

Efeito do sistema de plantio e da fertilização nitrogenada na contaminação de milho por fumonisinas

Effect of cropping system and nitrogen fertilization in corn contamination by fumonisins

Luciana Von Hohendorff Ferreira¹, Aline Myuki Omori², Jaqueline Gozzi Bordini¹,
Melissa Tiemi Hirozawa¹, Elisa Yoko Hirooka³, Elisabete Yurie Sataque Ono¹

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

²Departamento de Ciências Patológicas - CCB - Universidade Estadual de Londrina

³Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos - CCA - Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR, Brasil.

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

Nesse estudo foram avaliadas a contaminação fúngica natural e a contaminação por fumonisinas em 60 amostras de milho recém-colhido da região Norte do Paraná (safra 2008), sob diferentes sistemas de plantio (direto e convencional) e sucessão de culturas (aveia e pousio) no inverno. Além disso, o efeito da aplicação de fertilizante nitrogenado (0; 22,5; 45,0; 67,5 e 90,0 Kg/ha) sobre a contaminação por fumonisinas foi também avaliado. *Penicillium* spp. foi o gênero prevalente, sendo detectado em 95% das amostras, seguido de *Fusarium* spp. (78,33%) e *Aspergillus* spp. (10%). As concentrações de fumonisinas variaram de 0,26 a 3,84 µg/g, sendo as maiores médias detectadas nos sistemas de plantio convencional em sucessão a pousio e direto em sucessão a aveia, porém não diferiram significativamente dos demais sistemas de plantio pelo Teste de Tukey ($p > 0,05$). As médias da atividade de água dos grãos de milho variaram de 0,53 a 0,63, sendo que no sistema de plantio direto em sucessão a aveia as amostras apresentaram a maior média de a_w (0,63). A menor concentração média de fumonisinas foi detectada em milho cultivado na parcela que recebeu 67,5 Kg/ha de nitrogênio, porém não houve diferença significativa com os demais tratamentos pelo Teste de Tukey ($p > 0,05$). Os resultados desse estudo ressaltam a importância das práticas agrícolas adequadas sobre a prevenção e redução da incidência de doenças causadas por fungos bem como na produção de fumonisinas em grãos.

Palavras-chave: milho, fumonisinas, sistemas de plantio, sucessão de culturas.

Abstract

The natural fungal and fumonisin contamination was evaluated in 60 freshly harvested corn samples in the Northern region of Paraná State (2008 crop) under different cropping systems (no-tillage and conventional tillage) and crop successions (oats and fallow) in the winter. In addition, the effect of nitrogen (N) fertilizer application (0; 22.5; 45.0; 67.5 and 90.0 kg/ha) on fumonisin contamination was evaluated. *Penicillium* sp. was the prevalent genera and was

detected in 95% of the samples, followed by *Fusarium* sp. (78.3%) and *Aspergillus* sp. (10%). Fumonisin concentration ranged from 0.26 to 3.84 µg/g and the highest mean fumonisin levels were detected in conventional till corn following fallow and no-till corn following oats, although there was no significant difference between the cropping systems by the Tukey test ($p > 0.05$). Mean water activity (a_w) ranged from 0.53 to 0.63 and the no-till corn following oats showed the highest mean a_w levels (0.63). The lowest mean fumonisin concentration was detected in plots treated with 67.5 kg/ha nitrogen, but there was no significant difference from the other treatments by the Tukey test ($p > 0.05$). These results ratify the importance of agriculture practices for preventing and reducing the incidence of disease caused by fungi as well as fumonisin concentration in corn.

Keywords: corn, fumonisin, cropping system, crop successions

INTRODUÇÃO

O Brasil, com uma produção anual de 51,1 milhões de toneladas, é o terceiro maior produtor de milho do mundo e o Estado do Paraná é responsável por 26,5% da produção nacional ⁽¹⁾.

Grãos de milho podem ser contaminados por uma variedade de espécies de fungos toxigênicos. A alta incidência de contaminação de milho por *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg (*F. moniliforme* Sheldon) é motivo de preocupação em todo o mundo desde a descoberta das fumonisinas ⁽²⁾.

