

Avaliação de fontes de carbono e nitrogênio na produção de fumonisina B₁ por *Fusarium verticillioides* em meio líquido definido

Evaluation of carbon and nitrogen sources on fumonisin B₁ production by *Fusarium verticillioides* in defined culture medium

Alexandre Tadachi Morey¹; Fábio Luiz Melquiades²; Maria Josefa Santos Yabe³; Mario Augusto Ono⁴; Elisa Yoko Hirooka⁵; Elisabete Yurie Sataque Ono^{6*}

Resumo

Fusarium verticillioides Sacc. Nirenberg (= *F. moniliforme* Sheldon) é um patógeno primário de milho e principal produtor de fumonisinas. Considerando que a qualidade e a concentração de nutrientes no substrato apresentam papel importante na produção de fumonisinas, este trabalho teve como objetivo avaliar a produção de fumonisina B₁ (FB₁) por *F. verticillioides* em cultivo líquido com diferentes fontes de carbono e nitrogênio. Três cepas (103F, 113B e 103BR) foram inoculadas em nove meios de cultivo líquido com diferentes fontes de carbono (glicose, frutose e maltose) na concentração de 20 g/L e nitrogênio (leucina, alanina e valina) na concentração de 1 g/L. Após a seleção da cepa (103F) e fonte de carbono/nitrogênio (maltose/leucina) que proporcionaram maior produção de FB₁, foram avaliados meios variando as concentrações de maltose e leucina. Fixando a concentração de leucina em 1 g/L e aumentando a concentração de maltose de 20 g/L para 40 g/L ocorreu um aumento na produção de FB₁ de 3,9 µg/mL para 4,7 µg/mL ($p < 0,05$). Por outro lado, fixando a concentração de maltose em 40 g/L e diminuindo a concentração de leucina em 50% (de 2 g/L para 1 g/L) ocorreu um aumento na produção de FB₁ de 2,3 µg/mL para 4,7 µg/mL ($p < 0,05$). A produção de FB₁ variou de acordo com a cepa de *F. verticillioides*, concentração e fonte de carbono/nitrogênio no meio líquido, sendo que o aumento da concentração de maltose apresentou um efeito positivo significativo (+0,6 ± 0,11), enquanto que o aumento da concentração de leucina apresentou um efeito negativo (-2,2 ± 0,11).

Palavras-chave: Fumonisinas, aminoácidos, carboidratos, meio de cultura líquido definido

Abstract

Fusarium verticillioides Sacc. Nirenberg (= *F. moniliforme* Sheldon) is a primary corn pathogen and the main fumonisin producer. Considering that the nutrient quality and its concentration in the culture medium have an important role in fumonisin production, the aim of this study was to evaluate fumonisin B₁ (FB₁) production by *F. verticillioides* in a liquid culture medium with different carbon and nitrogen sources. Three strains (103F, 113B and 103BR) were inoculated in nine liquid culture media with different carbon sources (glucose, fructose and maltose) at the concentration of 20 g/L and nitrogen (leucine, alanine and valine) at the concentration of 1 g/L. After selecting the strain (103F) and carbon/nitrogen

¹ Bacharel em Ciências Biológicas (UEL); Mestre em Biotecnologia (UEL)

² Docente do Departamento de Física – CET/Unicentro

³ Docente do Departamento de Química – CCE/UEL

⁴ Docente do Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental do Departamento de Ciências Patológicas – CCB/UEL.

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

⁶ Docente do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia/CCE/UEL. E-mail: eysono@uel.br

* Autor para correspondência

sources (maltose/leucine) that provided the highest FB₁ production, culture media with different maltose and leucine concentrations were evaluated. Keeping the leucine concentration at 1 g/L and increasing the maltose concentration from 20 g/L to 40 g/L, the FB₁ production increased from 3.9 µg/mL to 4.7 µg/mL ($p < 0.05$). On the other hand, keeping the maltose concentration at 40 g/L and decreasing the leucine concentration to 50% (from 2 g/L to 1 g/L) the FB₁ production increased from 2.3 µg/mL to 4.7 µg/mL ($p < 0.05$). FB₁ production varied according to the *F. verticillioides* strain, concentration and carbon/nitrogen source in the liquid culture medium and the increase in maltose concentration showed a significant positive effect ($+0.6 \pm 0.11$), whereas the increase in leucine concentration showed a negative effect (-2.2 ± 0.11).

