

Efeitos da fertilização nitrogenada na contaminação de milho por fungos e fumonisinas

Effects of nitrogen fertilization in corn contamination by fungi and fumonisins

Tatiana Ávila Miguel¹, Hideaki Wilson Takahashi², Luciana Pereira Bernd³, Thiago Montagner³, Jaqueline Gozzi Bordini¹, Aline Myuki Omori⁴, 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 Ciência 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@hotmail.com

Resumo

A ocorrência natural de fungos toxigênicos e fumonisinas (B₁ e B₂) foi avaliada em amostras de milho recém-colhido da Região Norte do Paraná, tratado com diferentes tipos (ureia e ureia + inibidor de urease NBPT – N-(n-butil) triamida tiosfosfórica) e doses (80, 160 e 240 Kg/ha) de fertilizante nitrogenado. Os gêneros fúngicos mais frequentes foram *Fusarium* e *Penicillium* (83,33% e 98,61%, respectivamente), sendo o gênero *Aspergillus* detectado em baixa frequência (4,17%). As frequências de *Penicillium* spp., *Fusarium* spp. e *Aspergillus* spp. não parecem ter relação com a dose e/ou com o tipo de fertilizante nitrogenado utilizado. As fumonisinas foram detectadas em 100% das amostras analisadas, sendo que altas concentrações de fumonisinas (19,49 µg/g) foram detectadas no tratamento ao qual não foi aplicado fertilizante nitrogenado. Embora não tenha havido diferença estatística significativa entre as médias das concentrações de fumonisinas em relação à dose de nitrogênio aplicada, níveis menores de fumonisinas (3,13 µg/g) foram detectados no tratamento 2 (160 Kg/ha de ureia), enquanto que em tratamentos com doses superiores ou inferiores a 160 kg/ha de ureia, houve uma tendência de aumento nos níveis dessas micotoxinas. Além disso, houve correlação negativa significativa (-0,3780; p<0,05) entre dosagens de fertilizantes nitrogenados e contaminação por fumonisinas. Os níveis de fumonisinas detectados em relação ao tipo de fertilizante nitrogenado utilizado não apresentaram diferença estatística significativa. Entretanto houve uma tendência de maior contaminação quando ureia + NBPT foi utilizada. Esses resultados evidenciam a importância da fertilização nitrogenada como ferramenta para minimização da ocorrência de fumonisinas, proporcionando maior segurança alimentar para animais em seres humanos.

Palavras-chave: Milho, fumonisinas, *Fusarium* spp., fertilização nitrogenada.

Abstract

Natural occurrence of toxigenic fungi and fumonisins (B₁ and B₂) was evaluated in freshly harvested corn samples from the Northern region of Paraná State treated with different types (urea and urea + urease inhibitor NBPT – N-(n-butyl) thiophosphoric triamide) and doses (80, 160 and 240 Kg/ha) of nitrogen fertilizer. The predominant fungal genera were *Fusarium* and *Penicillium* (83.33% and 98.61%, respectively) and the genus *Aspergillus* was detected at low frequency (4.17%). *Penicillium* sp., *Fusarium* sp. and *Aspergillus* sp. frequencies seem to have no relation with the dose and/or with the applied nitrogen fertilizer type. Fumonisins were detected in 100% of samples and high fumonisin levels (19.49 µg/g) were detected in the treatment without fertilizer application. Although differences in mean fumonisin levels and nitrogen fertilizer doses were not statistically significant, the lowest fumonisin levels (3.13 µg/g) were detected in treatment 2 (160 Kg/ha urea), whereas in the treatments with higher or lower nitrogen doses, there was an increasing trend in the levels of these mycotoxins. Furthermore, there was a significant negative correlation (-0.3789; p<0.05) between nitrogen fertilizer dosages and fumonisin contamination. There were no statistically significant differences in mean fumonisin levels and nitrogen fertilizer type; however there was a higher contamination trend when urea + NBPT were applied. These results show the nitrogen fertilizer importance as a tool to minimize fumonisin occurrence and thereby assure food quality for both animals and humans.

