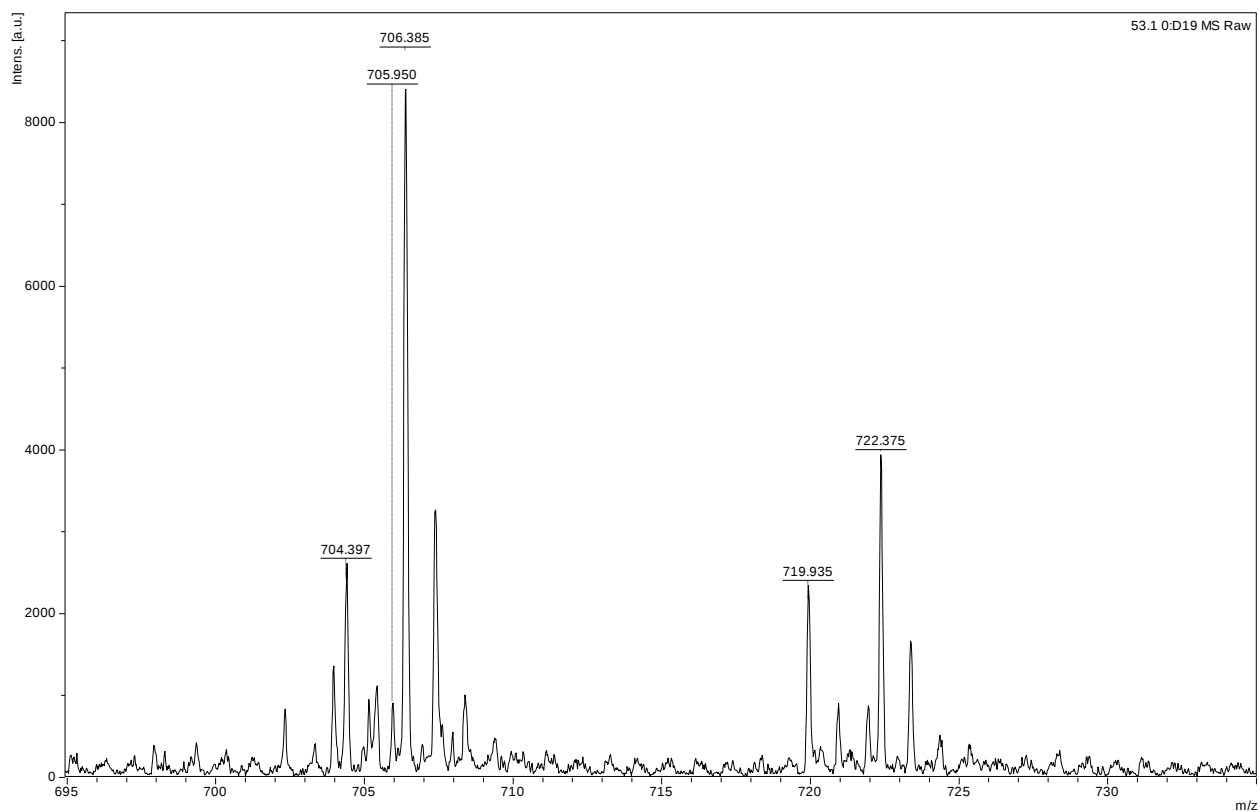


Amostra 50**Amostra 51**