Key words: Fumonisin, amino acids, carbohydrates, defined liquid culture medium

Introdução

O Brasil é o terceiro produtor mundial de milho, com uma produção anual de 41,3 milhões de toneladas, sendo o Estado do Paraná responsável por 26% da produção nacional (DUARTE et al., 2008).

Fusarium verticillioides (Sacc.) Nirenberg (= *Fusarium moniliforme* Sheldon) é um fungo de distribuição mundial, com alta ocorrência e infecção atingindo mais de 90% do milho, sendo que 90% das linhagens de *F. verticillioides* isoladas produzem fumonisin (BACON; NELSON, 1994).

Embora 28 análogos tenham sido identificados (RHEEDER; MARASAS; VISMER, 2002), apenas as fumonisin B₁ (FB₁), FB₂ e FB₃ ocorrem em concentrações significativas como contaminantes naturais de milho e derivados, sendo a FB₁ a mais tóxica e abundante, compreendendo de 60 a 90% das fumonisin detectadas (SYDENHAM et al., 1990).

As fumonisin causam leucoencefalomalácia em eqüinos (MARASAS et al., 1988), edema pulmonar em suínos (HARISSON et al., 1990) e redução do desenvolvimento e imunossupressão em aves (WEIBKING et al., 1993; NAGARAJ; WU; VESONDER, 1994). Em ratos, foi comprovada a ação hepatotóxica e hepatocarcinogênica (GELDERBLUM et al., 1991). Em seres humanos, estudos epidemiológicos indicam a associação do consumo de milho contaminado com fumonisin ao câncer esofágico na África do Sul, China e Itália, onde este cereal constitui o elemento básico da dieta

(MARASAS et al., 1981; FRANCESCHI et al., 1990; CHU; LI, 1994).

Vários fatores que podem influenciar a produção de fumonisin em meios de cultura têm sido estudados, como composição do meio (sólido ou líquido), pH, atividade de água, fontes de carbono e nitrogênio, elementos traço e presença de precursores de fumonisin (ALBERTS et al., 1990, 1994; PLATTNER; SHACKELFORD, 1992; BRANHAM; PLATTNER, 1993; MARÍN; SANCHIS; MAGAN, 1995; KELLER; SULLIVAN, 1996; CUERO et al., 1998). Embora as concentrações de fumonisin obtidas pelo cultivo de *F. verticillioides* em substratos naturais (meios sólidos) sejam mais elevadas, a extração e purificação requerem várias etapas e a utilização de solventes tóxicos (KELLER; SULLIVAN, 1996). Além disso, os métodos atuais utilizam meios complexos, que dificultam a análise das vias biossintéticas e mecanismos de controle (KELLER; SULLIVAN, 1996). Por outro lado, os meios de cultura líquidos reduzem a necessidade de solventes orgânicos durante a extração e purificação, uma vez que as fumonisin são encontradas no extrato livre de células, podendo ser extraída por simples filtração. Além disso, a co-eluição de interferentes derivados do meio sólido pode ser reduzida em meios líquidos (MILLER; SAVARD; SAPIOR, 1994). Considerando que as concentrações de fumonisin obtidas em cultura líquida são relativamente baixas, mais estudos são necessários visando a otimização da produção de fumonisin nesse tipo de cultura (KELLER; SULLIVAN, 1996).

Existem poucas informações sobre a influência dos nutrientes presentes no meio de cultura na biossíntese de fumonisina, sendo que, somente a participação de alguns aminoácidos nas etapas de biossíntese de fumonisinas tem sido estudada (PLATTNER; SHACKELFORD, 1992; BRANHAM; PLATTNER, 1993; BLACKWELL; MILLER; SAVARD, 1994).

Considerando que a qualidade e a concentração de nutrientes no meio de cultura influenciam na produção de fumonisinas, este trabalho teve como objetivo avaliar a produção de FB₁ por *F. verticillioides* em meios de cultivo líquido, com diferentes combinações de fontes de carbono e nitrogênio.

Material e métodos

Cultura de fungos

Foram utilizadas as cepas 103F, 113B e 103BR de *F. verticillioides* isoladas a partir de rações envolvidas em intoxicação animal. A identificação das cepas foi realizada na Science University of Tokyo, Japan.

