

Efeito do sistema de plantio sobre a contaminação fúngica e os níveis de fumonisinas em diferentes partes da espiga de milho

Effect of cropping system on fungi contamination and fumonisin levels in different parts of corn ear

Elaine Cunha Moreno¹, Carolina Nachi Rossi¹, Cássia Reika Takabayashi³, Jaqueline Gozzi Bordini¹, Aline Myuki Omori⁴, Martin Homechin², Elisa Yoko Hirooka³, Elisabete Yurie Sataque Ono¹

¹Depto. de Bioquímica e Biotecnologia - CCE - Universidade Estadual de Londrina

²Depto. de Agronomia - CCA - Universidade Estadual de Londrina

³Depto. de Ciências e Tecnologia de Alimentos - CCA - Universidade Estadual de Londrina

⁴Depto. de Ciências Patológicas - CCB - Universidade Estadual de Londrina

Endereço para Correspondência

Elisabete Yurie Sataque Ono

Depto. de Bioquímica e Biotecnologia - Centro de Ciências Exatas

Rodovia Celso Garcia Cid, Pr 445, Km 380 - Campus Universitário, Cx. Postal: 6001

CEP 86055-900, Londrina – PR, Brasil

E-mail: eysono@uel.br

Resumo

A contaminação do milho (*Zea mays* L.) por fungos e micotoxinas reduz a qualidade do produto e representa riscos à saúde humana e animal. *Fusarium verticillioides* é um patógeno primário de milho e principal produtor de fumonisinas. O emprego de práticas culturais como sucessão de culturas e os sistemas de plantio direto e convencional são algumas medidas que podem reduzir a fonte de inóculo no solo e auxiliar no controle deste patógeno. Portanto, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito dos sistemas de plantio direto e convencional em sucessão a aveia ou pousio, no inverno, sobre a contaminação fúngica e os níveis de fumonisinas em diferentes partes da espiga de milho durante duas safras consecutivas (2005/2006, n=60) e (2006/2007, n=12). *Fusarium* spp. foi detectado em 90% (n=54) das amostras na safra de 2005/2006 e em 100% (n=12) das amostras na safra de 2006/2007. Na safra de 2005/2006, os níveis de fumonisinas foram maiores na base da espiga independentemente da prática cultural empregada, sendo a maior média (11,98 µg.g⁻¹) detectada no sistema de plantio direto com sucessão a aveia. Por outro lado, na safra de 2006/2007 os plantios com sucessão a aveia apresentaram os maiores níveis de contaminação na base da espiga enquanto que os plantios com sucessão a pousio apresentaram maior contaminação no ápice. As maiores médias de fumonisinas foram detectadas no plantio direto em sucessão a aveia (7,75 µg.g⁻¹) e pousio no inverno (3,85 µg.g⁻¹). O emprego de práticas culturais adequadas pode ser uma alternativa para minimizar a contaminação de milho pelo gênero *Fusarium* e por fumonisinas.

Palavras-chave: milho, *Fusarium verticillioides*, fumonisinas, sistema de plantio, cultivares

Abstract

Corn contamination by fungi and mycotoxins reduces the product quality and causes risks to human and animal health. *Fusarium verticillioides* is the primary corn pathogen and the main fumonisin producer. Cultural practices such as crop successions and the conventional and no-tillage systems are some approaches that can minimize the inoculum source in soil and assist in the control of this pathogen. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of the conventional and no-till area cultivated with corn in the summer following either oats or fallow in the winter on fungal contamination and fumonisin levels in different parts of corn ear during two consecutive growing seasons (2005/2006, n=60) and (2006/2007, n=12). Fifty four samples (90%) of the 2005/2006 and 12 samples (100%) of the 2006/2007 growing seasons were contaminated with *Fusarium* spp. Fumonisin levels in 2005/2006 growing season were higher in the ear base regardless the cultural practice and the highest mean level ($11.98 \mu\text{g.g}^{-1}$) was detected in no-till corn following oats. In the 2006/2007 growing season, the plantations following oats in the winter showed the highest contamination levels in the base of corn ear, while plantations following fallow showed the highest contamination in the apex of corn ear. The highest mean fumonisin levels were detected in no-till corn following oats ($7.75 \mu\text{g.g}^{-1}$) and fallow ($3.85 \mu\text{g.g}^{-1}$) in the winter. Adequate cultural practices can be an alternative to minimize corn contamination by *Fusarium* spp. and fumonisins.

Keywords: corn, *Fusarium verticillioides*, fumonisins, cropping system, cultivars

INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é um cereal de grande importância econômica e social, cultivado no mundo todo. Em média 70% da produção mundial de milho são destinadas à alimentação animal ⁽¹⁾.

Segundo a USDA (United States Department of Agriculture), a produção mundial de milho (safra 2008/2009) foi de 798,02 milhões de toneladas ⁽²⁾. O Brasil destaca-se como o terceiro maior produtor mundial de milho superado apenas pelos Estados Unidos e China. A produção do país para safra de 2008/2009 foi de 51 milhões de toneladas, sendo o Estado do Paraná, maior produtor nacional, responsável por 21,8 % deste total ⁽³⁾.

No entanto, o milho está exposto à contaminação por micro-organismos, principalmente fungos toxigênicos, que afetam a produtividade e a qualidade dos grãos e sementes. O clima úmido e quente na fase de polinização, danos causados por insetos nas espigas, mau empalhamento ^(4:5), estocagem inadequada dos grãos em temperatura e umidade elevadas ⁽⁶⁾ e posição das sementes na espiga (maior suscetibilidade no ápice e base) ⁽⁷⁾ são fatores que favorecem a incidência desses fungos.

O fungo toxigênico *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg (anteriormente denominado de *Fusarium moniliforme* Sheldon) ⁽⁸⁾, além de ser um dos principais responsáveis pela podridão de sementes e morte da planta ⁽⁹⁾, é um dos principais produtores de fumonisinas, as quais estão associadas a problemas de saúde humana e animal ⁽¹⁰⁾.

As fumonisinas constituem um grupo de micotoxinas que apresentam 28 análogos caracterizados desde 1988, sendo as fumonisinas B₁ (FB₁), B₂ (FB₂) e B₃ (FB₃) as mais frequentes em milho e derivados ⁽¹¹⁾. A FB₁ é considerada a mais tóxica e mais abundante ⁽¹²⁾, representando 70% da concentração total em alimentos e sementes naturalmente contaminados ⁽¹³⁾.

A ocorrência de FB₁ em cereais e derivados induz à leucoencefalomalácia em equinos (LEME) e edema pulmonar em suínos ⁽¹⁴⁾. Em seres humanos, estudos epidemiológicos indicam a sua associação com o câncer esofágico e hepático primário ⁽¹⁵⁾.