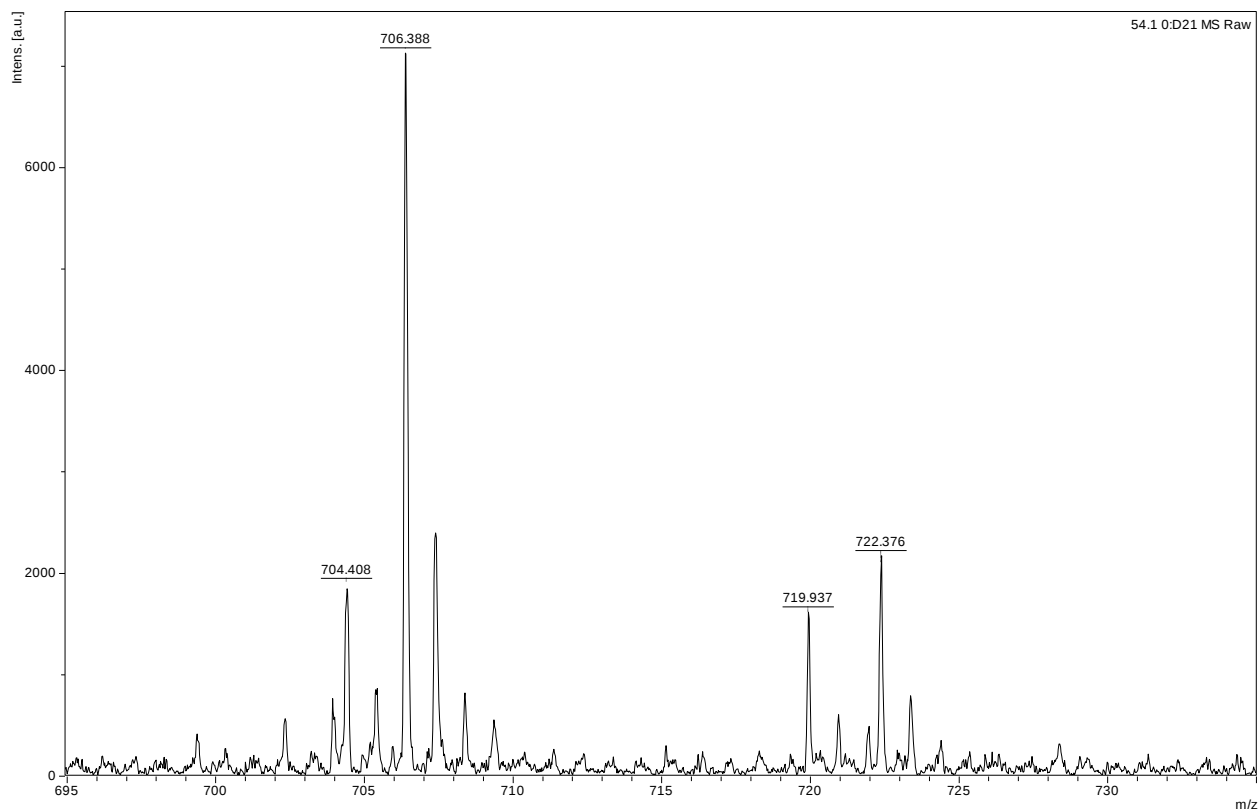
Amostra 52



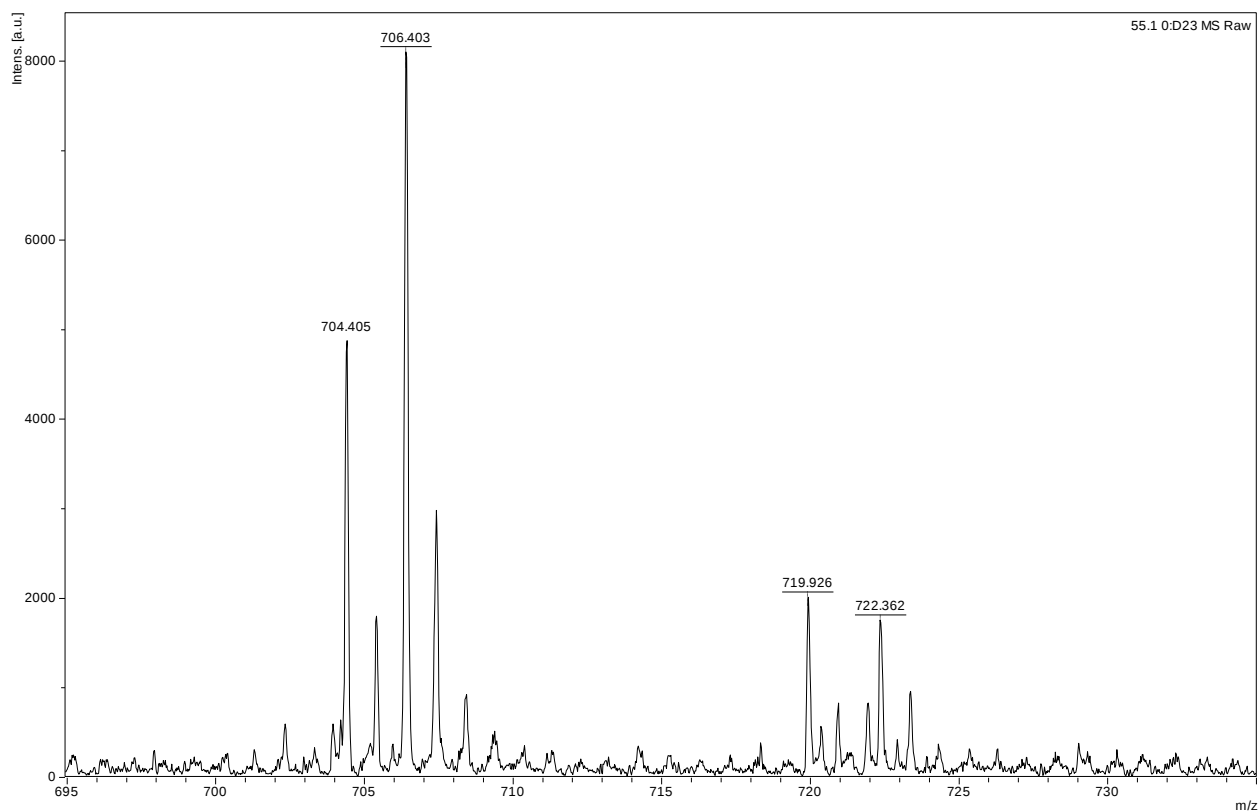