Produção de fumonisina

Uma suspensão de esporos (10⁷ esporos/mL) de três cepas de *F. verticillioides* (103F, 113B e 103BR) cultivadas em ágar batata dextrose (BDA) por 7 dias a 28° C foi inoculada em nove diferentes condições de cultivo líquido à base de sais e vitaminas (50 mL) contendo 1 g/L KH₂PO₄, 1 g/L K₂HPO₄, 0,3 g/L MgSO₄, 32 mg/mL ZnSO₄, 100 mg/mL FeSO₄, 16 mg/L MnSO₄, 0,4 g/L CaCl₂, 1 mg/L tiamina, 1 mg/L riboflavina, 1 mg/L pantotenato, 1 mg/L niacina, 1 mg/L piridoxamina, 1 mg/L ácido α-lipóico, 100 µg/L ácido fólico, 100 µg/L biotina, 100 µg/L vitamina B₁₂ (KELLER; SULLIVAN; CHIRTEL, 1997) com pH ajustado para 3,7. Ao meio básico foram adicionadas as fontes de carbono (20 g/L) e nitrogênio (1 g/L) combinadas conforme a tabela 1. A incubação foi realizada a 28° C, 180 rpm por 15 dias. Os meios de cultura foram filtrados em papel Whatman n° 1 sob vácuo.

Após a seleção da cepa e da condição (carbono/nitrogênio) que proporcionaram maior produção de FB₁ foram preparados meios variando as concentrações de carbono (20 e 40 g/L) e nitrogênio (1 e 2 g/L). Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

Tabela 1. Combinações de fontes de carbono (20 g/L) e nitrogênio (1 g/L) em meio de cultivo líquido a base de sais e vitaminas.

Ensaio	Fonte de C/N
1	glucose/leucina
2	glucose/alanina
3	frutose/leucina
4	frutose/alanina
5	glucose/valina
6	maltose/alanina
7	frutose/valina
8	maltose/leucina
9	maltose/valina

Análise de biomassa

A determinação de biomassa foi realizada por gravimetria a 70° C até obtenção de peso constante (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985).

Determinação de fumonisina

A extração de fumonisinas foi realizada misturando uma alíquota de 2 mL do filtrado com 2 mL de metanol: água (3: 1, v/v). O extrato (1 mL) foi submetido à pré-limpeza em coluna de troca aniônica (Sep Pak accell plus QMA, Waters), eluído com metanol contendo ácido acético (0,5%) e seco sob fluxo de gás nitrogênio em Banho Maria a 45° C. Após a dissolução do extrato com acetonitrila: água (1: 1, v/v) de forma a obter a concentração de 200 a 1000 ng/mL, a amostra foi submetida à derivatização com o-ftaldialdeído. A determinação de fumonisinas foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), sistema isocrático de fase reversa Shimadzu consistindo de bomba 10AT e detector de fluorescência RF 10A XL, utilizando uma coluna Shim-pack CLC-ODS (M) (4,6 x 250 mm). As condições de operação foram: fluxo de 1 mL/minuto, temperatura de 25°C, detector de fluorescência com comprimento de onda de excitação e de emissão de 335nm e 450nm, respectivamente. A fase móvel consistiu de CH₃OH: NaH₂PO₄ (0,1 mol/L, 80: 20, v/v), pH 3,3 (SHEPHARD et al., 1990 modificado por UENO et al., 1993).

Cálculo dos efeitos principais e de interação

O efeito individual de cada atributo utilizado no delineamento experimental (efeito principal) e o efeito resultante da influência combinada dos atributos (efeito de interação) foram calculados de acordo com Barros Neto, Scarminio, Bruns (2003).

O cálculo do efeito principal da concentração de carbono na produção de FB₁ foi realizado por meio da fórmula:

$EP = [(y^A - y^B) + (y^C - y^D)]/2$, onde y corresponde à média da produção de FB₁ nas condições com 40 g/L de maltose e 2 g/L de leucina (y^A), 20 g/L de maltose e 2 g/L de leucina (y^B), 40 g/L de maltose e 1 g/L de leucina (y^C) e 20 g/L de maltose e 1 g/L de leucina (y^D).