A melhor estratégia para o controle efetivo da contaminação por fumonisinas é a prevenção da infecção por *Fusarium verticillioides* e da produção de fumonisinas no campo e na armazenagem. O sistema de plantio e rotação de culturas tem grande importância no controle fitossanitário da cultura de milho, uma vez que as práticas agrícolas atuam diretamente nas características químicas e biológicas do solo e conseqüentemente, na microflora contaminante do cereal ⁽¹⁶⁾.

Na cultura do milho empregam-se os sistemas de plantio direto e convencional. O sistema de plantio direto processa-se em solo não revolvido, enquanto no sistema convencional ocorre um intenso revolvimento do solo. O sistema de preparo convencional proporciona condições adequadas para a germinação das sementes, crescimento e desenvolvimento das raízes, com o objetivo de aumentar os índices de produção da cultura ⁽¹⁷⁾. Este sistema também tem o objetivo de diminuir os problemas causados por certas pragas que permanecem no mínimo uma fase do seu ciclo biológico no solo ou na superfície do mesmo ⁽¹⁸⁾. Por outro lado, o não revolvimento do solo proporciona inúmeras vantagens em relação ao convencional como o controle de erosão, diminuição das oscilações bruscas e acentuadas de temperatura do solo, mantendo a umidade, proporcionando o crescimento uniforme das sementes e plântulas o que acarreta uma economia de até 15% nos custos ⁽¹⁹⁾.

Os diferentes sistemas de plantio podem acarretar muitas alterações qualitativas e quantitativas na biomassa microbiana e na sua atividade ⁽²⁰⁾, constituindo uma das estratégias para minimizar os níveis de contaminação por fungos toxigênicos e suas toxinas. Este trabalho teve como objetivo avaliar a contaminação fúngica e os níveis de fumonisinas em três partes da espiga de milho (ápice, meio e base) cultivado sob diferentes sistemas de plantio e sucessão de culturas.

MATERIAL E MÉTODOS

Caracterização da área de estudo

O estudo foi conduzido na área experimental da Fazenda Escola da Universidade Estadual de Londrina, localizada na região Norte do Estado do Paraná durante o ano de 2006 e 2007. O município de Londrina possui área total de 1.728,7 km², latitude de 23,37° S, longitude de 51,17° W e altitude de 585 m ^(21;22). O clima é classificado como subtropical úmido, mesotérmico, com temperaturas mais altas no verão (dezembro a fevereiro, média > 22°C) e mais amenas no inverno (maio a julho, média < 18°C) ⁽²³⁾.

Sistema de plantio e sucessão de culturas

O híbrido de milho AGROESTE foi cultivado na Fazenda Escola da Universidade Estadual de Londrina (latossolo vermelho) semeando seis sementes/metro linear. As unidades experimentais constituíram-se de quatro linhas de 5 m com espaçamento de 0,90 m entre elas, totalizando 20 parcelas para cada sistema de plantio na safra de 2005/2006 e 4 parcelas para cada sistema de plantio na safra de 2006/2007. Neste trabalho foi avaliada a

influência dos sistemas de plantio direto e convencional em sucessão a aveia e pousio no inverno (safras 2005/2006 e 2006/2007) sobre a contaminação fúngica e os níveis de fumonisinas em diferentes partes da espiga de milho (ápice, meio e base). A amostragem consistiu na coleta de 10 espigas de milho por parcela, as quais foram divididas em ápice, meio e base, totalizando 1,5 kg. Em seguida, as amostras de milho (1,5 kg) foram homogeneizadas, conduzidas ao laboratório e mantidas a 4°C por no máximo 7 dias para análise microbiológica. Para a determinação dos níveis de fumonisinas, 200 g de cada amostra de milho foram triturados até a granulometria de 50 mesh e estocados a -20°C.

Grau de empalhamento

O grau de empalhamento foi avaliado empregando uma escala de valores entre 1 a 5 de acordo com o diagrama do CIMMYT (Centro Internacional de Melhoramento de Milho e Trigo) do México⁽²⁴⁾, sendo:

1 = excelente empalhamento, com palha cobrindo firmemente e estendo-se além da ponta da espiga;

2 = espiga com ponta firmemente coberta, porém não se estendendo além desta;

3 = espiga com ponta frouxamente coberta, e ponta descoberta;

4 = espiga com palha não cobrindo adequadamente e grãos expostos;

5 = espiga com pobre cobertura e pontas claramente expostas.

Avaliação da microbiota fúngica

Uma alíquota de 10 g de milho triturado foi homogeneizada em 90 mL de água peptonada estéril 0,1% (v/v) e submetida a diluições seriadas em tubos contendo 9,0 mL do mesmo diluente até fator 10^{-5} . Uma alíquota de 1 mL de cada diluição foi inoculada em profundidade em placas de Petri (em duplicata) contendo ágar batata dextrosado (BDA - pH 4,0) adicionado de 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de cloranfenicol. As placas foram incubadas a 25 °C por 6 dias, procedendo-se à contagem e identificação dos gêneros de acordo com os métodos preconizados por Nelson et al. (1983)⁽²⁵⁾, Singh et al. (1991)⁽²⁶⁾ e Samson et al. (1995)⁽²⁷⁾.

Determinação de fumonisinas

A determinação de fumonisinas (FB₁ e FB₂) foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) segundo o método de Shephard et al. (1990)⁽²⁸⁾ modificado por Ueno et al. (1993)⁽²⁹⁾. Uma alíquota de 10 g de milho triturado foi adicionada a 30 mL de metanol: água (3:1, v/v), mantida em repouso por 10 minutos a temperatura ambiente, seguida de agitação a 150 r.p.m. por 30 minutos. A suspensão foi centrifugada a 4500 × g por 10 minutos e o sobrenadante foi submetido à pré-limpeza em cartucho de troca aniônica Sep-Pak accell plus QMA (Waters Co., Ltda), previamente acondicionada com 6 mL de metanol: água (3:1, v/v) seguida de 3 mL de metanol, sendo as fumonisinas eluídas com 10 mL de ácido acético 0,5% em metanol. O eluato foi seco a 45 °C sob fluxo de nitrogênio, o resíduo dissolvido em 800 μL de metanol: água (3:1, v/v), e uma alíquota de 200 μL seca sob fluxo de gás N₂ a 45°C. Após derivatização com 200 μL de *o*-ftaldialdeído (OPA) (40 mg de OPA, 1 mL de metanol, 5 mL de tetraborato de sódio a 0,1M e 50 μL de 2-mercaptoetanol), as injeções foram realizadas dentro de 1 minuto em cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE (sistema isocrático de fase reversa) consistindo de uma bomba Shimadzu LC-10 AD, detector de fluorescência RF-10A XL e, coluna C18 Nucleosil 100-5 (4,6 x 250 mm, Macherey-Nagel GmbH & Co.). Os comprimentos de onda de excitação e

