



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ELAINE CUNHA MORENO

**MICROBIOTA FÚNGICA E MICOTOXINAS EM MILHO
CULTIVADO SOB DIFERENTES PRÁTICAS DE MANEJO**

Londrina
2008

ELAINE CUNHA MORENO

**MICROBIOTA FÚNGICA E MICOTOXINAS EM MILHO
CULTIVADO SOB DIFERENTES PRÁTICAS DE MANEJO**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, com requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profª. Dra. Elisabete Yurie Sataque Ono

Londrina
2008

Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

M843m Moreno, Elaine Cunha.
Microbiota fúngica e micotoxinas em milho cultivado sob diferentes práticas de manejo / Elaine Cunha Moreno. – Londrina, 2008.
97 f. : il.

Orientador: Elisabete Yurie Sataque Ono.
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2008.
Inclui bibliografia.

1. Milho – Fungos toxigênicos – Teses. 2. Solos – Manejo – Teses. 3. Milho– Cultivo – Teses. 4. Fumonisinias – Teses. 5. Aflatoxinas – Teses. I. Ono, Elisabete Yurie Sataque. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título.

CDU 641:579

ELAINE CUNHA MORENO

**MICROBIOTA FÚNGICA E MICOTOXINAS EM MILHO CULTIVADO
SOB DIFERENTES PRÁTICAS DE MANEJO**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, com requisito para obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Elisabete Yurie Sataque Ono
UEL – Londrina - PR

Prof. Dr. Martin Homechin
UEL – Londrina - PR

Prof. Dr. Hideaki Wilson Takahashi
UEL – Londrina - PR

Londrina, 29 de fevereiro de 2008.

MORENO, Elaine Cunha. **Microbiota fúngica e micotoxinas em milho cultivado sob diferentes práticas de manejo**. 2008. 97 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2008.

RESUMO

O milho (*Zea mays* L.) é um dos cereais mais tradicionais cultivados no mundo todo e de grande importância econômica e social, fazendo parte da alimentação básica, sendo incluído em mais de 500 produtos e derivados. A contaminação do milho por fungos e micotoxinas reduz a qualidade do produto e representa riscos à saúde humana e animal. O sistema de plantio, sucessão de culturas e o constante monitoramento da cadeia produtiva do milho constituem estratégias para o controle fitossanitário da cultura. Este trabalho teve como objetivo avaliar a co-ocorrência natural de fumonisinas e aflatoxinas em 300 amostras de milho recém-colhido (safras 2003 e 2004) da Região Norte do Paraná, assim como avaliar a contaminação fúngica e os níveis de fumonisinas em milho cultivado sob diferentes sistemas de plantio e sucessão de culturas (aveia e pousio), no período de inverno de duas safras consecutivas, em diferentes dosagens de nitrogênio (N) (0; 22,5; 45,0; 90,0 Kg.ha⁻¹) e em combinação com óxido de potássio (K₂O) (90,0 N + 13,2 K₂O Kg.ha⁻¹). Com o intuito de avaliar a co-ocorrência natural por fumonisinas e aflatoxinas a amostragem foi realizada em três pontos da cadeia produtiva de empresas processadoras de milho, i.e., no campo (n=20), na recepção (n=70) e na pré-secagem (n=60) para cada safra. A contagem de *Fusarium* spp., o qual apresentou a maior contaminação em relação aos demais gêneros fúngicos, situou-se na faixa de 10² a 10⁵ UFC.g⁻¹ em todos os pontos da cadeia produtiva da safra de 2003, assim como para as amostras da recepção na safra de 2004, enquanto que nas amostras de campo da safra de 2004 situou-se na faixa de 10³ a 10⁴ UFC.g⁻¹. Na safra de 2003, as fumonisinas foram detectadas em 100% das amostras, enquanto as aflatoxinas em 12%. Os níveis de fumonisinas variaram de 0,11 a 15,32 µg.g⁻¹ (média 2,84 µg.g⁻¹) em amostras de campo, de 0,08 a 8,96 µg.g⁻¹ (média 2,46 µg.g⁻¹) e de 0,11 a 18,78 µg.g⁻¹ (média 2,96 µg.g⁻¹) em amostras da recepção e pré-secagem, respectivamente. As aflatoxinas foram detectadas em níveis variando de 5 a 54 ng.g⁻¹ (média 21,14 ng.g⁻¹) em amostras da recepção (n=7), de 10 a 56 ng.g⁻¹ (média 23,4 ng.g⁻¹) nas de pré-secagem (n=10) e em apenas uma amostra do campo (45 ng.g⁻¹). Por outro lado, na safra de 2004, as fumonisinas foram detectadas em 97% e as aflatoxinas em 4% das amostras. Os níveis de fumonisinas variaram de 0,37 a 1,89 µg.g⁻¹ (média 0,94 µg.g⁻¹) em amostras de campo, de 0,07 a 18,16 µg.g⁻¹ (média 1,41 µg.g⁻¹) e de 0,06 a 6,28 µg.g⁻¹ (média 1,36 µg.g⁻¹) em amostras da recepção e pré-secagem, respectivamente. As aflatoxinas foram detectadas em 5 amostras da pré-secagem com níveis variando de 12 a 52 ng.g⁻¹ (média 35,2 ng.g⁻¹) e em apenas uma amostra da recepção (40 ng.g⁻¹). Em relação ao milho cultivado sob diferentes sistemas de plantio, a contagem de *Fusarium* spp. apresentou variação de 1,0 × 10² a 1,5 × 10⁴ UFC.g⁻¹, no milho cultivado sob sistema de plantio direto em sucessão a pousio (safra 2006), enquanto que nos demais sistemas de plantio a contagem desse gênero situou-se na faixa de 10² a 10⁵ UFC.g⁻¹. Por outro lado, na safra de 2007 *Fusarium* spp. foi detectado em 100% das amostras com a contagem variando de 10⁴ a 10⁵ UFC.g⁻¹. Em ambas as safras a contaminação por fumonisinas foi maior no sistema de plantio direto em sucessão a aveia em com médias de 6,97 µg.g⁻¹ (safra 2006) e 6,29 µg.g⁻¹ (safra 2007). As amostras de milho (safra 2006) tratadas com 22,5 kg.ha⁻¹ de nitrogênio em cobertura apresentaram maior contaminação por fumonisinas (6,59 µg.g⁻¹), diferindo significativamente pelo teste de Duncan (p<0,05) daquelas tratadas com 45,0 e 90,0 kg.ha⁻¹ de nitrogênio. No entanto, no

