

# Produção e caracterização de exoantígenos de *Fusarium verticillioides*

## Production and characterization of *Fusarium verticillioides* exoantigens

Paula Garcia Meirelles<sup>1</sup>; Luciana Biazon<sup>2</sup>; Mario Augusto Ono<sup>3</sup>;  
Adriana Pereira da Silva<sup>4</sup>; Elisa Yoko Hirooka<sup>5</sup>; Elisabete Yurie Sataque Ono<sup>6\*</sup>

### Resumo

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

**Palavras-chave:** Fungos, imunoensaio, ELISA, imunodeteção, micotoxinas

### Abstract

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

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

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

<sup>2</sup> Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Londrina, Mestre em Biotecnologia pela Universidade Estadual de Londrina.

<sup>3</sup> Docente do Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental – Departamento de Ciências Patológicas/CCB/UUEL

<sup>4</sup> Engenheiro Agrônomo pela Universidade Estadual de Londrina, Especialista em Bioquímica Aplicada pela Universidade Estadual de Londrina.

<sup>5</sup> Docente do Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos – Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos/CCA/UUEL

<sup>6</sup> Docente do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia/CCE/ UEL (E-mail: eysono@uel.br) – Campus Universitário, Londrina – PR.

\* Autor para correspondência.

## Introdução

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

As fumonisinas, descobertas em 1988, constituem um grupo de micotoxinas produzidas principalmente por *F. verticillioides* e *F. proliferatum*. Dentre os análogos do grupo, as FB<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub> e FB<sub>3</sub> são contaminantes naturais de milho e derivados, sendo a FB<sub>1</sub> a mais tóxica e abundante, compreendendo de 60 a 90% das fumonisinas (UENO, 1983; GELDERBLOM et al., 1988; GELDERBLOM et al., 1992b; BEZUIDENHOUT et al., 1988; VISCONTI; BONKE; DOKO, 1995; MUSSER; PLATNER, 1997; SEO; LEE, 1999).

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

A ocorrência de fumonisinas em milho brasileiro também é motivo de alerta, considerando a detecção de FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub> em 97,4% e 94,8%, respectivamente, de 48 amostras analisadas, sendo 39 do Estado do

Paraná e 9 do Mato Grosso do Sul e Goiás (HIROOKA et al., 1996). O processamento industrial do milho não elimina eficientemente a fumonisina pré-existente nos grãos, sendo a mesma detectada em seus produtos derivados (VISCONTI; DOKO, 1994; SHEPHARD et al., 1996).

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

A melhor estratégia para o controle da contaminação por fumonisinas é a prevenção da infecção por *Fusarium* spp. e da produção de fumonisinas no campo e na armazenagem dos grãos. Portanto, é imprescindível o desenvolvimento de ensaios adequados para a detecção do fungo, visando o controle de qualidade dos produtos destinados ao consumo humano e animal.

A identificação das espécies de *Fusarium* é complexa devido à variabilidade morfológica em cultura e mutações resultantes de repiques sucessivos. Os métodos tradicionais de identificação e detecção de fungos incluem o cultivo em diversos meios, exame microscópico e análises químicas de quitina, ergosterol ou metabólitos secundários (JARVIS et al., 1983). Com exceção da identificação de metabólitos secundários (incluindo as micotoxinas), a maioria destes métodos apresenta baixa especificidade e reprodutibilidade, além de consumirem muito tempo (LI; MARQUARDT; ABRAMSON, 2000).

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

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

Os exoantígenos são macromoléculas imunogênicas produzidas por fungos durante o seu desenvolvimento (LI; MARQUARDT; ABRAMSON, 2000). Estes apresentam grande valor, seja na imunoidentificação de fungos patogênicos ou na resolução de problemas taxonômicos, uma vez que a maioria dos fungos produz exoantígenos espécie-específicos (KAUFFMAN; STANDARD, 1987). Devido à termoestabilidade, os exoantígenos são detectados por ELISA mesmo após o processamento térmico, fornecendo inclusive informações sobre possíveis contaminações fúngicas de alimentos processados (NOTERMANS et al., 1986).