emissão foram de 335 nm e 450 nm, respectivamente. A fase móvel consistiu de CH₃OH: NaH₂PO₄ 0,1 mol.L⁻¹ (80:20, v/v) ajustado para pH 3,3 com ácido orto-fosfórico. O fluxo foi de 1 mL.min⁻¹ e temperatura de forno constante a 25 °C. Os limites de detecção foram de 27,5 ng.g⁻¹ para FB₁ e de 35,3 ng.g⁻¹ para FB₂.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela 1 estão apresentadas as frequências absoluta e relativa dos principais gêneros fúngicos (*Fusarium*, *Penicillium* e *Aspergillus*) em 72 amostras de milho recém-colhido da Região Norte do Paraná das safras 2005/2006 (n=60) e safra de 2006/2007 (n=12). Na safra de 2005/2006, *Penicillium* spp. foi o gênero prevalente, sendo detectado em 98,3% das amostras, seguido de *Fusarium* spp. (90%) e *Aspergillus* spp. (18%), enquanto que na safra de 2006/2007 *Fusarium* spp. foi detectado em 100% das amostras, seguido dos gêneros *Penicillium* spp. (83,3%) e *Aspergillus* spp. (16,7%).

Esses gêneros fúngicos (*Fusarium*, *Penicillium* e *Aspergillus*) são frequentemente encontrados em alimentos a base de milho e principalmente em ração animal^(30;31;32;33). A positividade das amostras para *Fusarium* spp., 90% (safra 2005/2006) e 100% (safra 2006/2007), é um fator preocupante uma vez que a infecção da planta por fungos deste gênero pode acarretar a decomposição do caule, da espiga e dos grãos, e pela facilidade de dispersão do fungo, que pode ser através do vento, da chuva e de insetos, sendo os últimos os principais responsáveis pelas infecções entre culturas de anos diferentes⁽³⁴⁾.

A baixa frequência de *Aspergillus* spp. nas amostras de ambas as safras pode ser explicada pela alta frequência de *Fusarium* spp. que apresenta relação endofítica com o milho, reduzindo a infecção por *Aspergillus flavus* e a produção de aflatoxinas⁽¹⁰⁾.

Tabela 1 – Frequência absoluta e relativa dos principais gêneros fúngicos de amostras de milho recém-colhido da Região Norte do Estado do Paraná

Gêneros fúngicos	Safras			
	2005/2006 (n = 60)		2006/2007 (n = 12)	
	FA	FR	FA	FR
<i>Fusarium</i> spp.	54	90	12	100
<i>Penicillium</i> spp.	59	98,3	10	83,3
<i>Aspergillus</i> spp.	11	18,3	02	16,7

FA = Frequência absoluta

FR = Frequência relativa (%)

A contagem de bolores e leveduras no ápice (A), meio (M) e base (B) das espigas de milho, nos diferentes sistemas de plantio e sucessão de culturas das safras 2005/2006 e 2006/2007 estão apresentadas nas tabelas 2 e 3, respectivamente. Na safra 2005/2006 (Tabela 2), as médias de contaminação variaram de 10² a 10⁵ UFC.g⁻¹, com maior ocorrência do gênero *Penicillium* spp. A maior média de contaminação por *Fusarium* spp. (1,2 × 10⁵ UFC.g⁻¹) foi detectada na base da espiga sob plantio convencional com aveia no inverno (CA-B), variando de 1,0 × 10² a 5,0 × 10⁵ UFC.g⁻¹. A maior média de

contaminação por *Penicillium* spp. ($5,2 \times 10^5$ UFC.g⁻¹) foi detectada no ápice da espiga sob plantio direto com aveia no inverno (DA-A).

Por outro lado, na safra de 2006/2007 (Tabela 3), houve predominância de *Fusarium* spp. com maior média de contaminação ($1,4 \times 10^6$ UFC.g⁻¹) no meio da espiga sob sistema de plantio direto com pousio no inverno (DP-M). As maiores médias de *Penicillium* spp. ($1,6 \times 10^5$ UFC.g⁻¹) e *Aspergillus* spp. ($1,0 \times 10^3$ UFC.g⁻¹) foram detectadas na base da espiga sob sistema de plantio convencional com aveia no inverno (CA-B).

Considerando os resultados da contagem de bolores e leveduras em três partes distintas da espiga de milho - ápice (A), meio (M) e base (B), das safras 2005/2006 e 2006/2007 (Tabelas 2 e 3), pode-se concluir que na safra de 2005/2006 os maiores níveis de contaminação fúngica ocorreram nos plantios diretos e com as maiores médias de contaminação variando entre o ápice e a base das espigas, no entanto, na safra de 2006/2007 a contaminação apresentou variações entre os plantios, apresentando níveis de contaminação entre meio e base das espigas.

Kikuti et al. (2003)⁽⁷⁾, em trabalho similar avaliando o desempenho de sementes de milho envelhecidas e não envelhecidas (cultivares AL 25 e BRS 106) em relação a sua localização na espiga, detectaram a maior contaminação por fungos de campo e de armazenamento (*Fusarium graminearum* e *Penicillium* spp.) nas sementes não envelhecidas do ápice e da base das espigas, em ambos os cultivares. *Penicillium* spp. foi detectado em 100% das amostras, independentemente da posição das sementes na espiga e dos cultivares. *Fusarium graminearum* apresentou a maior incidência na base e no ápice da espiga com 46% (cultivar BRS 106) e 55% (cultivar AL 25), respectivamente. De acordo com os autores, as sementes do ápice da espiga estão mais sujeitas às intempéries, tais como temperatura, exposição a patógenos e maior umidade, que contribuem para maior deterioração e as sementes da base da espiga estão mais susceptíveis à colonização por fungos devido ao acúmulo de água nesta região em razão da posição de inserção da espiga na planta, reduzindo com isso a qualidade das sementes.

Nazareno em 1981⁽³⁵⁾, na Região Sul do Paraná (Safra 1979/1980), demonstrou que o sistema de plantio empregado também pode influenciar na contaminação de patógenos e consequentemente no aparecimento de doenças, como a podridão do colmo causada por *Fusarium* spp. De acordo com seus resultados, 51,3% da cultura sob sistema de plantio direto e 35,6% sob sistema de plantio convencional apresentou infecção por *Fusarium* spp. Em estudo subsequente (Safra 1980/1981) realizado em Londrina, Região Norte do Paraná demonstrou que as condições para o desenvolvimento da doença foram menos favoráveis, independentemente do sistema de cultivo empregado, quando se adotou a rotação de culturas tri-anual com algodão e soja⁽³⁵⁾.