Amostra 53



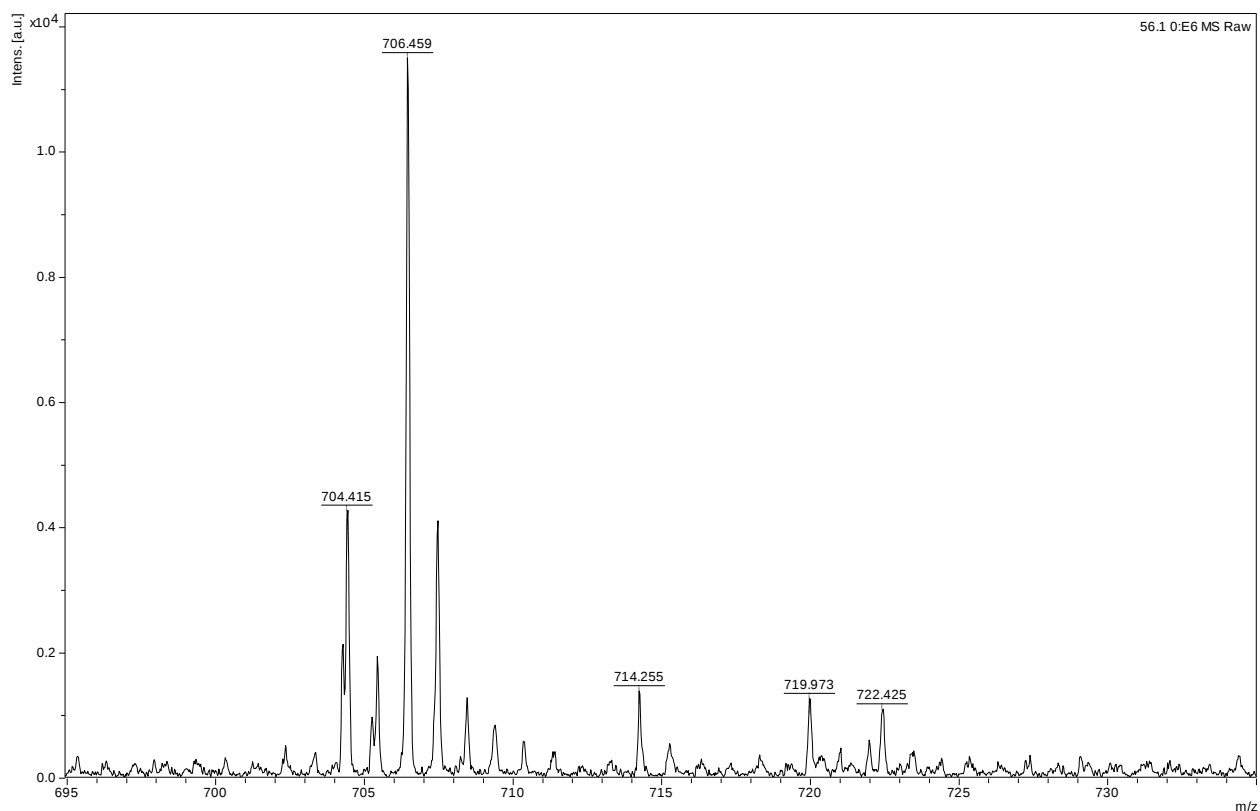