Key words: Maize, fumonisins, *Fusarium* spp., nitrogen fertilization.

INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é um cereal de importância econômica mundial, constituindo alimento básico em diversos países ^(1;2). O Brasil é o terceiro produtor mundial de milho, tendo produzido aproximadamente 51,4 milhões de toneladas no ano de 2007. O maior produtor nacional é o Estado do Paraná, responsável por 22 a 24% da produção de milho, dependendo do ano ⁽³⁾.

Este cereal está sujeito à contaminação por fungos toxigênicos, sendo os de maior ocorrência *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. e *Aspergillus* spp. ^(4;5). *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg é endêmico de milho, sendo considerado um dos principais responsáveis pela podridão de colmo, raiz e espigas ^(6;7), além de produzir micotoxinas denominadas fumonisinas ^(8;9).

Embora 28 análogos de fumonisinas tenham sido caracterizados desde 1988, os de maior ocorrência em milho e derivados são fumonisinas B₁ (FB₁), B₂ (FB₂) e B₃ (FB₃). A FB₁ é a mais abundante, representando 70% a 80% da concentração total em alimentos e sementes naturalmente contaminadas, enquanto FB₂ e FB₃ constituem de 15 a 25% e 3 a 8%, respectivamente ⁽¹⁰⁾.

Estas toxinas causam leucoencefalomalácia em equinos ⁽¹¹⁾, edema pulmonar em suínos ⁽¹²⁾, diarreia, perda de peso, desenvolvimento reduzido e efeito hepatotóxico em aves ^(13;14) e efeito hepatocarcinogênico em ratos ⁽¹⁵⁾. Além disso, estudos epidemiológicos sugerem uma correlação entre a ocorrência de fumonisinas em milho e câncer esofágico em seres humanos nas regiões de Transkei, na África do Sul ^(8;16;17;18) e Linxian, China ⁽¹⁹⁾; bem como câncer hepático em Huaian, Fusui e Huantai na China ⁽²⁰⁾.

A incidência de *F. verticillioides* e fumonisinas em milho é determinada em parte pelas condições climáticas e geográficas, sistemas de plantio, práticas de cultivo e manejo pós-colheita ^(21;22;23).

A fertilização nitrogenada constitui uma das alternativas para minimizar a ocorrência de fumonisinas, uma vez que a biossíntese dessas micotoxinas está relacionada à limitação de nitrogênio ⁽²⁴⁾. A aplicação de doses mais elevadas de nitrogênio durante o cultivo de milho, em geral reduz a ocorrência de fumonisinas ^(25;26;27). Entretanto, o excesso de nitrogênio pode favorecer a contaminação fúngica, em decorrência de um crescimento vegetativo mais prolongado, que aumentaria a exposição das folhas a patógenos, e de maior expansão foliar, que tornaria as paredes celulares mais delgadas e, portanto, mais vulneráveis à penetração fúngica ⁽²⁸⁾. Por outro lado, plantas de milho expostas ao estresse por falta de fertilidade do solo também são altamente susceptíveis à infecção por fungos toxigênicos ^(28;29;30).

A fonte de nitrogênio também influencia na contaminação de milho por micotoxinas. A utilização de ureia está relacionada à menor ocorrência de fumonisinas, enquanto que a utilização de fertilizante de liberação lenta favorece a incidência, uma vez que o fertilizante de liberação lenta pode promover um prolongamento da fase vegetativa (*staygreen*) nas plantas de milho, fornecendo melhores condições para o desenvolvimento fúngico ⁽²⁸⁾.