Os níveis de fumonisinas totais (FB₁ + FB₂) detectados nas diferentes partes da espiga (A = ápice, M = meio, B = base) das amostras submetidas aos diferentes sistemas de plantio (DA = direto com aveia no inverno, DP = direto com pousio no inverno, CA = convencional com aveia no inverno, CP = convencional com pousio no inverno) estão apresentados nas figuras 1 e 2 e na tabela 4, (safras 2005/2006 e 2006/2007). Na safra 2005/2006 (Figura 1, Tabela 4) as amostras do meio da espiga nos sistemas de plantio com aveia no inverno apresentaram os menores níveis de contaminação por fumonisinas com 15% ($3,18 \mu\text{g.g}^{-1}$) para o sistema de plantio DA e 10% ($0,96 \mu\text{g.g}^{-1}$) para o sistema de plantio CA. Na safra 2005/2006 os maiores níveis de fumonisinas foram detectados na base

da espiga, independentemente do sistema de plantio e da sucessão de cultura empregada (aveia e pousio) com médias variando de 5,02 $\mu\text{g.g}^{-1}$ a 11,98 $\mu\text{g.g}^{-1}$ e porcentagens variando de 51% a 76%, respectivamente.

Tabela 2 – Contagem total de bolores e leveduras, *Fusarium* spp., *Penicillium* spp e *Aspergillus* spp. em amostras de milho submetidas a diferentes sistemas de plantio e sucessão de culturas em três partes da espiga de milho: ápice, meio e base (safra 2005/2006) na Região Norte do Paraná.

Sistema de plantio e cultivo	<i>Fusarium</i> spp. (UFC. g^{-1})		<i>Penicillium</i> spp. (UFC. g^{-1})		<i>Aspergillus</i> spp. (UFC. g^{-1})		Contagem total de Bolores e Leveduras (UFC. g^{-1})	
	Variação	Média	Variação	Média	Variação	Média	Variação	Média
DA – A	$1,0 \times 10^2 - 1,0 \times 10^3$	$2,3 \times 10^4$	$1,0 \times 10^3 - 2,5 \times 10^6$	$5,2 \times 10^3$	-	$1,0 \times 10^3$	$5,1 \times 10^3 - 2,7 \times 10^6$	$5,6 \times 10^5$
DA – M	$5,0 \times 10^2 - 1,0 \times 10^4$	$3,8 \times 10^3$	$2,0 \times 10^3 - 2,7 \times 10^5$	$7,3 \times 10^4$	-	$3,5 \times 10^2$	$2,9 \times 10^3 - 2,9 \times 10^5$	$8,3 \times 10^4$
DA – B	$3,0 \times 10^4 - 1,0 \times 10^5$	$5,6 \times 10^4$	$1,0 \times 10^4 - 1,4 \times 10^6$	$3,1 \times 10^5$	-	$1,0 \times 10^4$	$8,1 \times 10^4 - 1,6 \times 10^6$	$4,4 \times 10^5$
DP – A	$1,0 \times 10^5 - 3,0 \times 10^3$	$1,2 \times 10^3$	$1,8 \times 10^3 - 3,9 \times 10^4$	$2,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^2 - 1,0 \times 10^4$	$5,1 \times 10^3$	$2,2 \times 10^3 - 5,1 \times 10^4$	$2,8 \times 10^4$
DP – M	$1,0 \times 10^2 - 4,0 \times 10^3$	$2,5 \times 10^3$	$5,0 \times 10^3 - 1,3 \times 10^5$	$4,2 \times 10^4$	-	$1,0 \times 10^4$	$7,3 \times 10^3 - 1,3 \times 10^5$	$5,0 \times 10^4$
DP – B	$1,0 \times 10^3 - 4,0 \times 10^4$	$1,7 \times 10^4$	$1,0 \times 10^4 - 1,1 \times 10^5$	$6,6 \times 10^4$	$1,0 \times 10^2 - 2,0 \times 10^4$	$7,0 \times 10^3$	$3,2 \times 10^4 - 2,2 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$
CA – A	$4,0 \times 10^2 - 1,0 \times 10^4$	$3,1 \times 10^3$	$2,0 \times 10^3 - 1,0 \times 10^5$	$4,1 \times 10^4$	ND	ND	$5,0 \times 10^3 - 1,0 \times 10^5$	$5,0 \times 10^4$
CA – M	$1,0 \times 10^2 - 2,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^4$	$6,5 \times 10^3 - 1,4 \times 10^5$	$4,9 \times 10^4$	-	$9,5 \times 10^2$	$8,1 \times 10^3 - 1,8 \times 10^5$	$7,0 \times 10^4$
CA – B	$1,0 \times 10^2 - 5,0 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$	$7,0 \times 10^2 - 8,5 \times 10^5$	$2,0 \times 10^4$	ND	ND	$8,0 \times 10^2 - 1,4 \times 10^6$	$3,2 \times 10^5$
CP – A	$1,0 \times 10^2 - 2,0 \times 10^5$	$4,0 \times 10^4$	$3,5 \times 10^3 - 3,0 \times 10^4$	$1,5 \times 10^4$	ND	ND	$4,3 \times 10^3 - 2,3 \times 10^5$	$5,9 \times 10^4$
CP – M	$1,0 \times 10^2 - 1,0 \times 10^4$	$3,7 \times 10^3$	$6,5 \times 10^2 - 4,0 \times 10^4$	$1,1 \times 10^4$	ND	ND	$1,1 \times 10^3 - 4,6 \times 10^4$	$1,8 \times 10^4$
CP – B	$2,0 \times 10^4 - 6,0 \times 10^4$	$3,0 \times 10^4$	$8,0 \times 10^2 - 6,0 \times 10^4$	$2,4 \times 10^4$	-	$1,0 \times 10^4$	$1,2 \times 10^3 - 1,6 \times 10^5$	$6,7 \times 10^4$

DA = direto com aveia no inverno; DP = direto com pousio no inverno; CA = convencional com aveia no inverno; CP = convencional com pousio no inverno; A = ápice da espiga; M = meio da espiga; B = base da espiga; ND = não detectado.

Tabela 3 – Contagem total de bolores e leveduras, *Fusarium* spp., *Penicillium* spp e *Aspergillus* spp. em amostras de milho submetidas a diferentes sistemas de plantio e sucessão de culturas em três partes da espiga de milho: ápice, meio e base (safra 2006/2007) na Região Norte do Paraná.