Amostra 54



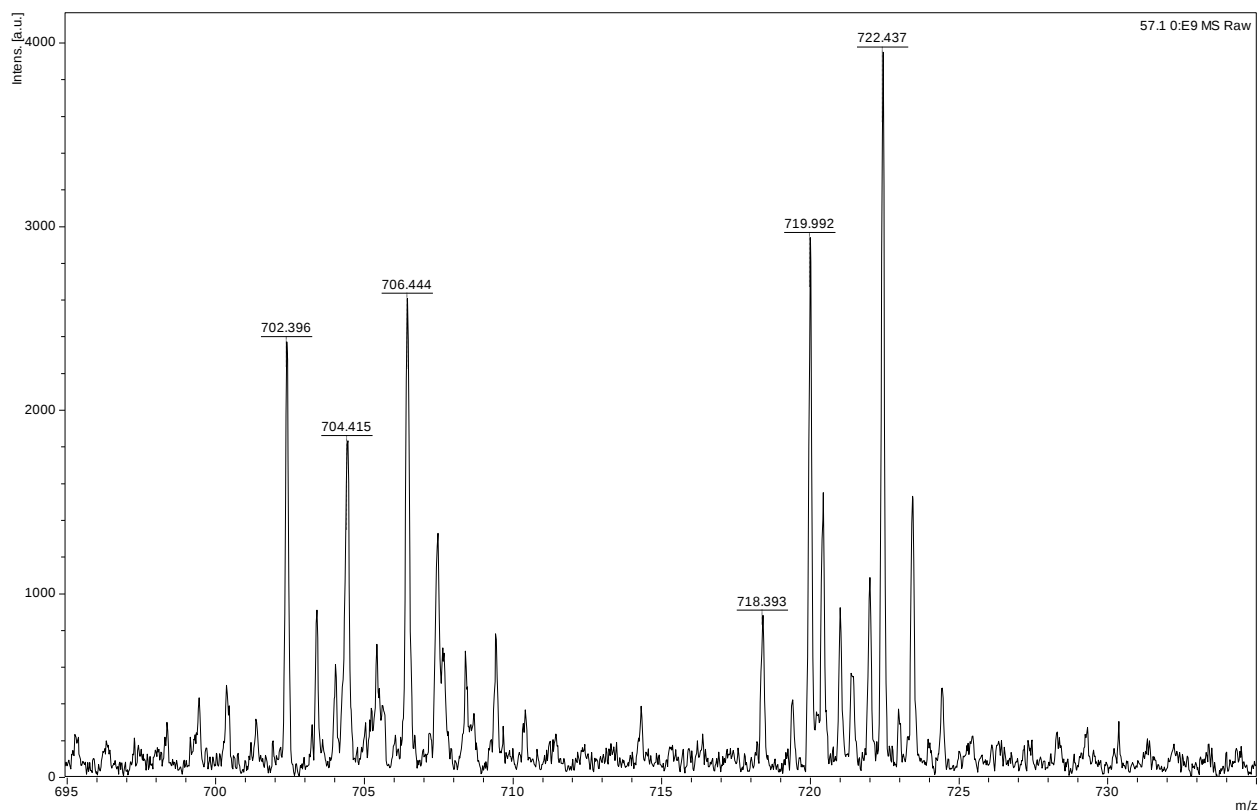
Amostra 55