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

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

## Material e Métodos

### *Culturas fúngicas*

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

### *Obtenção de exoantígenos*

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

Após o cultivo de *F. verticillioides* 162A em ágar batata dextrose (BDA) a 28° C por 7 dias, a contagem de esporos foi efetuada em câmara de Newbauer e ajustada para 10<sup>7</sup> esporos/mL em solução de Tween 80 0,1% em água destilada estéril (v/v). Alíquotas de 1 mL da suspensão de esporos foram transferidas para erlenmeyers de 1 L contendo 250 mL de caldo BHI (brain heart infusion). O experimento foi realizado em duplicata. Os cultivos foram incubados a 28° C em condição agitada (180 r.p.m) ou estacionária por 7, 14 e 21 dias e inativados com timerosal 0,02% por 24 horas a 4° C.

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

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

*Determinação de proteínas*

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

*Determinação de carboidratos*

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

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

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

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

*Imunização dos coelhos e obtenção de anticorpos*

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

Os anticorpos para os exoantígenos dos 3 diferentes isolados foram produzidos a partir de imunizações de 3 coelhos machos, adultos jovens, da raça Nova Zelândia. A concentração dos exoantígenos foi ajustada para 320 µg/mL e então homogeneizados (v/v) com adjuvante incompleto de Freund. Os coelhos foram imunizados com 3 doses

de exoantígeno (0,5 mL contendo 80 µg de exoantígenos) por via subcutânea com intervalos de uma semana entre as doses. Uma semana após a 3ª dose o sangue de cada animal foi coletado e os soros titulados por imunodifusão radial dupla e ELISA.

*Imunodifusão radial dupla*

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

*ELISA indireto*

A titulação dos anticorpos policlonais foi realizada por ELISA indireto, de acordo com o método de Engvall e Pearlmann (1972) com algumas modificações. Os anticorpos policlonais foram testados nas diluições de 1:100 a 1:12.800 e os exoantígenos nas concentrações de 2 a 16 µg/mL.

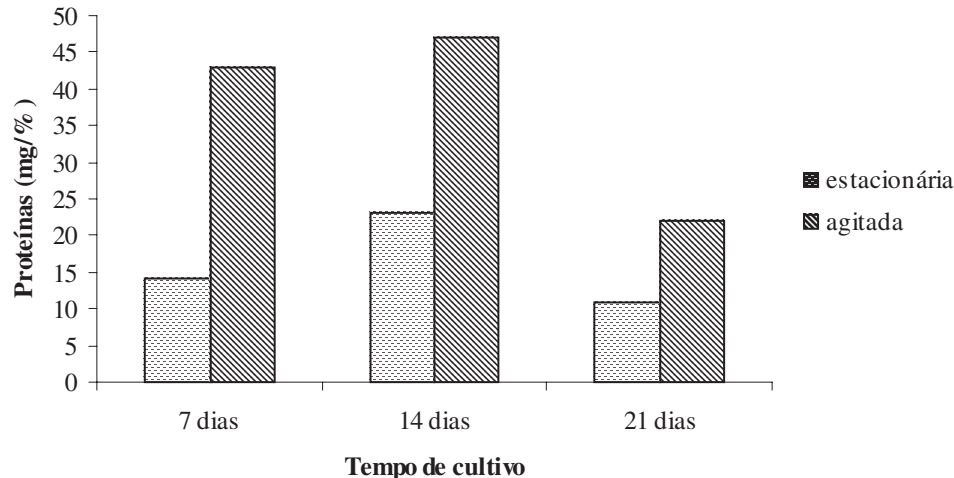
A microplaca foi sensibilizada com 100 µL/poço de exoantígenos de *F. verticillioides* em tampão carbonato/bicarbonato 0,2 M pH 9,6 seguido de incubação a 4° C por 16 horas. Após 3 lavagens com PBS-Tween 20 0,05% (PBS-T), a microplaca foi bloqueada com 150 µL de PBS leite desnatado 1% a 25° C por 30 minutos. A placa foi novamente lavada 3 vezes com PBS-T e 100 µL de diluições dos soros imunes e pré-imune (1:100) em PBS leite desnatado 1% foram adicionados e incubados a 25° C por uma hora. Após lavagens da microplaca conforme previamente descrito foram adicionados 100 µL do conjugado anti-IgG de coelho-peroxidase (1:1.000), seguido de incubação a 25° C por uma hora. A microplaca foi novamente lavada 3 vezes com PBS-T e uma vez com PBS, seguido da adição de 100 µL da solução de substrato/cromógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/tetrametilbenzidina) por 15 minutos. A reação foi