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

MATERIAL E MÉTODOS

Caracterização da área experimental

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

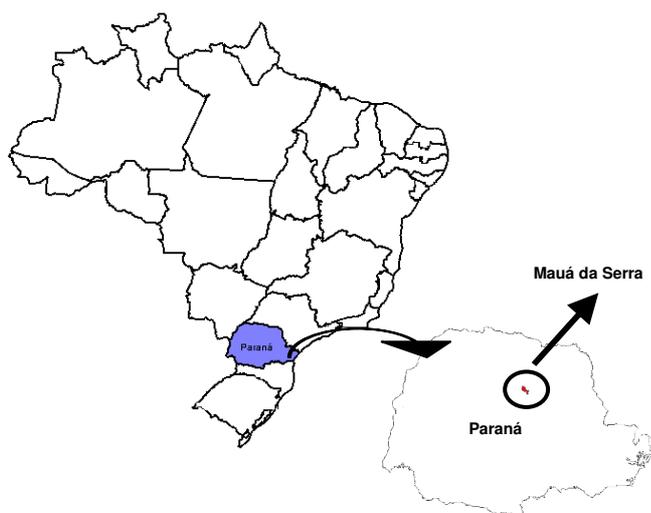


Figura 1. Localização da área experimental, mostrando o Estado do Paraná e o Município de Mauá da Serra, local da área experimental.

Sistema de Plantio e Fertilização Nitrogenada

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

Tabela 1. Fontes e doses de fertilizante nitrogenado

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

Amostragem

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

Avaliação da microbiota fúngica

Uma alíquota de 10 g de milho triturado (50 “mesh”) foi homogeneizada em 90 mL de água peptonada estéril 0,1% (v/v) e submetida a diluições seriadas em tubos contendo 9,0 mL do mesmo diluente até 10⁻⁵. Uma alíquota de 1 mL de cada diluição foi transferida para placas de Petri (em duplicata) contendo ágar batata dextrose (BDA - pH 4,0) adicionado de 50 µg/mL de cloranfenicol. As placas foram incubadas a 25 °C por 6 dias, procedendo-se à contagem e identificação dos gêneros de acordo com os métodos preconizados por Nelson et al. (1983)⁽³¹⁾, Singh et al. (1991)⁽³²⁾ e Samson et al. (1995)⁽³³⁾.

Determinação de Fumonisinas

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

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

As fumonisinas foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), de acordo com a metodologia descrita por Shephard et al. ⁽³⁴⁾, modificada por Ueno et al. ⁽³⁵⁾. As alíquotas de 200 µL foram redissolvidas em acetonitrila/água (1:1; v/v) e derivatizadas com *o*-ftaldialdeído (OPA). A análise foi realizada por sistema isocrático de fase reversa (bomba Shimadzu LC-10 AD e detector de fluorescência RF-10A XL), utilizando coluna C₁₈ Nucleosil 100-5 (4,6 x 250 mm, Macherey-Nagel GmbH & Co). Os comprimentos de onda de excitação e emissão foram 335 e 450nm, respectivamente. A fase móvel consistiu de metanol/tampão fosfato de sódio (CH₃OH:NaH₂PO₄) 0,1 M (80:20, v/v), com pH ajustado para 3,3 com ácido *o* – fosfórico. O fluxo foi mantido em 1 mL/min, e a temperatura em 25°C.

Análise Estatística

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

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 2 está apresentada a frequência relativa dos principais gêneros fúngicos em 72 amostras de milho provenientes da região Norte do Paraná. Os gêneros *Fusarium* e *Penicillium* foram os gêneros de maior ocorrência com 83,3% e 98,6%, respectivamente, em relação ao gênero *Aspergillus* com 4,2%.

A alta frequência de *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp. está de acordo com os dados relatados por Ono et al. (2008), que analisando 615 amostras de milho recém-colhido de duas safras (2003 e 2004) da região norte do Estado do Paraná, detectaram 100% de *Fusarium* spp. em ambas as safras, *Penicillium* spp. em 91,9 a 95,3%, na safra de 2003, e 84,1% na safra de 2004. *Aspergillus* spp. ocorreu em 19,3 a 19,8%, em 2003, e 5,6% das amostras em 2004 ⁽³⁶⁾.

Almeida et al. (2002) também demonstraram a predominância de *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp. em 90 amostras de milho em diferentes estágios de maturação em duas regiões do Estado de São Paulo, Capão Bonito (35% e 32%) e Ribeirão Preto (49% e 21%), respectivamente ⁽³⁷⁾. A baixa frequência observada para o gênero *Aspergillus* pode estar relacionada à competição com outros micro-organismos, principalmente os fungos do gênero *Fusarium* ^(38;39;40).