Pelo menos 28 análogos foram caracterizados e classificados em quatro principais grupos, fumonisinas das séries A, B, C e P, sendo as fumonisinas B₁ (FB₁) e B₂ (FB₂) as de maior frequência em milho e derivados ⁽³⁾. FB₁ é o constituinte mais tóxico e de maior ocorrência, respondendo por aproximadamente 70% do total de fumonisinas encontradas naturalmente ^(4,5).

As fumonisinas causam leucoencefalomalácia em equinos, edema pulmonar e hidrotórax em suínos, efeitos hepatotóxicos e carcinogênicos e apoptose em fígado de ratos ^(6,7,8). Em seres humanos, há uma provável associação com câncer esofágico e foram classificadas pelo IARC (1993) ⁽⁹⁾ como carcinógenos do grupo 2B ^(4,7,8).

Vários pesquisadores têm relatado alta incidência de contaminação por fumonisinas em milho e derivados nos estados brasileiros ^(10,11,12). Moreno et al. (2009) ⁽¹²⁾ detectaram fumonisinas em 100 % das amostras de milho recém-colhido da safra 2003 da região Norte do Paraná (n = 150), onde estudos prévios demonstraram a maior contaminação por fumonisinas em milho dessa região ^(13,14,15,16).

A melhor estratégia para o controle eficaz da contaminação por fumonisinas é a prevenção da infecção por *F. verticillioides* e da produção de fumonisinas no campo e durante o armazenamento de grãos.

As principais estratégias para o controle fitossanitário do milho envolvem o uso de pesticidas e da aplicação de práticas agrícolas, como plantio direto e rotação de culturas. Essa última afeta as características químicas e biológicas do solo e, portanto, a microbiota do cereal ⁽¹⁷⁾.

No Brasil, o milho é produzido por meio dos sistemas de plantio convencional e direto. O plantio direto é o sistema mais frequentemente utilizado, principalmente nas grandes áreas. O sistema convencional é ainda predominante entre pequenos produtores, embora seja crescente a adoção do plantio direto ⁽¹⁾. O sistema de plantio direto reduz a perda de solo, água e nutrientes por erosão em relação ao sistema de cultivo convencional, em virtude da não-desagregação do solo e da manutenção de cobertura vegetal e palha na sua superfície ^(18,19). Adicionalmente, a rotação de culturas

envolvendo plantas leguminosas é frequentemente descrita como benéfica para o solo, fornecendo nitrogênio e fonte de carbono para a microbiota do solo de culturas posteriores, e minimizando a erosão ⁽²⁰⁾.

O nitrogênio é um macronutriente que desempenha importante papel na nutrição e resistência das plantas e a produtividade do milho pode ser correlacionada com a disponibilidade desse mineral ⁽²¹⁾. Uma aplicação balanceada de fertilizante nitrogenado aliada ao manejo e práticas agrícolas adequadas seria a melhor solução para prevenir a contaminação de grãos de milho por fumonisinas ⁽²²⁾. O fornecimento de doses adequadas de nutrientes para a cultura do milho é fundamental para o desenvolvimento da planta, uma vez que a deficiência ou excesso de nutrientes essenciais podem influenciar na incidência de doenças causadas por fungos bem como na produção de micotoxinas em grãos ⁽¹¹⁾. Considerando a importância econômica e nutricional do milho e o número limitado de trabalhos no Brasil enfocando as práticas agrícolas e a contaminação de grãos por micotoxinas, o objetivo do presente estudo foi avaliar a influência de diferentes sistemas de plantio, sucessão de culturas e fertilização nitrogenada na contaminação de milho por fungos e fumonisinas.