bloqueada com 50 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 N e as absorvâncias foram determinadas a 450 nm em leitora de ELISA (ELX 800 Reader – Bio Tek Instruments, Inc). Como controle negativo foram utilizados os soros pré-ímmunes (1:100), sendo as amostras consideradas positivas quando apresentaram leitura de absorvância 2 vezes maior que a do controle negativo.

## Resultados e Discussão

As condições ideais para a produção de exoantígenos de *Fusarium* spp. foram determinadas

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



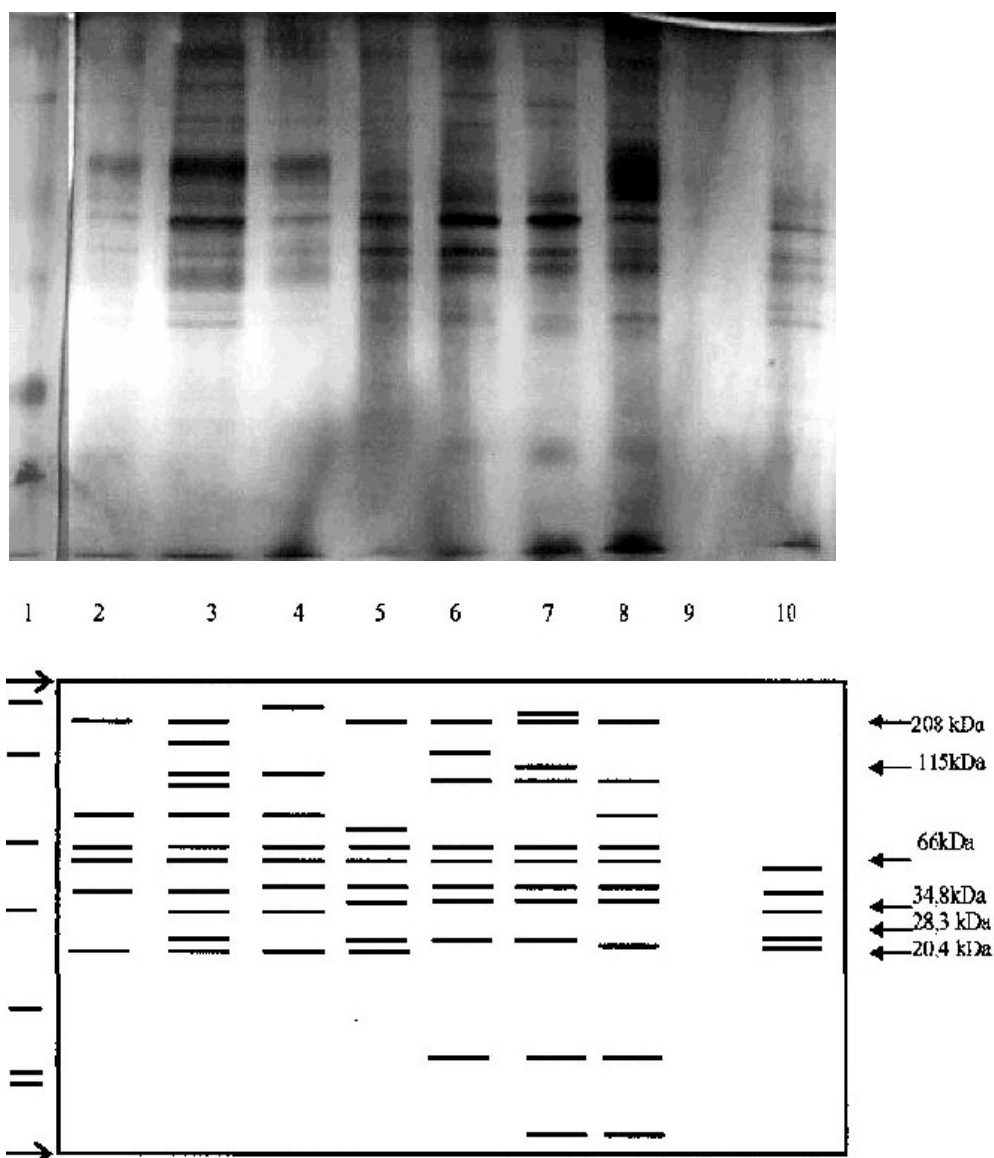
**Figura 1.** Concentração de proteínas dos exoantígenos obtidos sob condição agitada e estacionária por 7, 14 e 21 dias a 28°C