O cálculo do efeito principal da concentração de nitrogênio na produção de FB₁ foi realizado por meio da fórmula:

$EP = [(y^A - y^B) + (y^C - y^D)]/2$, onde y corresponde à média da produção de FB₁ nas condições com 2 g/L de leucina e 40 g/L de maltose (y^A), 1 g/L de leucina e 40 g/L de maltose (y^B), 2 g/L de leucina e 20 g/L de maltose (y^C) e 1 g/L de leucina e 20 g/L de maltose (y^D).

O cálculo do efeito de interação da concentração de carbono com a de nitrogênio na produção de FB₁ foi realizado por meio da fórmula:

$EI = [(y^A + y^B) - (y^C + y^D)]/2$, onde y corresponde à média da produção de FB₁ nas condições com 2 g/L de leucina e 40 g/L de maltose (y^A), 1 g/L de leucina e 20 g/L de maltose (y^B), 2 g/L de leucina e 20 g/L de maltose (y^C) e 1 g/L de leucina e 40 g/L de maltose (y^D).

Análise estatística

As diferenças nas médias de produção de biomassa e fumonisina B₁ em diferentes fontes de C/N por *F. verticillioides* 103F, 113B e 103BR, assim como em diferentes concentrações de maltose e leucina por *F. verticillioides* 103F foram avaliadas estatisticamente utilizando ANOVA seguida pelo teste de Tukey (p < 0,05). A análise estatística foi realizada utilizando o programa 'Statistica' versão 6.0 (Stat Soft, Inc.).

Resultados e discussão

Na tabela 2 é apresentada a produção de biomassa e FB₁ por três cepas de *F. verticillioides* em meios de cultivo líquido contendo diferentes fontes de carbono e nitrogênio.

Tabela 2. Produção de biomassa e fumonisina B₁ em diferentes fontes de C/N por *F. verticillioides* 103F, 113B e 103BR a 28° C, 180 rpm por 15 dias

Fonte de C/N	<i>F. verticillioides</i>					
	103F		113B		103BR	
	Bm* (g)	FB ₁ ** (µg/ mL)	Bm* (g)	FB ₁ ** (µg/ mL)	Bm* (g)	FB ₁ ** (µg/mL)
glucose/leucina	0,44 ^a	ND	0,15 ^{eg}	0,2 ^a	0,10 ^{cd}	ND
glucose/alanina	0,33 ^{bc}	ND	0,33 ^{ab}	ND	0,25 ^a	ND
frutose/leucina	0,23 ^e	2,1 ^b	0,14 ^g	0,1 ^b	0,14 ^b	0,3 ^c
frutose/alanina	0,14 ^f	2,1 ^b	0,23 ^{de}	0,1 ^b	0,13 ^{bc}	0,5 ^b
glucose/valina	0,35 ^b	0,4 ^c	0,34 ^a	ND	0,28 ^a	ND
maltose/alanina	0,31 ^{cd}	0,7 ^c	0,26 ^{cd}	ND	0,07 ^d	0,3 ^c
frutose/valina	0,32 ^{bc}	ND	0,29 ^{bc}	ND	0,14 ^b	ND
maltose/leucina	0,28 ^d	4,3 ^a	0,30 ^{abc}	ND	0,10 ^{cd}	0,9 ^a
maltose/valina	0,17 ^f	1,7 ^b	0,19 ^e	0,1 ^b	0,12 ^{bc}	0,6 ^b

Bm: Biomassa, FB₁: Fumonisina B₁, ND: não detectado

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

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

A produção de biomassa variou de 0,14 g a 0,44 g para a cepa 103F nos meios com frutose/alanina e glucose/leucina, respectivamente. Para a cepa 113B, a variação foi de 0,14 g a 0,34 g, nos meios com frutose/leucina e glucose/valina, respectivamente, enquanto que para a cepa 103BR, a variação foi de 0,07 g a 0,28 g, nas condições maltose/alanina e glucose/valina, respectivamente. Houve uma tendência de maior produção de biomassa em meios contendo glucose como fonte de carbono.

A produção de FB₁ variou conforme a cepa e fonte de carbono/nitrogênio, de não detectada a 0,2 µg/mL, 0,9 µg/mL e 4,3 µg/mL para as cepas 113B, 103BR e 103F, respectivamente.