Sistema de plantio e cultivo	<i>Fusarium</i> spp. (UFC. g^{-1})		<i>Penicillium</i> spp. (UFC. g^{-1})		<i>Aspergillus</i> spp. (UFC. g^{-1})		Contagem total de Bolores e Leveduras (UFC. g^{-1})	
	Variação	Média	Variação	Média	Variação	Média	Variação	Média
DA – A	$2,7 \times 10^5 - 7,5 \times 10^5$	$5,1 \times 10^5$	$2,5 \times 10^4 - 1,5 \times 10^5$	$8,8 \times 10^4$	ND	ND	-	$1,0 \times 10^6$
DA – M	$8,0 \times 10^4 - 2,0 \times 10^5$	$1,4 \times 10^5$	$4,5 \times 10^3 - 4,0 \times 10^4$	$2,2 \times 10^4$	ND	ND	-	$6,4 \times 10^5$
DA – B	$2,8 \times 10^5 - 4,0 \times 10^5$	$3,4 \times 10^5$	$6,5 \times 10^3 - 3,5 \times 10^4$	$2,1 \times 10^4$	-	$1,5 \times 10^2$	-	$8,4 \times 10^5$
DP – A	-	$6,0 \times 10^4$	$8,0 \times 10^3 - 6,0 \times 10^4$	$3,4 \times 10^4$	ND	ND	-	$1,5 \times 10^5$
DP – M	-	$1,4 \times 10^6$	-	$1,0 \times 10^5$	ND	ND	-	$1,5 \times 10^6$
DP – B	$5,2 \times 10^4 - 1,0 \times 10^5$	$7,6 \times 10^4$	$4,5 \times 10^3 - 1,0 \times 10^4$	$7,3 \times 10^3$	ND	ND	-	$1,2 \times 10^5$
CA – A	-	$6,5 \times 10^4$	-	$8,5 \times 10^4$	ND	ND	-	$2,6 \times 10^5$
CA – M	-	$1,2 \times 10^5$	-	ND	ND	ND	-	$1,2 \times 10^5$
CA – B	$2,7 \times 10^4 - 5,0 \times 10^5$	$2,5 \times 10^5$	$1,0 \times 10^4 - 3,0 \times 10^5$	$1,6 \times 10^5$	-	$1,0 \times 10^3$	-	$1,0 \times 10^6$
CP – A	$2,0 \times 10^5 - 2,3 \times 10^5$	$2,1 \times 10^5$	-	$1,0 \times 10^5$	ND	ND	-	$4,5 \times 10^5$
CP – M	$3,9 \times 10^4 - 5,0 \times 10^4$	$2,7 \times 10^5$	-	ND	ND	ND	-	$5,1 \times 10^4$
CP – B	$1,3 \times 10^5 - 1,0 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$	-	$3,0 \times 10^4$	ND	ND	-	$2,3 \times 10^5$

DA = direto com aveia no inverno; DP = direto com pousio no inverno; CA = convencional com aveia no inverno; CP = convencional com pousio no inverno; A = ápice da espiga; M = meio da espiga; B = base da espiga; ND = não detectado.

Na safra de 2006/2007 (Figura 2, Tabela 4) os menores níveis de fumonisinas foram detectados no ápice da espiga no sistema de plantio com aveia, com valores de 20% ($3,70 \mu\text{g.g}^{-1}$) e 15% ($0,99 \mu\text{g.g}^{-1}$) nos sistemas de plantio DA e CA, respectivamente. Por outro lado, os maiores níveis de fumonisinas foram detectados na base da espiga no sistema de plantio com sucessão a aveia, representando 41% ($7,75 \mu\text{g.g}^{-1}$) para o plantio DA e 54%

(3,41 $\mu\text{g.g}^{-1}$) para o plantio CA. No sistema de plantio com sucessão a pousio, as maiores contaminações ocorreram no ápice da espiga com valores de 47% (3,85 $\mu\text{g.g}^{-1}$) e 54% (3,60 $\mu\text{g.g}^{-1}$) para DP e CP, respectivamente.

O grau de empalhamento das amostras das safras 2005/2006 e 2006/2007 está apresentado na Tabela 5. Na safra de 2005/2006 o grau de empalhamento situou-se no grau 2, o que corresponde a um nível ótimo que não expõe os grãos, com ponta firmemente coberta e não se estendendo além da mesma. No entanto, na safra 2006/2007, o grau de empalhamento no plantio DA e DP foram melhores (valor 1), considerado excelente, com a palha cobrindo todo ápice e estendendo além do mesmo.

Os níveis de fumonisinas totais ($\text{FB}_1 + \text{FB}_2$) detectados nas diferentes partes da espiga (Figuras 1 e 2, Tabela 4) variaram entre as safras. Na safra 2005/2006 (Figura 1, Tabela 4) os maiores níveis de contaminação ocorreram na base da espiga (5,02 a 11,98 $\mu\text{g.g}^{-1}$), independentemente do sistema de plantio e da sucessão de cultura empregada, enquanto que na safra 2006/2007 (Figura 2, Tabela 4) os maiores níveis de fumonisinas foram detectados na base da espiga nos sistemas de plantio com sucessão a aveia e no ápice nos sistemas de plantio com sucessão a pousio. A contaminação por *Fusarium* spp. e fumonisinas poderia estar relacionada ao grau de empalhamento, uma vez que a resistência ao ataque de pragas está diretamente ligada ao bom empalhamento das espigas o qual é determinado pela herança genética, influências ambientais, principalmente as relacionadas com a nutrição e o desequilíbrio em relação à disponibilidade hídrica na cultura ⁽³⁶⁾. Segundo Warfield e Davis (1996) ⁽³⁷⁾ o empalhamento é um fator importante para reduzir a incidência de fungos, impedindo a penetração de umidade. Porém, neste estudo, em ambas as safras, as amostras apresentaram bom empalhamento, situando entre os graus 1 e 2 (Tabela 5), portanto conclui-se que este fator não foi determinante para a contaminação por fumonisinas.

Outra possível explicação que deve ser levada em consideração é a influência do sistema de sucessão de cultura empregado, pois os restos de culturas na superfície do solo influenciam na temperatura afetando os processos físicos, químicos e biológicos, entre eles a propagação de micro-organismos do solo, os quais se desenvolvem melhor em uma faixa de temperatura entre 10 e 40°C, com índice ótimo em torno de 35°C nos solos tropicais ⁽³⁸⁾. Outros fatores importantes são a susceptibilidade planta-patógeno em relação à incidência de fungos toxigênicos e a variação na capacidade de produção de fumonisinas pelas diferentes cepas de *Fusarium* spp.

Em trabalho similar, Schiabel (2004) ⁽³⁹⁾ analisando 72 amostras de milho (safras 2000/2001, 2001/2002 e 2002/2003) sob sistema de plantio direto e convencional, com sucessão a aveia e pousio, detectaram fumonisinas em 97,2% das amostras (n=70). As amostras submetidas ao sistema de plantio DP no inverno apresentaram a maior média de contaminação (7,6 $\mu\text{g.g}^{-1}$), enquanto aquelas submetidas ao sistema de plantio CP no inverno apresentaram a menor média (2,6 $\mu\text{g.g}^{-1}$).

A frequência de fumonisinas principalmente FB_1 em grãos de milho é comum em muitas partes do mundo ⁽⁴⁰⁾. No Brasil a FB_1 ocorre onde as condições climáticas são secas ^(41;42;43;44;45). Ono et al. (1999) ⁽⁴¹⁾ analisaram amostras de milho em três regiões do Estado do Paraná, encontrando níveis de 0,07 a 14,36 $\mu\text{g.g}^{-1}$ para FB_1 e de 0,08 a 6,92 $\mu\text{g.g}^{-1}$ para FB_2 . Bittencourt et al. (2005) ⁽⁴²⁾ analisando 60 amostras de milho obtidos do Estado de São Paulo detectaram níveis que variaram de 1,1 a 15,3 $\mu\text{g.g}^{-1}$ para FB_1 e 0,2 a 3,9 $\mu\text{g.g}^{-1}$ para FB_2 , com positividade para FB_1 de 83% (n=50) e para FB_2 72% (n=43). Sydenham et al.