Os exoantígenos dos 8 isolados de *F. verticillioides* apresentaram uma ampla variação tanto na concentração de proteínas (100,3 a 530,0 µg/mL) quanto na de carboidratos (54,7 a 252,0 µg/mL), porém a concentração de proteínas sempre foi maior que a de carboidratos (Tabela 1). O perfil eletroforético dos exoantígenos apresentou uma grande diversidade de bandas, com massas moleculares aparentes variando entre 17 e 170 kDa

(Figura 2), enquanto que os exoantígenos de *F. sporotrichioides*, *F. poae* e *F. graminearum* apresentaram massas moleculares entre 7,2 e 80 kDa (GAN et al., 1997). Não foi observada relação direta entre o número de bandas e a concentração de proteínas dos exoantígenos. Os exoantígenos de *F. verticillioides* 97K e 164G apresentaram maior número de bandas, enquanto que o isolado 103Br apresentou menor número.

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

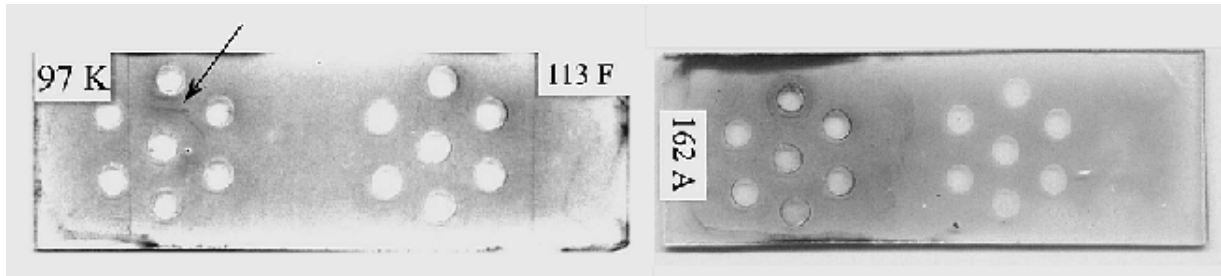
Isolados	Concentração de proteínas (µg/mL)	Concentração de carboidratos (µg/mL)
162A	530,0	129,1
113F	459,2	167,3
97K	320,0	252,0
164G	303,6	169,5
103Br	282,9	126,4
104Ga	229,8	210,0
119Br	139,5	109,2
103F	100,3	54,7

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

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

Após a obtenção dos anticorpos policlonais (anti-162A, anti-113F e anti-97K), foram realizados ensaios para a seleção do anticorpo mais específico, titulação