MATERIAL E MÉTODOS

Sistema de Plantio e Sucessão de Cultura

O híbrido de milho Pioneer 30F53 foi cultivado na Fazenda Escola da Universidade Estadual de Londrina (latossolo vermelho) semeando cinco sementes/metro linear. As unidades experimentais constituíram-se de quatro linhas de 5 m e espaçamento de 0,90 m entre linhas, totalizando 20 parcelas para cada sistema de plantio. Foram avaliados os sistemas de plantio direto e convencional em sucessão a aveia e pousio no inverno na safra 2008. Também foram avaliados os efeitos da aplicação de diferentes doses de nitrogênio (N) (0; 22,5; 45,0; 67,5 e 90,0 Kg/ha) correspondente a 0, 25, 50, 75 e 100% da dose de nitrogênio em cobertura (DNC), usando-se ureia como fertilizante. A amostragem foi realizada através da coleta de 10 espigas de milho por parcela, homogeneizadas, totalizando 1,5 Kg.

Análise da Microbiota Fúngica

Uma alíquota de duzentos gramas de milho foi triturada até granulometria de 50 “mesh” e homogeneizada. 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 transferida para placas de Petri (em duplicata) contendo ágar batata dextrosado (BDA - pH 4,0) adicionados de 50 µg/mL de cloranfenicol e incubados 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) ⁽²³⁾, Singh et al. (1991) ⁽²⁴⁾ e Samson et al. (1995) ⁽²⁵⁾.

Extração de Fumonisinas

Para extração de fumonisinas, 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 rpm por 30 minutos. A suspensão foi centrifugada a $4500 \times g$ por 10 minutos e o sobrenadante (1 mL) foi submetido à pré-limpeza em minicoluna 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, o resíduo 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 análise de fumonisinas.

Determinação de Fumonisinas

As fumonisinas B₁ e B₂ foram analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, segundo o método de Shephard et al. (1990)⁽²⁶⁾ modificado por Ueno et al. (1993)⁽²⁷⁾. A alíquota de 200 µL seca sob fluxo de nitrogênio gasoso foi redissolvida em acetonitrila:água (1:1, v/v) e submetida à derivatização com 200 µL de o-ftaldialdeído (OPA) (40 mg de OPA, 1 mL de metanol, 5 mL de tetraborato de sódio a 0,1 mol/L e 50 µL de 2-mercaptoetanol), injetado dentro de 1 minuto em cromatógrafo líquido de alta eficiência – CLAE (sistema isocrático de fase reversa) consistindo de uma bomba Shimadzu LC-10AT, detector de fluorescência Shimadzu RF-10A XL e coluna Luna C-18 (250 x 4,6 mm, Phenomenex). 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 (80:20, v/v) ajustada para pH 3,3 com ácido orto-fosfórico. O fluxo foi de 1 mL/min e temperatura de forno constante a 25 °C. Os limites de detecção para FB₁ e FB₂ foram 27,5 ng/g e 35,3 ng/g, respectivamente. As taxas médias de recuperação de FB₁ e FB₂ a partir de amostras de milho artificialmente contaminadas na faixa de 100 – 400 ng/g FB₁ e 250 – 450 ng/g FB₂ foram 95,6 % e 96,9 %, respectivamente, baseando-se em duas repetições e análises em duplicata.

Determinação da Atividade de Água

A atividade de água dos grãos de milho triturados (50 mesh) foi determinada utilizando o equipamento Aqualab CX-2 (Decagon Devices Inc., Pullman, Washington).

Análise Estatística

As diferenças entre as médias da contagem de *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp., da concentração de fumonisinas e da atividade de água entre os diferentes sistemas de plantio foram avaliadas estatisticamente utilizando ANOVA seguido pelo Teste de Tukey. A correlação entre atividade de água, contagem de *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. e concentração de fumonisinas foi analisada pelo Teste de correlação de Pearson. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. As análises estatísticas foram realizadas utilizando software Statistic 6.0 (Stat Soft, Inc.).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A frequência relativa dos principais gêneros fúngicos em milho recém-colhido (n = 60) de campo experimental da região norte do Paraná (safra 2008) é mostrada na Figura 1.