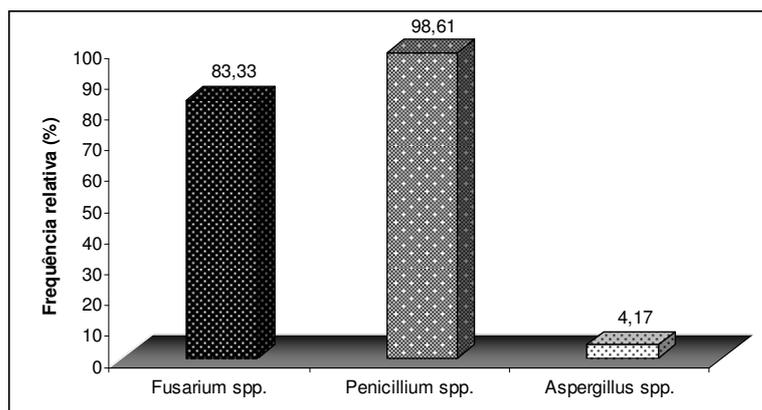


Figura 2. Frequência relativa de gêneros fúngicos isolados em amostras de milho (n = 72) recém-colhido da região norte do Estado do Paraná.

Os dados de contagem e as frequências absoluta e relativa dos principais gêneros fúngicos detectados em milho, de acordo com o tratamento experimental estão apresentados na Tabela 2. Em geral, as frequências de *Penicillium* spp., *Fusarium* spp. (Figura 3) e *Aspergillus* spp. não parecem ter relação com a dose e/ou com o tipo de fertilizante nitrogenado. Estes resultados contrastam com Blandino et al. (2008), que analisando amostras de milho colhidas em três anos (2000, 2001 e 2002) no nordeste da Itália, detectaram um aumento significativo da infecção assintomática por *Fusarium verticillioides* quando o fertilizante de liberação lenta foi utilizado, nas safras de 2000 e 2002⁽²⁸⁾. Os autores também demonstraram que a contaminação por este fungo é menor quando doses balanceadas (100 e 200 kg/ha) de ureia são utilizadas, sendo que a ausência total e o excesso de nitrogênio podem aumentar significativamente a incidência de *F. verticillioides*⁽²⁸⁾.

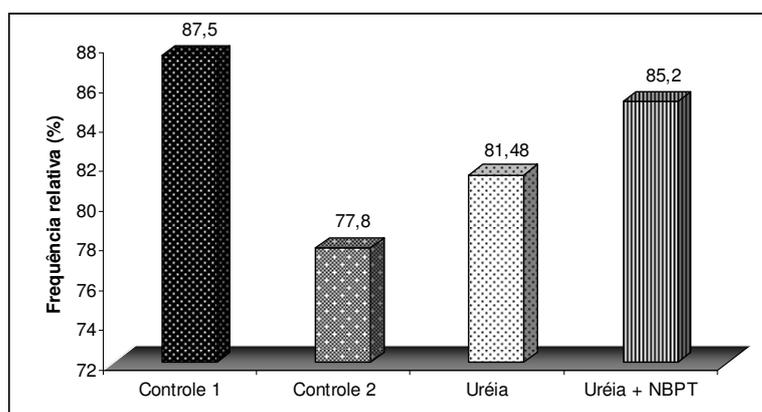


Figura 3. Frequência relativa de *Fusarium* spp. em 72 amostras de milho tratado com dois tipos diferentes de fertilizantes nitrogenados (uréia e uréia + NBPT).