(1993) ⁽⁴³⁾ avaliando 17 amostras de milho argentino detectaram níveis de fumonisinas totais que variaram de 1,59 a 9,99 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, com média de 6,70 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ para FB_1 , de 2,68 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ para FB_2 e de 0,86 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ para FB_3 . Julian et al. (1995) ⁽⁴⁴⁾ avaliaram 130 amostras de milho de Honduras, detectando níveis médios de fumonisinas que variaram de 0,07 a 6,55 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Em Costa Rica, Viquez et al. (1996) ⁽⁴⁵⁾ analisaram 127 amostras de milho de três regiões geográficas (Huetar Norte, Huetar Atlantica e Brunca), detectando níveis de fumonisina B_1 em 89% das amostras, com nível médio entre as três regiões de 2,63 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$.

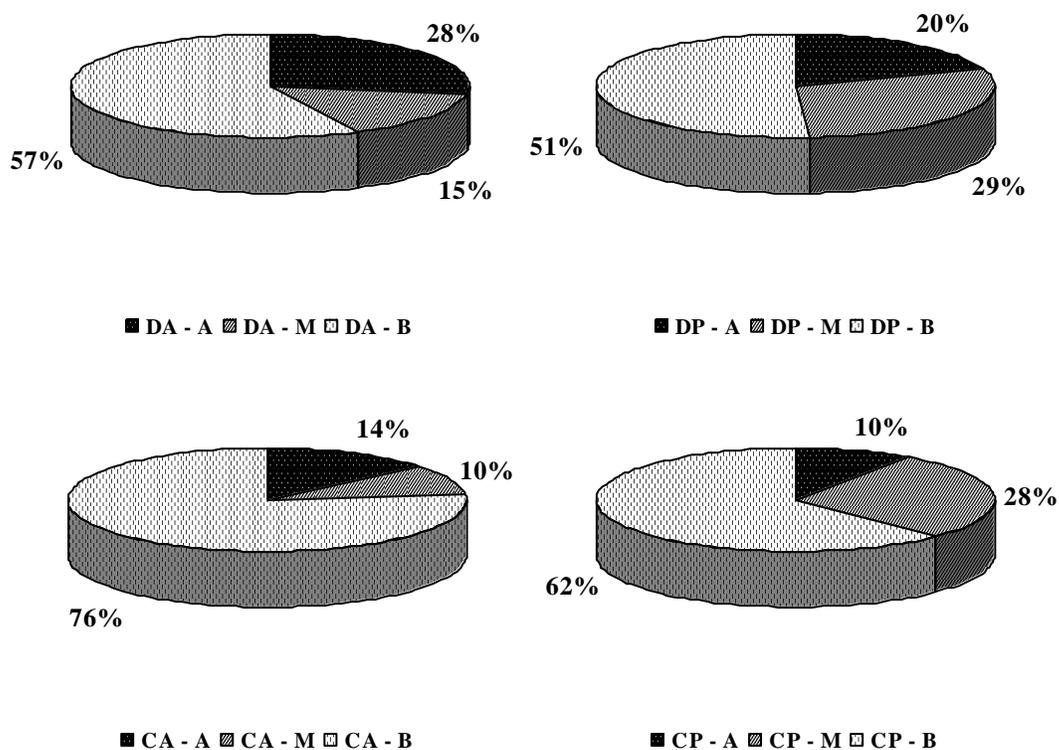


Figura 1 - Porcentagem de contaminação por fumonisinas em diferentes partes da espiga de milho (safra 2005/2006 - Híbrido AGROESTE) sob plantio direto e convencional com sucessão em aveia e pousio. DA = direto com aveia no inverno; DP = direto com pousio no inverno; CA = convencional com aveia no inverno; CP = convencional com pousio no inverno; A = ápice da espiga; M = meio da espiga; B = base da espiga.

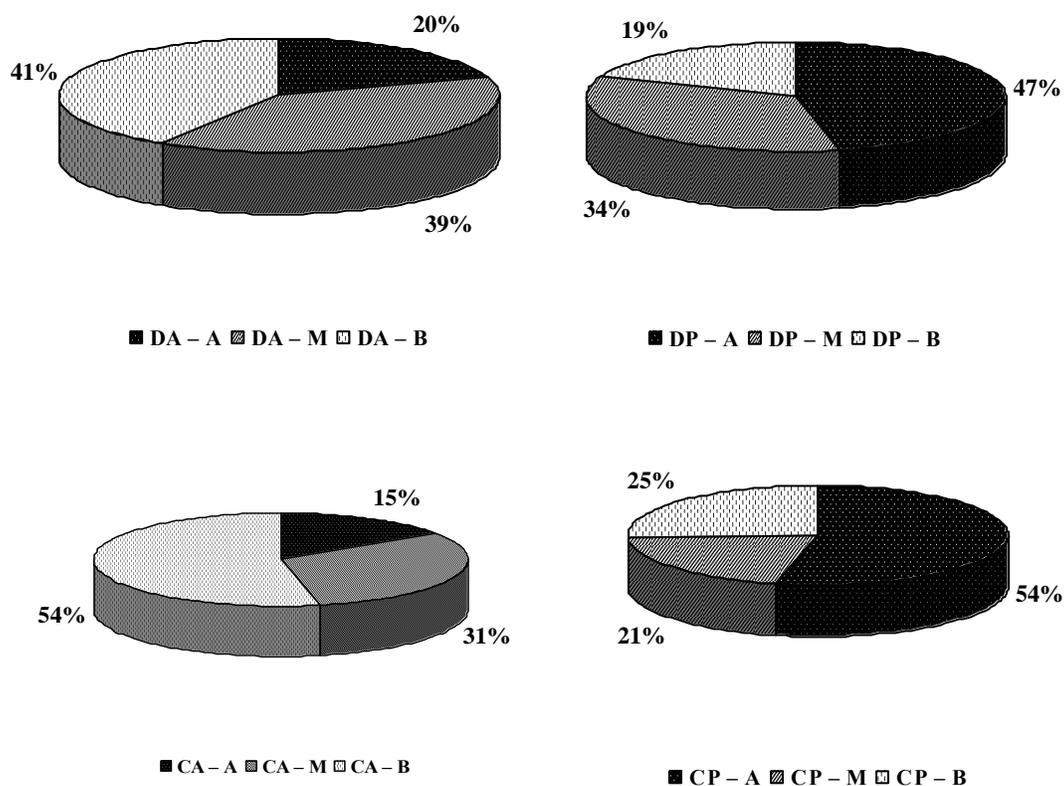


Figura 2 - Porcentagem de contaminação por fumonisinas em diferentes partes da espiga de milho (safra 2006/2007 - Híbrido AGROESTE) sob plantio direto e convencional com sucessão a aveia e pousio. DA = direto com aveia no inverno; DP = direto com pousio no inverno; CA = convencional com aveia no inverno; CP = convencional com pousio no inverno; A = ápice da espiga; M = meio da espiga; B = base da espiga.