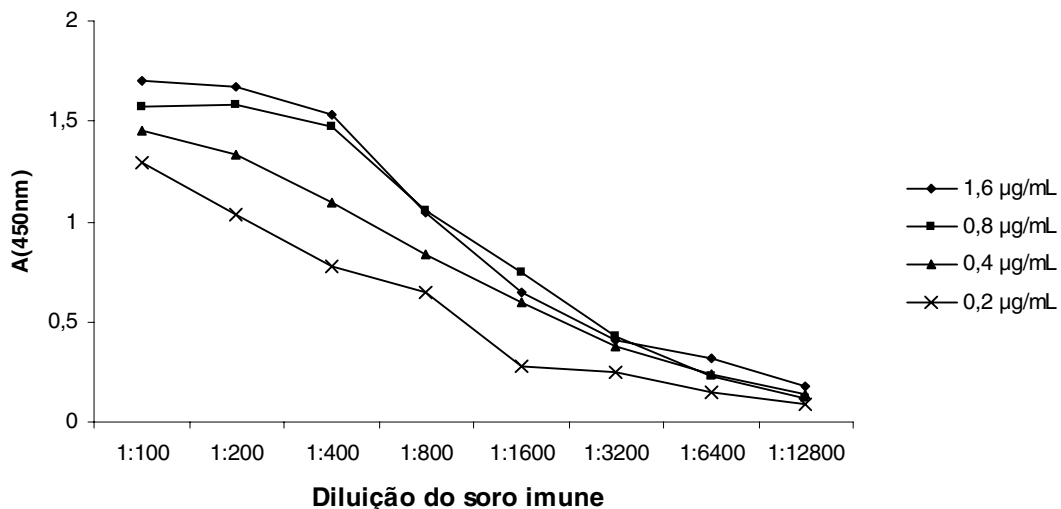
e padronização da concentração dos exoantígenos. Primeiramente, os três anticorpos policlonais produzidos foram analisados quanto ao reconhecimento ao antígeno por imunodifusão radial dupla (Figura 3). O soro anti-97K apresentou maior reatividade, sendo escolhido para a realização dos demais ensaios imunológicos.



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

Para o desenvolvimento dos ensaios imunoenzimáticos (ELISA) foi realizada inicialmente uma padronização da concentração dos exoantígenos. A reatividade do anticorpo policlonal anti-97K foi avaliada utilizando-se exoantígenos em concentrações variando de 0,2 a 1,6  $\mu\text{g}/\text{poço}$ . Entre as diferentes concentrações dos exoantígenos testadas, a concentração de 0,8  $\mu\text{g}/\text{poço}$  foi padronizada para realização dos ensaios imunoenzimáticos, uma vez

que não houve diferença significativa entre as duas maiores concentrações (Figura 4). Gan et al. (1997) utilizaram uma concentração de 0,5  $\mu\text{g}/\text{poço}$  para realização de um ELISA com exoantígenos de *F. sporotrichioides*, *F. poae* e *F. graminearum*, enquanto Lu et al. (1994) utilizaram 0,1  $\mu\text{g}/\text{poço}$  de exoantígenos para realização de um ELISA com exoantígenos de *P. aurantiogriseum*.