Penicillium spp. e *Fusarium* spp. foram os gêneros prevalentes, sendo detectados em 95% e 78,3% das amostras, respectivamente, enquanto *Aspergillus* spp. em 10% das amostras. A alta frequência de *Penicillium* spp. e *Fusarium* spp. está de acordo com os resultados de Moreno et al. (2009)⁽¹²⁾ e Ono et al. (2006)⁽¹⁵⁾, porém esses autores detectaram maior frequência de *Fusarium* spp. em relação a *Penicillium* spp. Moreno et al. (2009)⁽¹²⁾, analisando 150 amostras de milho (safra 2003) da região Norte do Paraná, detectaram *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp. em 100 % e 97,3% das amostras,

respectivamente. Ono et al. (2006)⁽¹⁵⁾ detectaram *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp. em 100% e 91,6% das amostras de milho (n = 24) da região norte do Paraná. Almeida et al. (2002)⁽²⁸⁾ analisaram 90 amostras de milho de duas regiões do Estado de São Paulo (Capão Bonito e Ribeirão Preto) e também detectaram a predominância desses gêneros fúngicos, porém em menores porcentagens. *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp. foram detectados em 35% e 32% das amostras de Capão Bonito e em 49% e 21% das amostras de Ribeirão Preto, respectivamente.

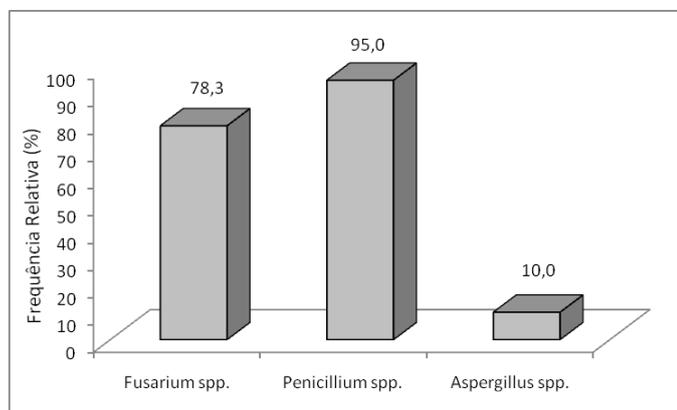


Figura 1. Frequência relativa dos principais gêneros fúngicos em milho recém-colhido (n = 60) da safra 2008 da região Norte do Paraná.

A contagem total de bolores e leveduras variou de $1,0 \times 10^2$ a $4,0 \times 10^6$ UFC/g (Tabela 1). *Fusarium* spp. foram detectados na faixa de 10^2 a 10^4 UFC/g (média $1,3 \times 10^4$ UFC/g) no plantio convencional em sucessão a aveia e na faixa de 10^3 a 10^4 UFC/g (média $8,8 \times 10^3$ UFC/g) no plantio direto em sucessão a aveia, sendo a maior média ($7,9 \times 10^4$ UFC/g) no sistema de plantio direto em sucessão a pousio, no entanto, não houve diferença significativa com os demais sistemas de plantio ($p > 0,05$). A maior média de *Penicillium* spp. ($1,1 \times 10^6$ UFC/g) foi detectada no sistema de plantio direto em sucessão a aveia, diferindo significativamente dos demais sistemas de plantio ($p > 0,05$). O gênero *Aspergillus* foi detectado em somente uma amostra nos sistemas de plantio convencional em sucessão a aveia no inverno ($1,0 \times 10^2$ UFC/g) e convencional em sucessão a pousio no inverno ($1,0 \times 10^3$ UFC/g), não sendo detectado nas amostras do sistema de plantio direto em sucessão a aveia. A baixa frequência de *Aspergillus* spp. está de acordo com Marín, Sanchis e Magan (1995)⁽²⁹⁾, que sugerem uma correlação negativa entre *Aspergillus* spp. e *Fusarium* spp. quando são co-contaminantes em milho. Moreno et al. (2009)⁽¹²⁾, analisando 150 amostras de milho da região Norte do Paraná (safra 2003) detectaram *Aspergillus* spp. na faixa de $10^2 - 10^4$ UFC/g em amostras de recepção (n = 90), mas na faixa de $10^2 - 10^5$ UFC/g em amostras de pré-secagem (n = 60) de indústrias processadoras de milho.