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

Tratamento	Nitrogênio Total		<i>Fusarium</i> spp.			<i>Aspergillus</i> spp.			<i>Penicillium</i> spp.		
	Fonte	Kg/ha	UFC/g*	FA	FR	UFC/g	FA	FR	UFC/g*	FA	FR
Controle 1 (n=9)	-----	-----	6,4x10 ⁴ a	8	88,9	ND	-----	-----	2,3x10 ⁵ a	9	100
Controle 2 (n=9)	-----	40	3,9x10 ³ a	7	77,8	1,5x10 ³	2	22,2	2,5x10 ⁴ a	9	100
1 (n=9)	Uréia	80	2,4x10 ⁴ a	7	77,8	4,2x10 ⁴	1	11,1	3,1x10 ⁴ a	9	100
2 (n=9)	Uréia	160	3,7x10 ⁴ a	7	77,8	ND	-----	-----	4,4x10 ⁵ a	9	100
3 (n=9)	Uréia	240	1,9x10 ⁴ a	8	88,9	ND	-----	-----	2,7x10 ⁵ a	9	100
4 (n=9)	Uréia + NBPT	80	8,9x10 ⁴ a	7	77,8	ND	-----	-----	2,5x10 ⁵ a	9	100
5 (n=9)	Uréia + NBPT	160	2,7x10 ⁵ a	8	88,9	ND	-----	-----	3,2x10 ⁵ a	9	100
6 (n=9)	Uréia + NBPT	240	2,1x10 ⁵ a	8	88,9	ND	-----	-----	1,1x10 ⁵ a	8	88,9
TOTAL (n=72)			10 ³ – 10 ⁵	60	83,3	10 ³ – 10 ⁴	3	4,2	10 ⁴ – 10 ⁵	71	98,6

FR (%) = frequência relativa

UFC = unidades formadoras de colônia

ND = não detectado

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

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

Altos níveis de fumonisinas (19,49 µg/g) foram detectados no Controle 1 (C1), o qual não foi tratado com fertilizante nitrogenado. De modo similar, Blandino et al. (2008) relataram que o *stress* por falta de nitrogênio aumenta significativamente a contaminação de milho por FB₁ ⁽²⁸⁾. Diversos outros autores também relataram alta incidência de doenças causadas por fungos toxigênicos em milho devido ao *stress* por falta de fertilizante ^(21;29;41;42).

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

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

FBT = fumonisinas totais (FB₁ + FB₂)

* Média de três repetições

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

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

Diversos autores relataram que a aplicação de doses moderadas de nitrogênio (aproximadamente 200 Kg/ha) em geral reduzia a ocorrência de aflatoxinas e fumonisinas^(25;26;27). Blandino et al. (2008) também demonstraram uma redução nos níveis de fumonisinas em milho com aplicação de doses moderadas de ureia, e que a concentração da micotoxina aumenta não apenas quando há *stress* por falta de nitrogênio, mas também quando o fertilizante nitrogenado é aplicado em excesso (300 a 400 Kg/ha)⁽²⁸⁾.

A repressão da síntese de fumonisinas em decorrência de nitrogênio foi também observada em estudos *in vitro* em meios de cultivo líquidos por Shim e Woloshuk (1999)⁽²⁴⁾. A pesquisa desses autores foi executada em meio líquido contendo fosfato de amônio em concentrações de 1,25, 2,5, 10 e 20 mM, sendo constatado que nos meios com menores concentrações de nitrogênio, a síntese de fumonisinas iniciou antes de 18 horas após a inoculação, enquanto que nos meios contendo 10 e 20 mM de fosfato de amônio, a síntese de fumonisinas ocorreu 75 e 125 horas após a inoculação, respectivamente. Além disso, a adição de fosfato de amônio em concentrações de 10 e 20 mM em cultivos de meio sólido constituídos de milho triturado reprimiu a síntese de fumonisinas em 97% e 99%, respectivamente, após uma semana, sendo que a repressão foi observada durante as três semanas totais do experimento. Os dados desses autores demonstram que a biossíntese de fumonisinas é

regulada por mecanismos que envolvem a repressão metabólica por nitrogênio, sugerindo que estratégias de controle que visem os elementos regulatórios do metabolismo do nitrogênio podem ser eficientes para reduzir a contaminação de alimentos por fumonisinas.