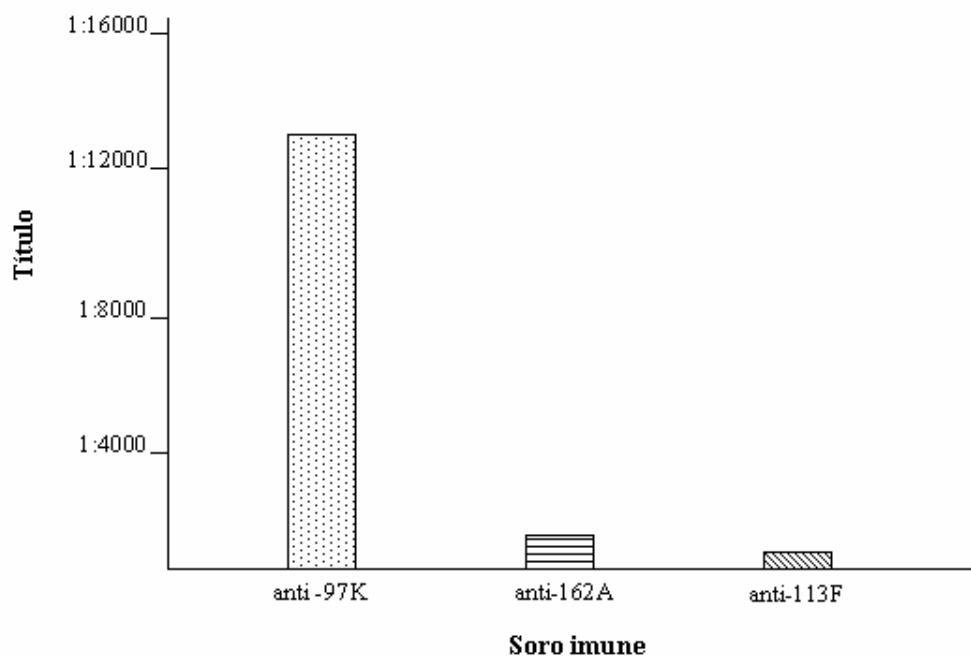


**Figura 4.** Reatividade dos anticorpos anti-97K com diferentes concentrações dos exoantígenos do isolado 97K de *F. verticillioides* por ELISA indireto.

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

Os soros anti-113F e anti-162A apresentaram um título de 1:400 e 1:800, respectivamente, enquanto que o anti-97K apresentou o maior título de anticorpos (1:12.800), sendo selecionado para os ensaios

posteriores (Figura 5). Este ensaio confirmou o resultado observado no teste de imunodifusão, indicando ser o anticorpo anti-97K o mais adequado para utilização em imunoenaios. Por outro lado, Gan et al. (1997) encontraram um título de 1:6.000 para *F. sporotrichioides* e *F. graminearum* e de 1:12.000 para *F. poae*. O título encontrado para os antígenos micelianos nas três espécies foi de 1:6.000, indicando que a sensibilidade do ELISA para exoantígenos é maior do que para antígenos micelianos.