Não foi detectada produção de FB₁ pelas três cepas de *F. verticillioides* em meios contendo glucose/alanina. Branham e Plattner (1993) relataram que a adição de alanina em meios de cultivo diminuía a produção de FB₁. Segundo os autores possivelmente a redução na relação C/N, promovida pela adição de aminoácidos, diminui a produção de FB₁. Esses mesmos autores demonstraram por meio de alanina marcada ¹⁴C, que esta era incorporada diretamente nas primeiras etapas da biossíntese de fumonisina.

Estudos realizados por Plattner e Shackelford (1992), e Branham e Plattner (1993) demonstraram que a metionina e alanina são precursores na biossíntese de FB₁ por *F. verticillioides*.

Nos meios de cultivo contendo maltose como fonte de carbono houve maior produção de FB₁ pelas cepas 103F e 103BR, provavelmente porque a maltose possui mais átomos de carbono numa mesma massa quando comparada às outras fontes utilizadas neste trabalho. Estes resultados estão de acordo com os de Jiménez et al. (2003) que demonstraram maior produção de fumonisina por duas cepas do complexo *Gibberella fujikuroi* em meios contendo maltose.

O fato de as cepas 103F e 103BR produzirem mais FB₁ no meio contendo maltose/leucina (p < 0,05) sugere que a leucina pode ser uma fonte de nitrogênio importante na biossíntese de fumonisina.

De maneira geral, a produção de FB₁ foi menor nas condições que proporcionaram maior produção de biomassa. Similarmente, Jiménez et al. (2003) verificaram que a maior produção de biomassa pela cepa Gf2 resultou em menor produção de fumonisinas.

A cepa 103F produziu maior concentração de FB_1 (4,3 $\mu\text{g/mL}$) no meio de cultivo contendo maltose como fonte de carbono e leucina como fonte de nitrogênio ($p < 0,05$). Considerando que as concentrações de carboidrato e nitrogênio interferem

na produção de fumonisinas foram analisados o efeito principal e de interação desses parâmetros por meio da condução de um experimento variando a concentração dessas fontes (tabela 3).

Tabela 3. Produção de biomassa e fumonisina B_1 em diferentes concentrações de maltose e leucina por *F. verticillioides* 103F a 28° C, 180 rpm por 15 dias.

Maltose/Leucina (g/L)	Biomassa* (g)	FB_1 ** ($\mu\text{g/mL}$)
20/2	0,33 ^a	1,9 ^c
40/1	0,15 ^c	4,7 ^a
20/1	0,22 ^{bc}	3,9 ^b
40/2	0,26 ^{ab}	2,3 ^c

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

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

O cálculo do efeito principal indicou que a concentração de maltose apresentou um efeito positivo significativo ($p < 0,05$) na produção de FB_1 ($+0,6 \pm 0,11$). Fixando a concentração de leucina em 2 g/L e aumentando a concentração de maltose de 20 g/L para 40 g/L ocorreu um aumento na produção de FB_1 de 1,9 $\mu\text{g/mL}$ para 2,3 $\mu\text{g/mL}$ (figura 1).

O cálculo do efeito principal da leucina demonstrou um efeito sensível significativo ($p < 0,05$), mas oposto ($-2,2 \pm 0,11$), ou seja, fixando a

concentração de maltose em 40 g/L e aumentando a concentração de leucina de 1 g/L para 2 g/L, ocorreu uma diminuição na produção de FB_1 de 4,7 $\mu\text{g/mL}$ para 2,3 $\mu\text{g/mL}$ (tabela 3 e figura 1).

O efeito da interação da concentração de maltose e leucina na produção de FB_1 não foi significativo ($p < 0,05$) e podem ser interpretados separadamente em razão do baixo valor ($-0,2 \pm 0,11$) de interação entre eles.