Na Tabela 2 são apresentadas as concentrações de fumonisinas e atividade de água (a_w) de milho cultivado sob diferentes sistemas de plantio e sucessão de culturas (safra 2008). As concentrações de fumonisinas variaram de 0,26 a 3,84 $\mu\text{g/g}$ (média 2,43 $\mu\text{g/g}$) e de 0,95 a 3,72 $\mu\text{g/g}$ (média 2,32 $\mu\text{g/g}$) em milho cultivado sob os sistemas de plantio convencional em sucessão a pousio e direto em sucessão a aveia, respectivamente. Embora as concentrações médias de fumonisinas tenham sido maiores nesses dois sistemas de plantio, não apresentaram diferença significativa em relação aos

demais sistemas de plantio pelo Teste de Tukey ($p > 0,05$). Moreno (2008) ⁽³⁰⁾, avaliando o efeito de diferentes sistemas de plantio e sucessão de culturas (safras 2006 e 2007) em milho cultivado na região Norte do Paraná, detectou concentrações médias mais elevadas de fumonisinas, 6,97 $\mu\text{g/g}$ e 6,29 $\mu\text{g/g}$, em plantio direto em sucessão a aveia nas safras de 2006 e 2007, respectivamente.

Tabela 1. Contagem de *Fusarium* spp., *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp. e bolores e leveduras em milho ($n = 60$) cultivado sob diferentes sistemas de plantio e sucessão de culturas na região norte do Paraná (safra 2008).

SP e SC	<i>Fusarium</i> spp. (UFC/g)		<i>Penicillium</i> spp. (UFC/g)		<i>Aspergillus</i> spp. (UFC/g)		Contagem total de bolores e leveduras (UFC/g)	
	Média*	Faixa	Média*	Faixa	Média	Faixa	Média	Faixa
CA	1,3x10 ^{4a}	1,0x10 ²⁻ 5,0x10 ⁴	6,5x10 ^{4ab}	9,0x10 ²⁻ 4,6x10 ⁵	1,0x10 ² **	-	2,0x10 ⁴	1,0x10 ²⁻ 4,6x10 ⁵
CP	6,0x10 ^{4a}	4,0x10 ²⁻ 4,2x10 ⁵	7,9x10 ^{4b}	2,0x10 ³⁻ 2,5x10 ⁵	1,0x10 ³ **	-	3,7x10 ⁴	4,0x10 ²⁻ 4,2x10 ⁵
DA	8,8x10 ^{3a}	1,0x10 ³⁻ 2,0x10 ⁴	1,1x10 ^{6a}	2,8x10 ⁴⁻ 4,0x10 ⁶	-	-	2,8x10 ⁵	1,0x10 ³⁻ 4,0x10 ⁶
DP	7,9x10 ^{4a}	1,0x10 ³⁻ 3,9x10 ⁵	4,6x10 ^{4b}	3,0x10 ³⁻ 1,0x10 ⁵	4,0x10 ³	1,0x10 ³ 1,0x10 ⁴	3,4x10 ⁴	1,0x10 ³⁻ 3,9x10 ⁵

SP e SC = Sistema de plantio e sucessão e culturas; CA = plantio convencional em sucessão a aveia no inverno; CP = plantio convencional em sucessão a pousio no inverno; DA = plantio direto em sucessão a aveia no inverno; DP = plantio direto em sucessão a pousio no inverno

* Médias seguidas das mesmas letras não apresentam diferença significativa pelo Teste de Tukey ($p > 0,05$)

** Detectado em somente uma amostra

As concentrações de fumonisinas (Tabela 2) foram menores que as relatadas por Ono et al. (2006) ⁽¹⁵⁾, Abbas et al. (2006) ⁽³¹⁾ e Silva et al. (2008) ⁽¹⁶⁾. Ono et al. (2006) ⁽¹⁵⁾ analisaram 109 amostras de milho recém-colhido do Estado do Paraná e detectaram concentrações de fumonisinas na faixa de 0,13 – 20,38 $\mu\text{g/g}$. Abbas et al. (2006) ⁽³¹⁾ detectaram fumonisinas em 100% das amostras de milho ($n = 65$) dos Estados Unidos, em concentrações variando de 22 - 86 $\mu\text{g/g}$. Silva et al. (2008) ⁽¹⁶⁾ analisaram 245 amostras de milho recém-colhido (safra 2004) de indústrias processadoras de milho da região Norte do Paraná, detectando fumonisinas em 100% das amostras, com concentrações variando de 0,07 - 4,78 $\mu\text{g/g}$, 0,03 - 4,09 $\mu\text{g/g}$ e 0,11 - 11,21 $\mu\text{g/g}$ em amostras de campo, recepção e pré-secagem, respectivamente.