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

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

### Agradecimentos

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



## Referências

- ABRAMSON, D.; GAN, Z.; CLEAR, R. M.; GILBERT, J.; MARQUARDT, R. R. Relationships among deoxynivalenol, ergosterol and *Fusarium* exoantigens in Canadian hard and soft wheat. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v.45, n.3, p.217-224, 1998.
- BARNA-VETRÓ, I.; GYÖNGYÖSI, A.; SOLT, L. Monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay of *Fusarium* T-2 and zearalenone toxins in cereals. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.60, n.2, p.729-731, 1994.
- BEZUIDENHOUT, S. C.; GELDERBLUM, W. C. A.; GROST-ALLMAN, C. P.; HORAK, R. M.; MARASAS, W. F. O.; SPITELLER, G.; VLEGGAAR, R. Structure elucidation of fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. *Journal of the Chemical Society Communications*, London, v.11, p.743-745, 1988.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, London, v.72, n.1-2, p.248-254, 1976.
- BULLERMAN, L. B. Occurrence of *Fusarium* and fumonisins on food grains and in foods. In: JACKSON, L. S.; DEVRIES, J. W.; BULLERMAN, L. B. (Ed.) *Fumonisin in food*. New York: Plenum Press, 1996. p.27-38.
- CAMARGO, Z. P.; UNTERKIRCHER, C.; CAMPOY, S. P.; TRAVASSOS, L. R. Production of *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for immunodiffusion tests. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v.26, p.2147-2151, 1988.
- DUBOIS, N.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, B. A.; SMITH, F. Colorimetric method determination of sugars and substances. *Analytical Chemistry*, Washington, v.28, n.3, p.350-356, 1956.
- ENGVALL, E.; PEARLMANN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA. III. Quantification of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen coated tubes. *Journal of Immunology*, Baltimore, v.109, p.129, 1972.
- GAN, Z.; MARQUARDT, R. R.; ABRAMSON, D.; CLEAR, R. M. The characterization of chicken antibodies raised against *Fusarium* spp. by enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblotting. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v.38, n.2-3, p.191-200, 1997.
- GELDERBLUM, W. C. A.; JASKIEWICZ, K.; MARASAS, W. F. O.; THIEL, P. G.; HORAK, R. M.; VLEGGAAR, R.; KRIEK, N. P. J. Fumonisin – novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.54, n.7, p.1806-1811, 1988.
- GELDERBLUM, W. C. A.; KRIEK, N. P. J.; MARASAS, W. F. O.; THIEL, P. G. Toxicity and carcinogenicity of the *Fusarium moniliforme* metabolite, fumonisin B<sub>1</sub> in rats. *Carcinogenesis*, Oxford, v.12, n.1-2, p.1247-1251, 1991.
- GELDERBLUM, W. C. A.; MARASAS, W. F. O.; VLEGGAAR, R.; THIEL, P. G.; CAWOOD, M. E. Fumonisin: isolation, chemical characterization and biological effects. *Mycopathologia*, Den Haag, v.117, n.1-2, p.11-16, 1992b.
- GELDERBLUM, W. C. A.; SAMPLE, E.; MARASAS, W. F. O. The cancer initiating potential of the fumonisin B mycotoxins. *Carcinogenesis*, Oxford, v.13, n.3, p.433-437, 1992a.
- GLENN, A. E.; HINTON, D. M.; YATES, E.; BACON, C. W. Detoxification of corn antimicrobial compounds as the basis for isolating *Fusarium verticillioides* and some other *Fusarium* species from corn. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.67, n.7, p.2973-2981, 2001.
- HIROOKA, E. Y.; YAMAGUCHI, M. M.; AOYAMA, S.; SUGIURA, Y.; UENO, Y. Natural occurrence of fumonisins in Brazilian corn kernels. *Food Additives and Contaminants*, London, v.13, n.2, p.173-183, 1996.
- JACKSON, L. S.; DEVRIES, J. W.; BULLERMAN, L. B. (Ed.) *Fumonisin in Food*. New York: Plenum Press, 1996.
- JARVIS, B.; SCILER, D. A. L.; OULD, A. J. L.; WILLIAMS, A. P. Observations on the enumeration of molds in food and feedstuffs. *Journal of Applied Bacteriology*, Oxford, v.55, n.2, p.325-336, 1983.
- KAUFMAN, L.; STANDARD, P. G. Specific and rapid identification of medically important fungi by exoantigen detection. *Annual Review of Microbiology*, Palo Alto, v.41, p.209-225, 1987.
- KERÉNYI, Z.; ZELLER, K.; HORNOK, L.; LESLIE, J. F. Molecular standardization of mating type terminology in the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.65, n.9, p.4071-4076, 1999.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, London, v.227, n.15, p.680-685, 1970.
- LI, S.; MARQUARDT, R. R.; ABRAMSON, D. Immunochemical detection of molds: a review. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v.63, n.2, p.281-291, 2000.
- LIN, H. H.; LISTER, R. M.; COUSIN, M. A. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of mold in tomato puree. *Journal of Food Science*, Chicago, v.51, n.1, p.180-183, 1986.