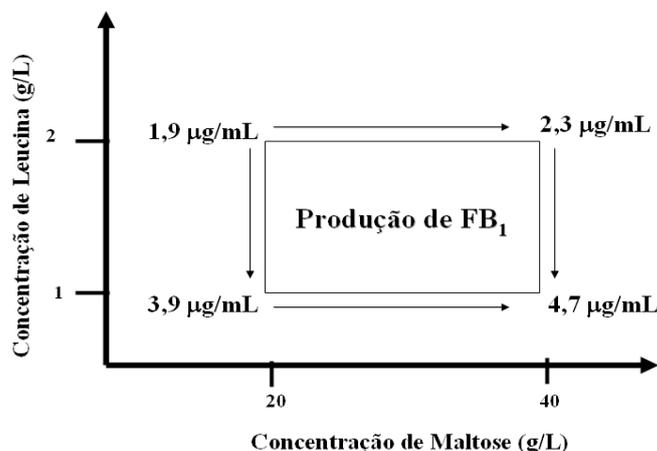


Figura 1. Produção de FB_1 por *F. verticillioides* 103F em diferentes concentrações de maltose e leucina.

Jiménez et al. (2003) observaram um aumento na produção de fumonisinas com o aumento da concentração da fonte de carbono no meio, independente do carboidrato usado e uma diminuição muito acentuada quando o nível dos aminoácidos serina, treonina, ácido glutâmico, valina e alanina foi aumentado de 1 para 10 g/L, sendo que nessa última concentração a produção de fumonisina foi praticamente nula.

A razão carbono/nitrogênio (C/N) desempenha um papel importante na regulação da via biossintética de fumonisinas. Alguns autores têm sugerido que o quociente C/N influencia na quantidade de fumonisinas sintetizada (BRANHAM; PLATTNER, 1993), assim como nos níveis de crescimento fúngico. Portanto, um aumento no valor desse quociente leva a uma diminuição na produção da biomassa fúngica e a um aumento na produção de toxina, enquanto que uma diminuição no quociente apresenta um efeito oposto (JIMÉNEZ et al., 2003).

Menor produção de biomassa e maior concentração de FB₁ foram obtidas nos meios contendo 1 g/L de leucina pela cepa 103F, indicando que a fonte de nitrogênio é um fator determinante no crescimento fúngico.

A produção de FB₁ variou de acordo com a cepa de *F. verticillioides*, concentração e fonte de C/N no meio líquido, sendo que a maltose apresentou um efeito positivo significativo, enquanto que a leucina apresentou um efeito negativo.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação Araucária, CNPq, Fundo Paraná/SETI, PPSUS/Ministério da Saúde e CAPES pelo apoio financeiro.

Referências

- ALBERTS, J. F.; GELDERBLUM, W. C. A.; MARASAS, W. F. O.; RHEEDER, J. P. Evaluation of liquid media for fumonisin production by *Fusarium moniliforme* MRC 826. *Mycotoxin Research*, Heidelberg, v. 10, n. 2, p. 107–115, 1994.
- ALBERTS, J. F.; GELDERBLUM, W. C. A.; THIEL, P. G.; MARASAS, W. F. O.; VAN SCHALKWYK, D. J.; BEHREND, Y. Effects of temperature and incubation period on the production of fumonisin B₁ by *Fusarium moniliforme*. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 56, n. 6, p. 1729–1733, 1990.
- BACON, C. W.; NELSON, P. E. Fumonisin production in corn by toxigenic strains of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum*. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v. 57, n. 6, p. 514–521, 1994.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. *Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria*. 2. ed. Campinas: Ed. da Unicamp, 2003.
- BLACKWELL, B. A.; MILLER, J. D.; SAVARD, M. E. Production of carbon 14-labeled fumonisin in liquid culture. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists International*, Arlington, v. 77, n. 2, p. 506–511, 1994.
- BRANHAM, B. E.; PLATTNER, R. D. Alanine is a precursor in the biosynthesis of fumonisin B₁ by *Fusarium moniliforme*. *Mycopathologia*, Den Haag, v. 124, n. 2, p. 99–104, 1993.
- CHU, F. S.; LI, G. Y. Simultaneous occurrence of fumonisin B₁ and other mycotoxins in moldy corn collected from the People's Republic of China in regions with high incidences of esophageal cancer. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 60, n. 3, p. 847–852, 1994.
- CUERO, R.; DUFFUS, E.; WILLIAMS, M.; BACA, D.; NAVARRO, M. Effects of zinc and associated mycoflora on fungal growth and toxin production: *F. moniliforme*, *F. graminearum*, *Aspergillus flavus*. In: MIRAGLIA, M.; VAN EGMOND, H.; BRERA, C.; GILBERT, J. (Ed.) *Mycotoxins and Phycotoxins: developments in chemistry, toxicology and food safety*. Fort Collins: Alaken, 1998. p. 311–319.
- DUARTE, J. O.; CRUZ, J. C.; GARCIA, J. C.; MATTOSO, M. J. *Embrapa Milho e Sorgo: sistema de produção: importância econômica*. Disponível em: <<http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho>>. Acesso em: 17 abr. 2008.