As médias da atividade de água dos grãos de milho variaram de 0,56 a 0,63 (Tabela 2), sendo que no sistema de plantio direto em sucessão a aveia, as amostras apresentaram a maior média de a_w (0,63), diferindo significativamente da a_w dos sistemas de plantio convencional e direto em sucessão a pousio. Não houve correlação significativa ($p > 0,05$) entre a_w e contagem de *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. e concentração de fumonisinas. Almeida et al. (2002) ⁽²⁸⁾, analisando 90 amostras de milho de duas regiões do Estado de São Paulo (Capão Bonito e Ribeirão Preto), encontraram influência de a_w sobre a prevalência de *F. verticillioides*, com uma correlação negativa ($p < 0,0006$; $r = 0,44$) entre os valores de ocorrência de *F. verticillioides* e a_w em grãos de milho de Capão Bonito.

Na Tabela 3 estão apresentadas as concentrações médias de fumonisinas em milho cultivado sob sistema de plantio direto e convencional em sucessão a aveia e pousio em diferentes doses de ureia como fonte de nitrogênio.

Tabela 2. Concentrações de fumonisinas e atividade de água (a_w) de milho cultivado sob diferentes sistemas de plantio e sucessão de cultura (safra 2008) no norte do Paraná (n = 60).

SP e SC	n	FBT ($\mu\text{g/g}$)		Atividade de Água (a_w)	
		Média*	Faixa	Média*	Faixa
CA	15	2,03 ^a	1,61-2,62	0,61 ^{ab}	0,50-0,68
CP	15	2,43 ^a	0,26-3,84	0,58 ^b	0,51-0,62
DA	15	2,32 ^a	0,95-3,72	0,63 ^a	0,57-0,67
DP	15	1,75 ^a	0,38-3,71	0,56 ^b	0,50-0,62

* Médias seguidas das mesmas letras não apresentam diferença significativa pelo Teste de Tukey ($p > 0,05$)

SP e SC = Sistema de plantio e sucessão e culturas; FBT = fumonisinas totais ($\text{FB}_1 + \text{FB}_2$); n = número de amostras; CA – plantio convencional em sucessão a aveia no inverno; CP – plantio convencional em sucessão a pousio no inverno; DA – plantio direto em sucessão a aveia no inverno; DP – plantio direto em sucessão a pousio no inverno

Tabela 3. Concentrações médias de fumonisinas em milho cultivado sob sistema de plantio direto e convencional em sucessão a aveia e pousio em diferentes doses de ureia.

Tratamento	Nitrogênio total Kg/ha	FB_1 ($\mu\text{g/g}$)	FB_2 ($\mu\text{g/g}$)	FBT* ($\mu\text{g/g}$)
1	0	1,37	0,90	2,27 ^a
2	22,5	1,51	1,16	2,67 ^a
3	45,0	1,22	0,74	1,96 ^a
4	67,5	0,85	0,64	1,49 ^a
5	90,0	1,36	0,91	2,28 ^a

* Médias seguidas das mesmas letras não apresentam diferença significativa pelo Teste de Tukey ($p > 0,05$)
FBT = fumonisinas totais ($\text{FB}_1 + \text{FB}_2$)

A menor concentração média de fumonisinas (1,49 $\mu\text{g/g}$) foi detectada em milho cultivado na parcela que recebeu 67,5 Kg/ha de nitrogênio, porém não houve diferença significativa com os demais tratamentos pelo Teste de Tukey ($p > 0,05$).