plântio convencional em sucessão a pousio, as amostras tratadas com 90,0 kg.ha⁻¹ de nitrogênio suplementada com K₂O apresentou maior contaminação por fumonisinas. Os resultados obtidos nesse trabalho ratificam a importância do emprego do sistema de manejo adequado e do constante monitoramento da cadeia produtiva do milho para garantir a qualidade e a segurança dos produtos e minimizar os riscos à saúde humana e animal.

Palavras-chave: Milho. Fumonisinas. Aflatoxinas. Cadeia produtiva do milho. Sistema de plântio. Sucessão de culturas.

MORENO, Elaine Cunha. **Fungal flora and mycotoxins in corn cultivated under different management practices**. 2008. 97 f. Dissertation (Master's degree in Biotechnology) – State University of Londrina, Londrina. 2008.

ABSTRACT

Corn (*Zea mays* L.) is one of the most traditional cereal crops worldwide and the social and economic importance as an essential dietary staple is evident by its inclusion in more than 500 cereal based products. The corn contamination by fungi and mycotoxins reduces the product quality and it represents risks to human and animal health. The soil management systems culture succession and the constant monitoring of corn producing chain are strategies for corn fitossanitary control. The aim of this study was to evaluate the natural co-occurrence of fumonisinas and aflatoxins in 300 freshly harvested corn samples (2003 and 2004 crops) from the Northern region of Paraná State, as well as to evaluate the fungi contamination and the fumonisins levels in corn cultivated under different management systems and culture succession to oat and fallow soil, in the winter secession in to crops (2006 and 2007). In addition, the effect of different side dressing nitrogen rates (N) (0; 22.5; 45.0; 90.0 Kg.ha⁻¹) and in combination with potassium oxide (K₂O) (90.0 N + 13.2 K₂O Kg.ha⁻¹) on fungi contamination and fumonisin levels (2006 crop) was evaluated. In order to evaluate the natural co-occurrence for fumonisins and aflatoxins, the sampling was carried out at the three points of the corn producing chain from corn industries processing, i.e., at the field (n=20), the reception (n=70) and pre-drying step (n=60) for each crop. The *Fusarium* sp. count, which showed the highest contamination in relation to other fungi genera, ranged from 10² to 10⁵ CFU.g⁻¹ in sample from the three points of corn producing chain (2003 crop), as well as, for sample (2004 crop), while in field samples (2004 crop) it ranged from 10³ to 10⁴ CFU.g⁻¹. In 2003 crop, fumonisins were detected in 100% samples, whereas the aflatoxins in 12%. Fumonisin levels ranged from 0.11 to 15.32 µg.g⁻¹ (mean 2.84 µg.g⁻¹) in field samples, from 0.08 to 8.96 µg.g⁻¹ (mean 2.46 µg.g⁻¹) and from 0.11 to 18.78 µg.g⁻¹ (mean 2.96 µg.g⁻¹) in reception and pre-drying samples, respectively. Aflatoxins were detected in levels ranging from 5 to 54 ng.g⁻¹ (mean 21.14 ng.g⁻¹) in reception samples (n=7), from 10 to 56 ng.g⁻¹ (mean 23.4 ng.g⁻¹) in the pre-drying (n=10) and only in one field sample (45 ng.g⁻¹). On the other hand, in 2004 crop fumonisins were detected in 97% and aflatoxins in 4% samples. Fumonisin levels ranged from 0.37 to 1.89 µg.g⁻¹ (mean 0.94 µg.g⁻¹) in field samples, from 0.07 to 18.16 µg.g⁻¹ (mean 1.41 µg.g⁻¹) and from 0.06 to 6.28 µg.g⁻¹ (mean 1.36 µg.g⁻¹) in reception and pre-drying samples, respectively. Aflatoxins were detected in 5 pre-drying samples with levels ranging from 12 to 52 ng.g⁻¹ (mean 35.2 ng.g⁻¹) and in only one reception sample (40 ng.g⁻¹). Regarding the corn cultivated under different soil management systems, *Fusarium* sp. count ranged from 1.0 × 10² to 1.5 × 10⁴ CFU.g⁻¹, in no tillage corn in succession to fallow soil (crop 2006), whereas in other soil management systems the count of this genera ranged from 10² to 10⁵ CFU.g⁻¹. On the other hand, in 2007 crop *Fusarium* sp. was detected in 100% samples, ranging from 10⁴ to 10⁵ CFU.g⁻¹. In both crops, the highest fumonisin levels were detected in no tillage corn in succession to oat with means of 6.97 µg.g⁻¹ (crop 2006) and 6.29 µg.g⁻¹ (crop 2007). Corn samples (crop 2006) with 22.5 kg.ha⁻¹ side-dressing nitrogen application showed the highest fumonisin levels (6.59 µg.g⁻¹) and differed significantly by the Duncan test (p<0,05) from those with 45.0 and 90.0 kg.ha⁻¹ side-dressing nitrogen application. Nevertheless, the conventional tillage corn in succession to fallow soil, samples with 90.0 kg.ha⁻¹ nitrogen supplementation with K₂O showed the highest fumonisin levels. These results ratify the importance of the appropriate soil management and constant

monitoring of corn producing chain in order to assure the quality and safety of the potential hazard to human and animal health.

Keywords: Corn. Fumonisin. Aflatoxin. Corn productive chain. Soil management systems. Succession of cultures.

DEDICO

À DEUS, que sempre esteve ao meu lado durante esta fase de minha vida me ajudando a superar os problemas e as dificuldades, agradeço a ele também por me dar forças e permitir a crescer profissionalmente e espiritualmente.

OFEREÇO

Aos meus pais que tanto amo, Sebastião Aparecido Moreno e Maria Helena Cunha Moreno que apesar da distância, sempre estiveram do meu lado e trabalharam incansavelmente para que eu pudesse concluir mais esta etapa de minha vida. Há vocês deixo a minha imensa gratidão.

AGRADECIMENTOS

A professora Dra. Elisabete Yurie Sataque Ono, pela orientação, incentivo, dedicação, amizade, disposição em me explicar e me ajudar nas minhas dificuldades e acima de tudo pela confiança em mim depositada durante todo o meu período no Depto. de Bioquímica e Biotecnologia.