- LU, P.; MARQUARDT, R. R.; FROHLICH, A. A.; MILLS, J. T. Detection of *Penicillium aurantiogriseum* by ELISA utilizing antibodies produced against its exoantigens. *Microbiology*, Reading, v.140, p.3267-3276, 1994.
- MALLMAN, C. A.; SANTURIO, J. M.; DILKIN, P. Equine leukoencephalomalacia associated with ingestion of corn contaminated with fumonisin B<sub>1</sub>. *Revista de Microbiologia*, São Paulo, v.30, p.249-252, 1999.
- MARASAS, W. F. O.; KELLERMAN, T. S.; GELDERBLUM, W. C. A.; COETZER, J. A. W.; THIEL, P. G.; VANDERLUGT, J. J. Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B<sub>1</sub> isolated from *Fusarium moniliforme*. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, Pretoria, v.55, n.4, p. 197-203, 1988.
- MUSSER, S. M.; PLATTNER, R. D. Fumonisin composition in cultures of *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum* and *Fusarium nygami*. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, Easton, v.45, n.4, p.1169-1173, 1997
- NAGARAJ, R. Y.; WU, W.D; VESONDER, R. J. Toxicity of corn culture material of *Fusarium proliferatum* M-7176 and nutritional intervention in chicks. *Poultry Science*, Champaign, v.73, n.5, p.617-626, 1994.
- NIELSEN, B. L.; BROWN, L. R. The basis of coloured silver-protein complex formation in stained polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, New York, v.141, p.311-315, 1984.
- NORRED, W. P. Fumonisin – mycotoxins produced by *Fusarium moniliforme*. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, Washington, v.38, n.3, p.309-328, 1993.
- NOTERMANS, S.; HEUVELMAN, C. J.; VANEGMOND, H. P.; PAULSCH, W. E.; BESLING, J. R. Detection of mold in food by enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v.49, n.10, p.786-791, 1986.
- PESTKA, J. J.; ABOUZEID, M. N.; SUTIKNO. Immunological assays for mycotoxin detection. *Food Technology*, Chicago, v.49, n.2, p.120-128, 1995.
- SEO, J. A.; LEE, Y. W. Natural occurrence of the C series of fumonisins in moldy corn. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.65, n.3, p.1331-1334, 1999.
- SHEPHARD, G. S.; THIEL, P. G.; STOCKENSTRÖM, S.; SYDENHAM, E. W. Worldwide survey of fumonisin contamination of corn and corn-based products. *Journal of the Association of Official Analytical Chemistry International*, Arlington, v.79, n.3, p.671-687, 1996.
- SHIER, T. W.; ABBAS, H. K.; BADRIA, A. F. Structure-activity relationships of the corn fungal toxin fumonisin B<sub>1</sub>: Implications for food safety. *Journal of Natural Toxins*, Fort Collins, v.6, n.3, p.225-242, 1997.
- SYDENHAM, E. W.; MARASAS, W. F. O.; SHEPHARD, G. S.; THIEL, P. G.; HIROOKA, E. Y. Fumonisin concentration in Brazilian feeds associated with field outbreaks of animal mycotoxicosis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Easton, v.40, p.994-997, 1992.
- THORNTON, C. R.; PITT, D.; WAKLEY, G. E.; TALBOT, N. J. Production of a monoclonal antibody specific to the genus *Trichoderma* and closely related fungi, and its use to detect *Trichoderma* spp. in naturally infested compost. *Microbiology*, Reading, v.148, p.1263-1279, 2002.
- UENO, Y. *Trichotecenes – chemical, biological and toxicological aspects*. Tokyo: Kodansha, 1983.
- UENO, Y.; IJIMA, K.; WANG, S.; SUGIURA, Y.; SEKIJIMA, M.; TANAKA, T.; CHEN, C.; YU, S. Z. Fumonisin as a possible contributory risk factor for primary liver cancer. A 3-year study of corn harvested in Haimen, China, by HPLC and ELISA. *Food and Chemical Toxicology*, Oxford, v.35, p.1143-1150, 1997.
- VISCONTI, A.; DOKO, M. B. Survey of fumonisin production by *Fusarium* isolated from cereals in Europe. *Journal of the Association of Official Analytical Chemistry International*, Arlington, v.77, n.2, p.546-550, 1994.
- VISCONTI, A.; BONKE, A.; DOKO, M. B. Occurrence of fumonisins in Europe and the BCR-Measurement and Testing Projects. *Natural Toxins*, New York, v.3, n.4, p.269-274, 1995.
- WANG, D. S.; LIANG, Y. X.; IJIMA, K.; SUGIURA, Y.; TANAKA, T.; CHEN, G.; YU, S.Z.; UENO, Y. Co-contamination of mycotoxins in corn harvested in Haimen, a high risk area of primary liver cancer in China. *Mycotoxins*, v.41, p.67-70, 1995.
- WEIBKING, T.; LEDOUX, D. R.; BERMUDEZ, A. J.; TURK, J.R.; ROTTINGHAUS, G. E.; WANG, E.; MERRILL, A. H. Effects of feeding *Fusarium moniliforme* culture material, containing known levels of fumonisin B<sub>1</sub>, on the young broiler chick. *Poultry Science*, Champaign, v.72, n.3, p.456-466, 1993.