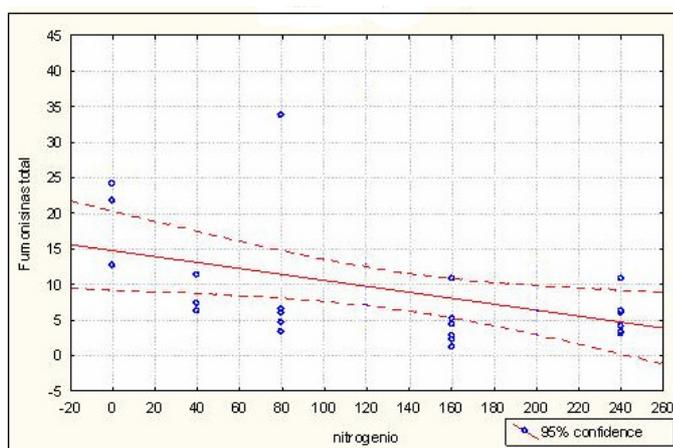


Figura 4. Correlação entre níveis de fumonisinas totais (em $\mu\text{g/g}$) e doses de fertilizante nitrogenado (em Kg/ha). A equação $y = 14,771 - 0,0419x$ foi obtida com o coeficiente de correlação de $-0,3780$ ($p < 0,05$).

Os níveis médios de fumonisinas nos tratamentos aos quais foi aplicada ureia foram similares aos daqueles tratamentos onde ureia + NBPT foi utilizada (Tabela 3), sendo que não houve diferença estatística pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Entretanto, os níveis de fumonisinas mostraram uma tendência de serem maiores nos tratamentos em que foi aplicada ureia + NBPT, quando comparados aos níveis dos tratamentos em que apenas ureia foi aplicada (Tabela 3). Blandino et al. (2008) detectaram aumento nos níveis de FB_1 de $327 \mu\text{g/g}$ para $1249 \mu\text{g/g}$ quando utilizado fertilizante de liberação lenta (safra de 2002), fenômeno este que pode ser explicado pelo fato de que o fertilizante de liberação lenta pode promover prolongamento da fase vegetativa (*staygreen*) nas plantas de milho, fornecendo melhores condições para o desenvolvimento de fungos toxigênicos, e conseqüentemente, aumentando os níveis de micotoxinas encontradas em grãos⁽²⁸⁾.

Em suma, os resultados obtidos neste trabalho mostram que o suprimento adequado de nitrogênio em culturas de milho pode ser utilizado para diminuir o risco de contaminação por fumonisinas. Entretanto, não é fácil definir a dose de fertilizante nitrogenado que deve ser aplicado com esse objetivo, uma vez que tanto a produtividade, quanto a contaminação por micotoxinas podem ser também influenciadas por outros fatores e técnicas de cultivo, como tempo de plantio, densidade de plantas, híbridos utilizados, microclima, interação com outros nutrientes, etc.^(27;28;43;44).

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

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Fundo Paraná/SETI, a Fundação Araucária, CNPq, PPSUS/Ministério da Saúde e CAPES pelo apoio financeiro e pela concessão de bolsa de Mestrado a Tatiana de Ávila Miguel e de Doutorado a Jaqueline G. Bordini e Aline M. Omori. Ao CNPq pela concessão de bolsa produtividade a Elisa Y. Hirooka e Elisabete Y. S. Ono.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Magalhães PC, Durães FOM, Carneiro NP, Paiva E. Fisiologia do milho. *Min Agric Pec Abastec – Circ. Téc*, 22: 65, 2003.
2. Duarte JO, Cruz JC, Garcia JC, Mattoso MJ. Cultivo do milho. EMBRAPA Milho e Sorgo – Sistema de produção 1, 2ª edição. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br>, 2006.
3. CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Safras de grãos: Brasil/produtores. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>, 2007
4. Chulze SN, Ramirez ML, Farnochi M, Pascale M, Visconti A, March G. *Fusarium* and fumonisins occurrence in Argentinian corn at different ear maturity stages. *J Agr Food Chem*, 44: 2797-2801, 1996.
5. Cardwell KF, King JG, Maziya-Dixon B, Bosque-Perez NA. Interactions between *Fusarium verticillioides*, *Aspergillus flavus*, and insect infestation in four maize genotypes in Lowland Africa. *Phytopathology*, 90: 276-284, 2000.
6. Munkvold GP, McGee DC, Carlton WN. Importance of different pathways for maize kernel infection by *Fusarium moniliforme*. *Phytopathology*, 87 (2): 209–217, 1997.
7. Tanaka MAS. Sobrevivência de *Fusarium moniliforme* em sementes de milho mantidas em duas condições de armazenamento. *Fitopatol Bras*, 26: 60-64, 2001.
8. Gelderblom WCA, Jaskiewicz K, Marasas WFO, Thiel PG, Horak RM, Vlegaar R, Kriek NPJ. Fumonisins – novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Appl Environ Microb*, 54: 1806-1811, 1988.
9. Bezuidenhout SC, Gelderblom WCA, Gorst-Allman CP, Horak RM, Marasas WFO, Spiteller G, Vlegaar R. Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. *J Chem Soc Chem Comm*, 1988: 743-745, 1988.
10. Rheeder JP, Marasas WFO, Vismar HF. Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species. *Appl Environ Microb*, 68 (5): 2101-2105, 2002.
11. Marasas WFO, Kellerman TS, Gelderblom WCA, Thiel PG, Coetzer JAW. Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B₁, isolated from *Fusarium moniliforme*. *Onderstepoort J Vet*, 55: 197 – 203, 1988.