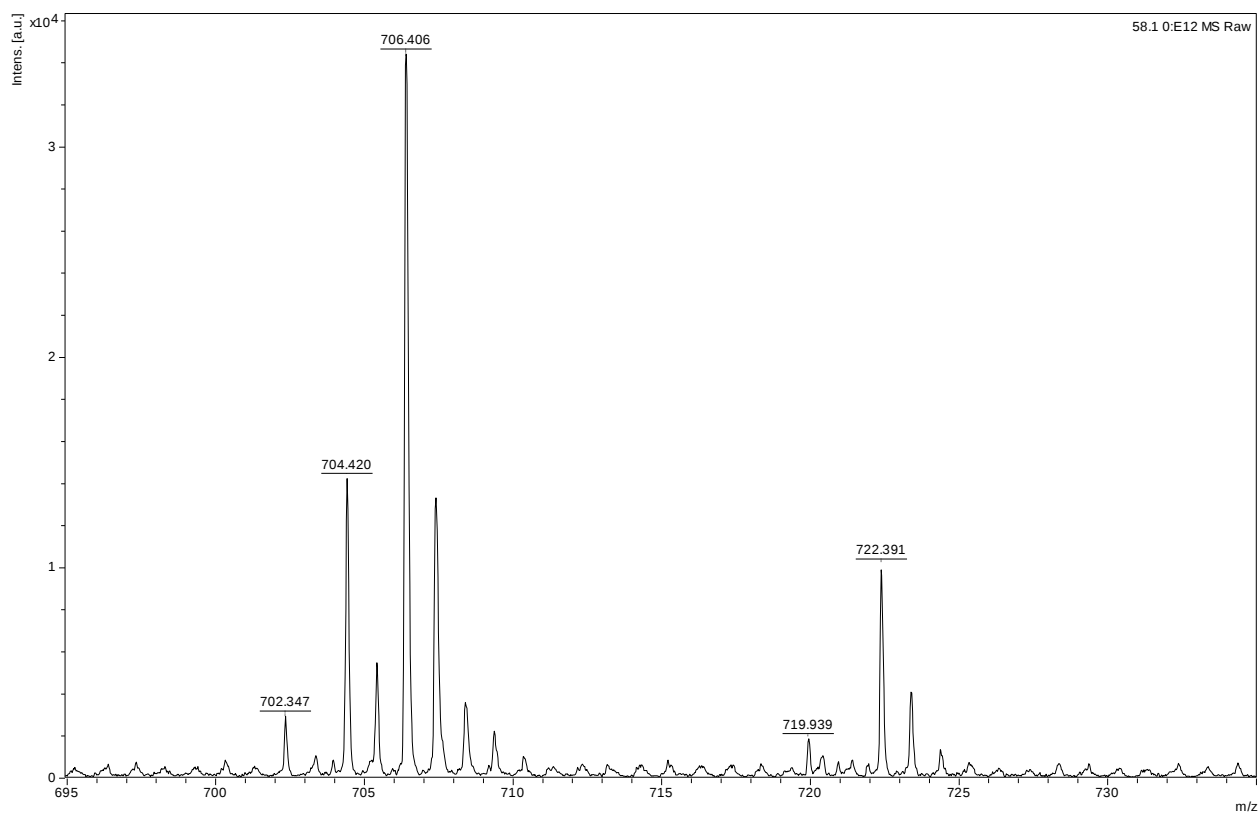
Amostra 56



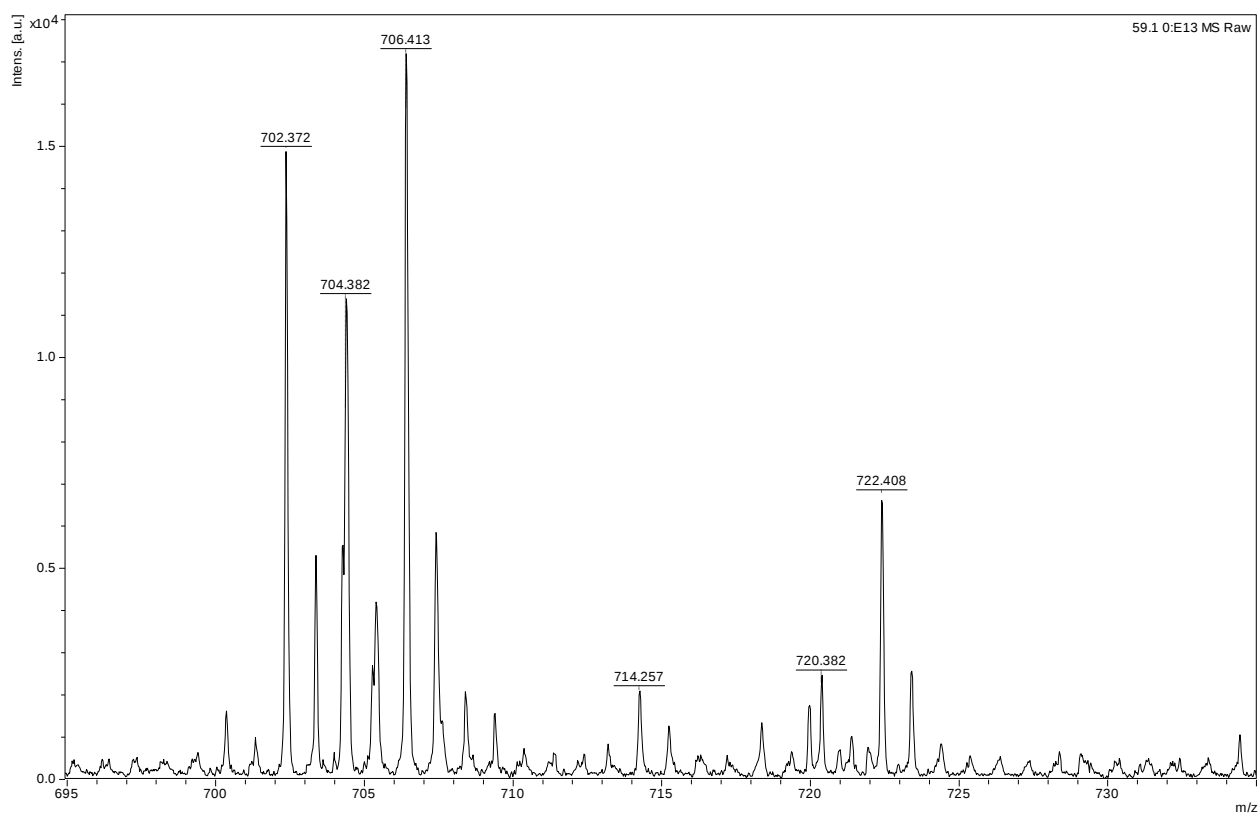
Amostra 57



Amostra 58



Amostra 59



Amostra 60