A Universidade Estadual de Londrina, aos professores do Depto. Bioquímica e Biotecnologia e aos professores do programa de Mestrado em Biotecnologia pela oportunidade, confiança e pelos valiosos ensinamentos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa.

A Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) pelo apoio financeiro.

As Cooperativas: Integrada, Caramuru e Kowalski pelo fornecimento de amostras e pelo apoio financeiro.

A Agência de Desenvolvimento Tecnológico de Londrina e Região (ADETEC) pela coordenação administrativa do projeto.

A professora Dra. Elisa Yoko Hirooka, pela orientação, confiança, exemplo e disponibilização de equipamentos e reagentes de seu laboratório. Deixo aqui minha imensa gratidão.

A professora Dra. Maria Victória Eiras Grossmann pela confiança, apoio e colaboração.

Ao professor Dr. Martin Homechin, pela disponibilidade das amostras, dicas e acima de tudo pelo precioso ensinamento.

Ao professor Édio Vizoni pela importante colaboração com as análises estatísticas na conclusão deste trabalho.

Ao professor Dr. Hideaki Wilson Takahashi pela disponibilidade de material, dicas e sugestões nos resultados deste trabalho.

A professora Dra. Adriana Lourenço Soares Russo pela disponibilização, dicas e ajuda nas técnicas experimentais de fundamental importância na conclusão deste trabalho.

Ao técnico do depto. de Bioquímica e Biotecnologia Nelson Janeiro Rodriguez pela paciência, compreensão, auxílio nas análises laboratoriais e acima de tudo pela amizade.

Aos funcionários do depto. de Bioquímica e Biotecnologia pelo apoio, ajuda, carinho e principalmente pela amizade.

Aos funcionários do depto. de Ciência e Tecnologia de Alimentos pelo apoio nas cotações e disposição dos equipamentos utilizados na conclusão deste trabalho.

Aos amigos Marcelo da Silva, Jurandir Pereira Pinto e a Elza Youssef pelo importante e fundamental ensinamento em cromatografia líquida de alta eficiência.

As amigas e estagiárias: Luana Neves Vanelli, Carolina Nachi Rossi e Jaqueline Gozzi Bordini, pela agradável convivência, colaboração fundamental nas análises experimentais e pela dedicação no desenvolvimento prático deste trabalho.

A amiga Virgínia Carla de Almeida Falcão, pela amizade, pelos bons momentos, pela descontração em horas difíceis e pelas muitas vezes que me fez companhia no laboratório.

Aos amigos de laboratório Lucas Freitas de Freitas, Isabela Guarnier Domiciano, Alexandre Tadachi Morey, Daniel Marchetti Maroneze, Maria Clara Trofino Ohe, Adriana Pereira da Silva, Paula Garcia Meirelles, Luciana Pereira Bernd, Luciana

Hayashi, Aniê Ieda Francabandeira, Patrícia Sambatti, Elisabete Hiromi Hashimoto, Simone Fujii e Joice Sifuentes dos Santos pela amizade, companheirismo e colaboração de maneiras diferentes na concretização deste trabalho.

Aos colegas Alexandre Takahashi e Amália F. Pintar do depto. de Agronomia, pela colaboração e dicas na área agronômica.

Aos amigos do curso de Biotecnologia pela amizade, companheirismo nos momentos difíceis e pelos momentos de descontração.

Ao Otavio Jacon Basílio pelo carinho, compreensão e incentivo prestado durante todo o período do curso.

E finalmente a todos que contribuíram de forma direta e indireta para a conclusão deste trabalho a minha imensa gratidão.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Análogos de fumonisinas.....	24
Tabela 2 – Legislação para aflatoxinas.....	27
Tabela 3 – Diferenças entre os sistemas de plantio direto e convencional.....	31
Tabela 4 – Níveis de adubação, sistemas de plantio e cultivo de inverno.....	40

Artigo A

Tabela 1 – Frequência absoluta e relativa dos principais gêneros fúngicos em grãos de milho recém-colhido da Região Norte do Estado do Paraná (Safrá 2003 e 2004)	60
Tabela 2 – Contagem de bolores e leveduras de amostras de milho da Região Norte do Paraná (Safrá 2003 e 2004)	61
Tabela 3 – Contaminação de fumonisinas e aflatoxinas em 300 amostras de milho da Região Norte do Paraná (Safrá 2003 e 2004)	62
Tabela 4 – Dados climatológicos e medias de fumonisinas em amostras de milho em três municípios da região Norte do Paraná.....	63