- FRANCESCHI, S.; BIDOLI, E.; BARÓN, A. E.; LA VECCHIA, C. Maize and risk of cancer of the oral cavity, pharynx and esophagus in Northeastern Italy. *Journal of the National Cancer Institute*, Bethesda, v. 82, n. 17, p. 1407-1411, 1990.
- GELDERBLUM, W. C. A.; KRIEK, N. P. J.; MARASAS, W. F. O.; THIEL, P. G. Toxicity and carcinogenicity of the *Fusarium moniliforme* metabolite, fumonisin B₁ in rats. *Carcinogenesis*, Oxford, v. 12, n. 1-2, p. 1247-1251, 1991.
- HARISSON, L. R.; COLVIN, B. M.; GREEN, J. T.; NEWMAN, L. E.; COLE, J. R. Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B₁, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, Columbia, v. 2, n. 3, p. 217-221, 1990.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. *Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*. 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. v. 1.
- JIMÉNEZ, M.; MATEO, J. J.; HINOJO, M. J.; MATEO, R. Sugar and amino acids as factors affecting the synthesis of fumonisins in liquid cultures by isolates of the *Gibberella fujikuroi* complex. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 89, n. 2, p. 185-193, 2003.
- KELLER, S. E.; SULLIVAN, T. M. Liquid culture methods for the production of fumonisin. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, New York, n. 392, p. 205-212, 1996.
- KELLER, S. E.; SULLIVAN, T. M.; CHIRTEL, S. Factors affecting the growth of *Fusarium proliferatum* and the production of fumonisin B₁: oxygen and pH. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, Heidelberg, v. 19, n. 4, p. 305-309, 1997.
- 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 B₁ isolated from *Fusarium moniliforme*. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, Petroria, v. 55, n. 4, p. 197-203, 1988.
- MARASAS, W. F. O.; WIENER, N. P. J.; VAN RENSBURG, S. J.; VAN SCHALKWYK, D. J. Mycoflora of corn produced in human esophageal cancer areas in Transkei, southern Africa. *Phytopathology*, Saint Paul, v. 71, n. 8, p. 792-796, 1981.
- MARÍN, S.; SANCHIS, V.; MAGAN, N. Water activity, temperature, and pH effects on growth of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* isolates from maize. *Canadian Journal of Microbiology*, Saskatoon, v. 41, n. 12, p. 1063-1070, 1995.
- MILLER, J. D.; SAVARD, M. C.; RAPIOR, S. Production and purification of fumonisins from a stirred jar fermenter. *Natural Toxins*, San Francisco, v. 2, n. 6, p. 354-359, 1994.
- 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.
- PLATTNER, R. D.; SHACKELFORD, D. D. Biosynthesis of labeled fumonisins in liquid cultures of *Fusarium moniliforme*. *Mycopathologia*, Den Haag, v. 117, n. 1-2, p. 17-22, 1992.
- RHEEDER, J. P.; MARASAS, W. F. O.; VISMER, H. F. Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 68, n. 5, p. 2101-2105, 2002.
- SYDENHAM, E. W.; GELDERBLUM, W. C. A.; THIEL, P. G.; MARASAS, W. F. O. Evidence for the natural occurrence of fumonisin B₁ a mycotoxin produced by *Fusarium moniliforme* in corn. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Easton, v. 38, n. 1, p. 285-290, 1990.
- UENO, Y.; AOYAMA, S.; SUGIURA, Y.; WANG, D. S.; LEE, U. S.; HIROOKA, E. Y.; HARA, S.; KARKI, T.; CHEN, G.; YU, S. Z. A limited survey of fumonisins in corn and corn-based products in Asian countries. *Mycotoxin Research*, Heidelberg, v. 9, n. 1, p. 27-34, 1993.
- 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 B₁, on the young broiler chick. *Poultry Science*, Champaign, v. 72, n. 3, p. 456-466, 1993.