12. Harrison LR, Colvin BM, Greene JT, Newman LE, Cole JR. Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B₁, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. *J Vet Diagn Invest*, 2: 217-221, 1990.
13. Ledoux DR, Brown TP, Weibking TS, Rottinghaus GE. Fumonisin toxicity in broiler chicks. *J Vet Diagn Invest*, 4: 330-333, 1992.
14. Weibking TS, Ledoux DR, Bermudez AJ, Turk JR, Rottinghaus GE, Wanf E, Merrill AH. Effects of feeding *Fusarium moniliforme* culture material, containing known levels of fumonisin B₁ on the young broiler chick. *Poultry Sci*, 72: 456-466, 1993.
15. Gelderblom WCA, Snyman SD, Abel S, Lebepe-Mazur S, Smuts CM, Van der Westhuizen L, Marasas WFO, Victor TC, Knasmüller S, Huber W. Hepatotoxicity and carcinogenicity of the fumonisins in rats: a review regarding mechanistic implications for establishing risk in humans. In: *Fumonisin in Food*. Eds., L. S. Jackson, J. W. De Vries and L. B. Bullerman. New York: NY Plen. Press, pp. 279-296, 1996.
16. Gelderblom WCA, Sample E, Marasas WFO. The cancer initiating potential of the fumonisins B mycotoxins. *Carcinogenesis*, 13: 433-437, 1992.
17. Thiel PG, Marasas WFO, Sydenham EW, Shephard GS, Gelderblom WCA. The implications of naturally occurring levels of fumonisins in corn for human and animal health. *Mycopathol*, 117: 3-9, 1992.
18. Marasas WFO. Fumonisin: Their implications for human and animal health. *Nat Toxins*, 3: 193-198, 1995.
19. Chu FS, Li GY. Simultaneous occurrence of fumonisin B₁ and other mycotoxins in moldy corn collected from the peoples' Republic of China in regions with high incidences of esophageal cancer. *Appl Environ Microb*, 60: 847-852, 1994.
20. Sun G, Wang S, Hu X, Su J, Huang T, Yu J, Tang L, Gao W, Wang JS. Fumonisin B₁ contamination of home-grown corn in high-risk areas for esophageal and liver cancer in China. *Food Addit Contam*, 24 (2): 181-185, 2007.
21. Munkvold GP. Cultural and genetic approaches to managing mycotoxins in maize. *Annual Rev Phytopathology*, 41: 99-116, 2003.
22. Baptista AS, Horii J, Baptista AS. Fatores físico-químicos e biológicos ligados à produção de micotoxinas. *B.CEPPA*, 22 (1): 1-14, 2004.
23. Reyneri A. The role of climatic condition on mycotoxin production in cereal. *Vet Res Commun*, 30 (1): 87-92, 2006.
24. Shim WB, Woloshuk CP. Nitrogen repression of fumonisin B₁ biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*. *Fems Microbiol Lett*, 177: 109-116, 1999.
25. Jones RK, Duncan HE. Effect of nitrogen fertilizar, planting date and harvest date on aflatoxin production in corn inoculated with *Aspergillus flavus*. *Plant Dis*, 65: 741-747, 1981.