Artigo B

Table 1 – <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp, <i>Aspergillus</i> sp. and total mould and yeast count in corn produced 2006 and 2007 under different soil management systems and culture succession in the Northern region of Paraná State.....	73
Table 2 – Fumonisin levels and protein content in corn grown under different soil management system and culture succession (2006 and 2007 crops).....	75
Table 3 – Effect of side-dressing N rates on fumonisin contamination and protein content in no tillage and tillage corn in succession to oat or fallow soil (2006 crop)	76

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura básica das fumonisinas	22
Figura 2 – Fumonisinas de maior ocorrência em produtos agrícolas	23
Figura 3 – Estrutura das principais aflatoxinas.....	26
Figura 4 – Fluorescência e intensidade das aflatoxinas.....	27
Figura 5 – Sistema de plantio e sucessão de culturas	39
Figura 6 – Fluxograma da amostragem	41
Figura 7 – Determinação de nitrogênio	43
Figura 8 – Contagem de bolores e leveduras.....	44
Figura 9 – Extração de fumonisinas	46
Figura 10 – Determinação de fumonisinas	47
Figura 11 – Extração de aflatoxinas	49
Figura 12 – Determinação de aflatoxinas	50
 Artigo B	
 Figure1 – Map of Paraná State, Brazil, showing Londrina municipality, the location of the experimental site	70
Figure 2 – Relative frequency of main fungal genera in 72 freshly harvested corn samples belonging to 2006 (n=60) and 2007 crops (n=12) from the Northern region of Paraná State.....	72
Figure 3 – Correlation between side-dressing Nitrogen rates and protein content in corn samples (n=60) from the Northern region of Paraná State (2006 crop)	77
Figure 4 – Correlation between fumonisin levels (FB ₁ + FB ₂) and protein content in 60 freshly harvested corn samples from the Northern region of Paraná State (2006 crop)	77
Figure 5 – Correlation between side-dressing Nitrogen rates and fumonisin levels (FB ₁ + FB ₂) in corn samples (n=60) from the Northern region of Paraná State (2006 crop)	78

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1	MILHO	17
2.2	FUNGOS TOXIGÊNICOS E MICOTOXINAS	18
2.3	FUMONISINAS	21
2.4	AFLATOXINAS	25
2.5	OCORRÊNCIA NATURAL DE FUMONISINAS E AFLATOXINAS	28
2.6	SISTEMAS DE PLANTIO	29
2.7	ROTAÇÃO DE CULTURAS	34
3	OBJETIVOS	37
3.1	OBJETIVOS GERAIS	37
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
4	MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1	AMOSTRAS DE MILHO	38
4.1.1	Sistema de Plantio e Sucessão de Culturas	38
4.1.2	Co-ocorrência de Aflatoxinas e Fumonisinas	41
4.2	DETERMINAÇÃO DE PONTOS DE FLUORESCÊNCIA	42
4.3	DETERMINAÇÃO DE NITROGÊNIO	42
4.4	AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA FÚNGICA	43
4.5	EXTRAÇÃO DE FUMONISINAS	45
4.6	DETERMINAÇÃO DE FUMONISINAS	47
4.7	EXTRAÇÃO DE AFLATOXINAS	48
4.8	DETERMINAÇÃO DE AFLATOXINAS	49
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	50
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51

ARTIGO A – CO-OCORRÊNCIA NATURAL DE FUMONISINAS E AFLATOXINAS EM AMOSTRAS DE MILHO DA REGIÃO NORTE DO PARANÁ	52
ARTIGO B – EFFECT OF DIFFERENT SOIL MANAGEMENT SYSTEMS ON NATURAL FUNGAL CONTAMINATION AND FUMONISIN LEVELS IN CORN	67
REFERENCIAS	83
ANEXOS	95
ANEXO A – Croqui da área experimental da Fazenda escola -UEL, 1 = 0 kg.ha ⁻¹ DNC; 2 = 22,5 kg.ha ⁻¹ DNC; 3 = 45,0 kg.ha ⁻¹ DNC; 4 = 90,0 kg.ha ⁻¹ DNC; 5 = K ⁺ + 90,0 kg.ha ⁻¹ DNC (Safrá 2006)	96
ANEXO B – Croqui da área experimental da Fazenda escola –UEL (Safrá 2007)	97