Tabela 4 – Níveis de fumonisinas nas partes da espiga de milho sob diferentes sistemas de plantio e sucessão de culturas

Sistema de plantio e cultivo	Safras					
	2005/2006			2006/2007		
	FB Total* ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)			FB Total ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)		
	Partes da espiga			Partes da espiga		
	A	M	B	A	M	B
DA	5,75	3,18	11,98	3,70	7,42	7,75
DP	1,92	2,89	5,02	3,85	2,81	1,57
CA	1,39	0,96	7,73	0,99	2,01	3,41
CP	0,87	2,46	5,57	3,60	1,41	1,71

*FB total = $\text{FB}_1 + \text{FB}_2$ (limite de detecção: $\text{FB}_1 = 27,5 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$; $\text{FB}_2 = 35,3 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$); A = Ápice da espiga de milho; M = Meio da espiga de milho; B = base da espiga de milho; DA = Direta com Aveia no inverno; DP = Direta com Pousio no inverno; CA = Convencional com Aveia no inverno; CP = Convencional com Pousio no inverno.

Tabela 5 – Empalhamento das espigas de milho em diferentes sistemas de plantio (Safras 2005/2006 e 2006/2007)

Sistema de plantio e cultivo	Safras	
	2005/2006	2006/2007
DA	2,0	1,0
DP	2,0	1,0
CA	2,4	2,0
CP	2,2	2,0

DA = direto com aveia no inverno; DP = direto com pousio no inverno; CA = convencional com aveia no inverno; CP = convencional com pousio no inverno.

Em suma, os resultados indicam que os sistemas de plantio com sucessão a aveia no inverno favorecem a sobrevivência de *Fusarium* spp. em milho, com exceção do sistema de plantio convencional com pousio no inverno da safra de 2006/2007 o qual também apresentou altos níveis de contaminação por *Fusarium* spp. Em relação à contaminação por fumonisinas, a safra de 2005/2006 apresentou os maiores níveis na base da espiga independentemente do sistema de plantio e sucessão de cultura. Por outro lado, na safra de 2006/2007 apenas os plantios com sucessão a aveia no inverno apresentaram os maiores níveis de contaminação na base da espiga de milho e os plantios com sucessão a pousio apresentaram os maiores níveis de contaminação no ápice da espiga de milho. Portanto, torna-se essencial buscar alternativas para melhorar a produtividade e qualidade de milho e seus derivados, por meio do emprego de práticas culturais adequadas, a fim de minimizar os riscos à saúde e atender as exigências dos mercados internos e externos.

Agradecimentos

Os autores agradecem a CAPES, CNPq/MAPA, PPSUS/Ministério da Saúde, Fundo Paraná/SETI e Fundação Araucária pelo apoio financeiro e ao CNPq pela concessão de bolsa de apoio técnico e de mestrado a Elaine Cunha Moreno.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Duarte JO. 2000. Embrapa Milho e Sorgo – Sistema de Produção 1 – Cultivo do Milho – Importância Econômica. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Milho/CultivodoMilho/importancia.htm>. Acesso em: 12 jan. 2009.

2. USDA - United States Department of Agriculture. Foreign Agricultural Service – Table 04 Corn Area, Yield and Production. Disponível em: <http://www.fas.usda.gov/psdonline/psdreport.aspx?hidReportRetrievalName=BVS&hidReportRetrievalID=884&hidReportRetrievalTemplateID=1>. Acesso em: 12/01/2009.
3. CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos 2008/2009 – Quarto Levantamento – Jan/2009. Disponível em: http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/3graos_08.09.pdf. Acesso em: 12 jan. 2009.
4. Shurtleff MC. A compendium of corn disease. St^a. Paul, Minnessota. American Phytopathological Society, 1992.
5. Reid LM, Bolton AT, Hamilton RI, Mather DE. Screening Maize for Resistance to Gibberella Ear Rot Agriculture and Agri-food Canada. Technical Bulletin Publications 196-5E, 1996.
6. Christensen CM, Kaufmann HH. Microflora Storage of Cereal Grains and their Products, edited by CM Christensen: American Association of Cereal Chemists, St Paul, pp.158-192, 1974.
7. Kikuti ALP, Vasconcelos RC, Marincek A, Fonseca AH. Desempenho de Sementes de Milho em Relação à sua Localização na Espiga. Ciência e Agrotecnologia, Lavras, 27: 765-770, 2003.
8. Rheeder JP, Marasas WFO, Vismer, HF. Production of Fumonisin Analogs by *Fusarium* species. Applied and Environmental Microbiology, 68: 2101-2105, 2002.
9. Tanaka MAS. Sobrevivência de *Fusarium moniliforme* em Sementes de Milho Mantidas em Duas Condições de Armazenamento. Fitopatologia Brasileira, 26: 60-64, 2001.
10. Munkvold GP, Desjardins AE. Fumonisin en Maize Can We Redce Theuir Occurrence? Plant Disease, 81: 556-565, 1997.
11. Westhuizen LVD, Shephard GS, Scussel LLFC, Vismer HF, Rheeder JP, Marasas WFO. Fumonisin Contamination and *Fusarium* Incidence in Corn from Santa Catarina, Brazil. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51: 5574-5578, 2003.
12. Gamanya R, Sibanda L. Survery of *Fusarium moniliforme* (*F. verticillioides*) and production of fumonisin B₁ in cereal grains and oilseed in Zimbabwe. International Journal of Food Microbiology, 71: 145-149, 2001.
13. Murphy PA, Rice LG, Ross PF. Fumonisin B₁, B₂ and B₃ content of Iiowa, Wisconsin, and Illinois corn and corn screenings. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 41: 263-266, 1993.