Blandino, Reyneri e Vanara (2008) ⁽²²⁾ avaliaram a influência de diferentes doses (100, 200, 300 e 400 Kg/ha) e fontes de nitrogênio (ureia e fertilizante de liberação lenta) na ocorrência de micotoxinas em safras de milho de 2000, 2001 e 2002 na Itália. Os resultados demonstraram que mais de 80% da contaminação por fumonisinas ocorreu em situações de estresse devido à deficiência de nitrogênio, aumentando significativamente a contaminação por FB_1 em milho. Entretanto, doses muito elevadas de fertilizante nitrogenado também favoreceram a contaminação por fumonisinas.

Hassegawa et al. (2008) ⁽¹¹⁾ analisaram amostras de milho recém-colhido (n = 144) do município de Piracicaba, Estado de São Paulo, e avaliaram os efeitos de doses de ureia como fonte de nitrogênio (0, 50 e 100 kg/ha) e detectaram, exceto para um tratamento, que um aumento na concentração de nitrogênio resultou na redução dos níveis de FB_1 .

No Brasil, a dose recomendada de nitrogênio para ser aplicada durante a semeadura de milho para se obter o melhor rendimento é na faixa de 60 – 120 kg/ha ⁽³²⁾. Assim, uma aplicação balanceada de fertilizante nitrogenado, aliada a outras técnicas de cultura capazes de impedir o desenvolvimento de *Fusarium* spp. constituem-se soluções para prevenir a contaminação de milho por fumonisinas ⁽²²⁾. Os resultados desse estudo evidenciam a importância das práticas agrícolas, assim como do fornecimento de doses adequadas de nutrientes para a cultura do milho, a fim de minimizar a contaminação de grãos por fumonisinas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq, Fundação Araucária, PPSUS/ Ministério da Saúde, Fundo Paraná/ SETI e CAPES pelo apoio financeiro e ao CNPq pela concessão de bolsa produtividade a E.Y.S. Ono e E.Y. Hirooka. À CAPES pela concessão de bolsa de Doutorado a A. M. Omori, J. G. Bordini, M. T. Hirozawa e bolsa de Mestrado a Luciana Von Hohendorff Ferreira. Ao Prof. Dr. Martin Homechin (“in memoriam”) pelo fornecimento das amostras de milho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Brazilian Crop Assessment: grain. Brazilian Harvest of Grains, Second Survey. National Supply Company. Brasília: Conab, 2009.
2. Miller JD. Epidemiology of *Fusarium* ear disease of cereals. In. Mycotoxins in grain: compounds other than aflatoxin. Eds., J. D. Miller, H. L. Trenholm. United States: Eagan® Press, 59-257, 1994.
3. Thiel PG, Marasas WFO, Sydenham EW, Shephard GS, Gelderblom WCA, Nieuwenhuis JJ. Survey of fumonisin production by *Fusarium* species. Appl Environ Microbiol, 57 (4): 1089-1093, 1991.
4. Rheeder JP, Marasas WFO, Vismer HF. Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species. Appl Environ Microbiol, 68: 2101-2105, 2002.
5. Wang J, Zhou Y, Liu W, Zhu X, Du L, Wang Q. Fumonisin level in corn-based food and feed from Linxian County, a high-risk area for esophageal cancer in China. Food Chem, 106: 241-246, 2008.
6. Shetty PH, Bhat RV. Sensitive method for the detection of fumonisin B₁ in human urine. J Chromatogr B, 705: 171-173, 1998.
7. Bennett JW, Klich M. Mycotoxins. Clin Microbiol Rev, 16: 497-516, 2003.
8. Kumar V, Basu, MS, Rajendran TP. Mycotoxin research and mycoflora in some commercially important agricultural commodities. Crop Prot, 27: 891-905, 2008.
9. International Agency for Research on Cancer - IARC. Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks of Chemical to Humans. Some naturally occurring substances. Food Items and Constituents. Heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. Monographs Vol. 56. Lyon: IARC: 359-362, 1993.
10. Bittencourt ABF, Oliveira CAF, Dilkin P, Corrêa B. Mycotoxin occurrence in corn meal and flour traded in São Paulo, Brazil. Food Control, 16: 117-120, 2005.
11. Hasegawa RH, Fonseca H, Fancelli AL, Silva VN, 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.