26. Blandino M, Alma A, Matta A, Reynery A. Best management practices to assure low mycotoxin content of corn kernel during production. Intern Qual Grains Conf Proc, Indianápolis, Indiana, USA, 2004.
27. Hassegawa RH, Fonseca H, Fancelli AL, Silva VN, Schammas EA, Reis TA, Correa B. Influence of macro and micronutrient fertilization on fungal contamination and fumonisin production in corn grains. Food Control, 19: 36-43, 2008.
28. Blandino M, Reyneri A, Vanara F. Influence of nitrogen fertilization on mycotoxin contamination of maize kernels. Crop Prot, 27: 222-230, 2008.
29. Miller JD. Factors that affect the occurrence of fumonisin. Environ Health Persp, 109 (2): 321-324, 2001.
30. Widstrom NW. 1996. The aflatoxin problem with corn grain. In: Blandino M, Reyneri A, Vanara F. Influence of nitrogen fertilization on mycotoxin contamination of maize kernels. Crop Prot, 27: 222 – 230, 2008.
31. Nelson PE, Tousson TA, Marasas WFO. *Fusarium* species – An illustrated manual for identification. Penns St Univ Press, 1983.
32. 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.
33. Samson RA, Hoeskstra ES, Frisvad JC, Filtenborg O. Introduction to food-borne fungi. The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 1995.
34. Shephard GS, Sydenham EW, Thiel PG, Gelderblom WCA. Quantitative determination of fumonisins B₁ and B₂ by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. J Liq Chromatogr, 13: 2077-2087, 1990.
35. 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 Res, 9: 27-34, 1993.
36. Ono EYS, Silva M, Hashimoto EH, Vizoni E, Kawamura O, Sugiura Y, Hirooka EY. Mycotoxicological quality evaluation of corn samples used by processing industries in the Northern region of Paraná State, Brazil. Food Addit Contam, 25 (11): 1392-1399, 2008.
37. Almeida PA, Fonseca H, Fancelli AL, Direito GM, Ortega EM, Correa B. Mycoflora and Fumonisin Contamination in Brazilian Corn from Sowing to Harvest. J Agr Food Chem, 50: 3877-3882, 2002.
38. Zummo N, Scott GE. Interaction of *Fusarium moniliforme* and *Aspergillus flavus* on kernel infection and aflatoxin contamination in maize ears. Plant Dis, 76: 771-773, 1992.

39. Ono EYS, Sugiura Y, Homechim M, Kamogae M, Vizzoni E, Ueno Y, Hirooka EY. Effect of climatic conditions on natural mycoflora and fumonisins in freshly harvested corn of the State of Paraná, Brazil. *Mycopathology*, 147: 139-148, 1999.
40. Marín S, Magan N, Belli N, Ramos AJ, Canela R, Sanchis V. Two dimensional profiles of fumonisin B₁ production by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* in relation to environmental factors and potential for modeling toxin formation in maize grain. *Int J Food Microbiol*, 51: 159-167, 1999.
41. Shelby RA, White DG, Bauske EM. Differential fumonisin production in maize hybrids. *Plant Dis*, 78: 582-584, 1994.
42. Rodriguez-Del-Bosque LA. Impact of agronomic factors on aflatoxin contamination in preharvest field corn in Northeastern Mexico. *Plant Dis*, 80: 988-993, 1996.
43. Otto HJ, Everett HL. Influence of nitrogen and potassium fertilization on the incidence of stalk rot of corn. *Agron J*, 48: 301-305, 1956.
44. Younts SE, Musgrave RB. Chemical composition, nutrient absorption and stalk rot incidence of corn as affected by chloride in potassium fertilizer. *Agron J*, 50: 426-429, 1958.