14. Ross PF, Nelson PE, Richard JL, Osweiler GD, Rice LG, Plattner RD, Wilson TM. Production of fumonisins by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* isolates associated with equine leukoencephalomalacia and a pulmonary edema syndrome in swine. *Applied and Environmental Microbiology*, 56: 3225-3226, 1990.
15. Rheeder JP, Marasas WFO, Thiel PG, Sydenham EW, Shephard GG, Schalkwyk DJV. *Fusarium moniliforme* and fumonisinas in corn in relation to human esophageal cancer in Transkei. *Phytopathology*, 82: 353-357, 1992.
16. Zambolin L, Ventura JA. Resistência estável a doenças de plantas. In:LUZ, W.C.; FERNANDES, J.M.C.; PRESTES, A.M.; PICININI, E.C. (Ed.). Revisão Anual de Patologia de Plantas. Passo Fundo, Editora Pe. Berthier, 1: 239-273, 1993.
17. SCHULTZ, L.A. Sistema de preparo do solo. In:_____. **Manual do plantio direto: técnicas e perspectivas**. Porto Alegre:Agropecuária, 1978. p.15-19.
18. Bianco R. Ocorrência de pragas no plantio direto × convencional. 1985. In: Fancelli, A.L.; Torrado PV, Machado J. Atualização em plantio direto. Campinas: Fundação Cargill, pp. 183-194, 1985.
19. Muzilli O. O plantio direto no Brasil. In: Fancelli AL, Torrado PV, Machado J. Atualização em plantio direto. Campinas: Fundação Cargill, pp. 03-16, 1985.
20. Balota EL, Andrade DS, Colozzi-Filho A. Avaliações microbiológicas em sistemas de preparo do solo e sucessão de culturas. In: Congresso brasileiro de plantio direto par a agricultura sustentável, n.01, 1996, Ponta Grossa. Anais... Ponta Grossa: Editado por Ricardo Trippia dos Guimarães Peixoto e Celso de Castro filho, pp. 9-11, 1996.
21. City Brazil. Números Gerais Paraná. Web site oficial: www.pr.gov.br. Disponível em: <http://www.citybrazil.com.br/pr/londrina/index.php>. Acesso em: 10 fev. 2009.
22. Banco de dados climáticos do Brasil. Embrapa monitoramento por satélite. Disponível em: <http://www.bdclima.cnpm.embrapa.br/resultados/balanco.php?UF=pr&COD=177> Acesso em: 10 fev. 2009.
23. Paraná Cidade [on line]. . [citado em 10 de fev. 2009]. Disponível em: <http://celepar6.pr.gov.br/municípios/dadosger.asp?codigo=0286600>
24. Cymmyt. Managing trials and reporting data for CYMMYT'S. International Maize Testing Program. México. Cymmyt. 1985.
25. Nelson PE, Tousson TA, Marasas, WFO. *Fusarium* species – An illustrated manual for identification. Pennsylvania: Pennsylvania State University Press, 1983.
26. Singh K, Frisvad JC, Thrane U, Mathur SB. An illustrated manual on identification of some seed-borne *Aspergilli*, *Fusaria*, *Penicillia* and their mycotoxins. Hellerup/Denmark/: Danish Government, 1991.

27. Samson RA, Hoeskstra ES, Frisvad JC, Filtenborg O. Introduction to food-borne fungi. 4.ed. The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 1995.
28. Shephard GS, Sydenham EW, Thiel PG, Gelderblom WCA. Quantitative determination of fumonisins B₁ and B₂ by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Liquid Chromatography*, 13: 2077-2087, 1990.
29. Ueno Y, Aoyama S, Sugiura Y, Wang DS, Lee US, Hirooka EY, Hara S, Karki T, Chen G, Yu SZ. A limited survey of fumonisins in corn and corn-based products in Asian countries. *Mycotoxin Research*, 9: 27-34, 1993.
30. Hasegawa RH, Fonseca H, Fancelli AL, Silva VNS, Schammas EA, Reis TA, Corrêa B. Influence of macro- and micronutrient fertilization on fungal contamination and fumonisin production in corn grains. *Food Control*, 19: 36-43, 2008.
31. Rosa CAR, Keller KM, Keller LAM, González-Pereyra ML, Pereyra CM, Dalcero AM, Cavaglieri LR, Lopes CWG. Mycological survey and ochratoxin A natural contamination of swine feedstuffs in Rio de Janeiro State, Brazil. *Toxicon* 53: 283–288, 2009.
32. Meireles MCA, Corrêa B, Fischman O, Gambale W, Paula CR, Chacon-Reche NO, Pozzi CR. Mycoflora of the toxic feeds associated with equine leukoencephalomalacia (ELEM) outbreaks in Brazil. *Mycopathologia* 127: 183-188, 1994.
33. Westhuizen LVD, Gordon S, Shephard GS, Scussel, VM, Costa LLF, Vismer HF, Rheeder JP, Marasas WFO. Fumonisin Contamination and Fusarium Incidence in Corn from Santa Catarina, Brazil. *Journal Agricultural Food Chemistry*.51: 5574-5578, 2003.
34. Nelson PE. Taxonomy and biology of *Fusarium moniliforme*. *Mycopathologia*, 117: 29-36, 1991.
35. Nazareno NRX. Ocorrência e Controle de Doenças. Cultura do Milho. In: Instituto Agrônomo do Paraná. Plantio direto no Estado do Paraná. Londrina: IAPAR, Circular n.23, pp. 171-192, 1981.
36. Zago NJ. Caracterização sócio-cultural de agricultores e avaliação de suas populações locais de milho “crioulo” no alto vale do Itajaí. 2002. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
37. Warfield CY, Davis RM. Importance of the husk covering on the susceptibility of corn hybrids to *Fusarium* ear rot. *Plant Disease*, 80: 208-210, 1996.
38. Henklain JC. Efeito do preparo sobre as características do solo. In: Peixoto RTG, Ahrens DC, Samaha M J. Plantio direto o caminho para uma agricultura sustentável. Ponta Grossa: IAPAR, pp.206-221, 1997.

39. Schiabel VC. Genética e toxicidade de *Fusarium verticillioides* em grãos de milho (*Zea mays* L.) sob plantio direto e convencional. 2004. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.
40. FAO/IAEA – Manual on the application of the HACCP system in Mycotoxin prevention and control. FAO - Food and Agricultural Organization of United Nations. FAO Food and Nutrition. n.73, Rome, 2001.
41. Ono EYS, Sugiura Y, Homechin M, Kamogae M, Vizoni E, Ueno Y, Hirooka EY. Effect of climatic conditions on natural mycoflora and fumonisins in freshly harvested corn of the State of Paraná, Brazil. *Mycopathologia*, 147: 139-148, 1999.
42. Bittencourt ABF, Corrêa B, Oliveira CAF, Dilkin P. Mycotoxin occurrence in corn meal and flour traded in São Paulo, Brazil. *Food Control*, 6: 117-120, 2005.
43. Sydenham EW, Shephard GS, Thiel PG, Marasas WFO, Rheeder JP, Peralta CE, Gonzalez HL, Resnik SL. Fumonisin in Argentinian field trial corn. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 41: 891-895, 1993.
44. Julian AM, Wareing PW, Phillips SL, Medlock VF, Macdonald MV, Del Rio LE. Fungal contamination and selected mycotoxins in pre and postharvest maize in Honduras. *Mycopathologia*, 129: 5-16, 1995.
45. Viquez OM, Castell-Perez ME, Shelby RA. Occurrence of fumonisin B₁ in maize grown in Costa Rica. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 44: 2789-2791, 1996.