12. Moreno EC, Garcia GT, Ono MA, Vizoni E, Kawamura O, Hirooka EY, Ono EYS. Co-occurrence of mycotoxins in corn samples from the Northern region of Paraná State, Brazil. *Food Chem*, 116: 220-226, 2009.
13. Hirooka EY, Yamaguchi MM, Aoyama S, Sugiura Y, Ueno Y. The natural occurrence of fumonisin in Brazilian corn kernels. *Food Addit Contam*, 13: 173-183, 1996.
14. Ono EYS, Fungaro MHP, Sofia SH, Figueira ELZ, Gerage AC, Ichinoe M, Sugiura Y, Ueno Y, Hirooka EY. Trends of fumonisin contamination and animal intoxication through monitoring 1991 to 1997 corn crop in the State of Paraná, Brazil. *Mycopathologia*, 158: 451-455, 2004.
15. Ono EYS, Biazon L, Silva M, Vizoni E, Sugiura Y, Ueno Y, Hirooka EY. Fumonisin in corn: Correlation with *Fusarium* sp. count, damaged kernels, protein and lipid content. *Braz Arch Biol Technol*, 49: 63-71, 2006.
16. Silva M, Garcia GT, Vizoni E, Kawamura O, Hirooka EY, Ono EYS. Effect of the time interval from harvesting to the pre-drying step on natural fumonisin contamination in freshly harvested corn from the State of Paraná, Brazil. *Food Addit Contam*, 25 (5): 642-649, 2008.
17. Rothrock CS. Tillage systems and plant disease. *Soil Sci*, 154: 308-315, 1992.
18. Beare MH, Hu S, Coleman DC, Hendrix PF. Influences of mycelial fungi on soil aggregation and organic matter storage in conventional and no-tillage soils. *Appl Soil Ecol*, 5: 211-219, 1997.
19. Oliveira FHT, Novais RF, Alvarez VH, Cantarutti RB, Barros NF. Fertilidade do solo no sistema plantio direto. *R Bras Ci Solo*, 2: 393-486, 2002.
20. Drury CF, Yang XM, Reynolds WD, TAN CS. Influence of crop rotation and aggregate size on carbon dioxide production and denitrification. *Soil Tillage Res*, 79: 87-100, 2004.
21. Muzilli O. Manejo da fertilidade do solo. In: Instituto Agrônômico do Paraná. Plantio direto no Estado do Paraná. Londrina: IAPAR, 23: 43-58, 1981.
22. Blandino M, Reyneri A, Vanara F. Influence of nitrogen fertilization on mycotoxin contamination of maize kernels. *Crop Prot*, 27: 222-230, 2008.
23. Nelson PE, Tousson TA, Marasas WFO. *Fusarium* species – An illustrated manual for identification. Pennsylvania: Pennsylvania State University Press, 1983.
24. 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.

25. Samson RA, Reenen-Hoeskstra ES, Frisvad JC, Filtenborg O. Introduction to food-borne fungi. 4 ed. The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 1995.
26. 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.
27. 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.
28. Almeida PA, Fonseca H, Fancelli AL, Direito GM, Ortega EM, Corrêa B. Mycoflora and fumonisin contamination in Brazilian corn from sowing to harvest. *J Agric Food Chem*, 50 (13): 3877–3882, 2002.
29. Marín S, Sanchis V, Magan N. Water activity, temperature, and pH effects on growth of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* isolates from maize. *Can J Microbiol*, 41: 1063-1070, 1995.
30. Moreno EC. Microbiota fúngica e micotoxinas em milho cultivado sob diferentes práticas de manejo. 2008. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.
31. Abbas HK, Cartwright RD, Xie W, Shier WT. Aflatoxin and fumonisin contamination of corn (maize, *Zea mays*) hybrids in Arkansas. *Crop Prot*, 25 (1): 1-9, 2006.
32. Coelho AM, França GE, Pitta GVE, Alves VMC, Hernani LC. Cultivo do milho – Nutrição e Adubação. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Comunicado Técnico 44, Minas Gerais, Brasil: Embrapa, Sete Lagoas, 2002.