1 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é um dos principais e mais tradicionais cereais em cultivo no Brasil. O Brasil é considerado o terceiro maior produtor mundial de milho, superado apenas pelos Estados Unidos e China. No país a área semeada é cerca de 13 milhões de hectares, com produção aproximada de 42,5 milhões de toneladas e, produtividade de 3.279 Kg.ha⁻¹. Dentre os estados o Paraná é o maior produtor nacional com área de 2,5 milhões de hectares, produção de 11,2 milhões de toneladas e uma produtividade de 4.485 Kg.ha⁻¹ (CONAB, 2007). Ocupa de modo crescente posições significativas na produção agropecuária, sendo utilizado na alimentação animal “in natura”, silagem e farelos. Na alimentação humana, na forma de amido, farinhas, óleo, dentre outros. Seu cultivo apresenta características e vantagens as quais justificam sua ampla distribuição, dentre elas a composição e valor nutritivo, elevada produção por unidade de área, perdas reduzidas de grãos devido ao ataque de pássaros, chuvas, período longo de colheita e possibilidade de armazenamento (JONES, 1985).

Quando, comparado a outras espécies cultivadas, apresenta avanços significativos em diferentes áreas do conhecimento agrônomo, ou áreas afins como ecologia e etnobiologia, conferindo melhor compreensão de sua relação com o homem e o meio. Estas interações são fundamentais quanto ao comportamento da planta, quando submetida a estímulos e ações negativas da atuação de agentes bióticos e abióticos no sistema produtivo (FANCELLI; NETO, 2000).

O milho está sujeito a ação de fungos fitopatogênicos, responsáveis por perdas da qualidade sanitária, física e nutricional dos grãos. Dentre eles destacam-se os gêneros *Fusarium* spp. e *Aspergillus* spp. produtores de metabólitos secundários tóxicos, responsáveis por elevados prejuízos econômicos e riscos a saúde humana e animal (MUNKVOLD; DESJARDINS, 1997; MILLER, 1995).

Considerando a ocorrência de elevados percentuais de contaminação de milho por fungos toxigênicos e micotoxinas, se faz necessário a busca por alternativas que garantam a produtividade e qualidade do produto. Dentre estas alternativas o emprego de práticas agrícola adequadas e o constante monitoramento da cadeia produtiva do milho são fundamentais quando se busca minimizar os riscos à saúde humana e animal

O sistema de plantio direto (SPD) vem se consolidando como uma das práticas eficazes para melhorar a sustentabilidade dos recursos naturais na agricultura

(OLIVEIRA et al., 2002). Nesse sistema o solo não é revolvido, mas protegido por resíduos vegetais de culturas anteriores (ALMEIDA, 1981; MUZILLI, 1981a; YOKOYAMA; SILVEIRA; STONE, 2002), onde as sementes são colocadas em sulcos ou covas com largura e profundidade adequada para sua cobertura e contato com o solo (MUZILLI, 1981a). O seu emprego em substituição ao sistema de plantio convencional (SPC) apresenta vantagens como eliminação de operações de gradagem, aração, escarificação (MUZILLI, 1981a), aumento da fertilidade do solo, redução do uso de fertilizantes (MUZILLI, 1981b) e das perdas por erosão (MONDARDO; BISCAIA, 1981). Também favorece ao aumento da diversidade da biota do solo conferida pela proteção dos resíduos vegetais. Dentro eles os microrganismos patogênicos que podem estar presentes e causam prejuízos à planta e, conseqüentemente ao homem e animal.

No sistema convencional de preparo do solo com a aração em profundidade média de 20 cm, ocorre a incorporação mais uniforme dos resíduos e homogeneidade na distribuição da população microbiana na camada arável (CATTELAN; VIDOR, 1990).

Além das práticas agrícolas para cultivo adequado, boas práticas na pré-colheita, colheita, manuseio, transporte e armazenamento, são fatores de extrema importância no controle de qualidade dos grãos (FONSECA, 2000).

Considerando o potencial do Estado do Paraná como um dos maiores produtores nacional de milho é de fundamental importância buscar alternativas que minimizem a contaminação por fungos e reduzam os níveis de micotoxinas com emprego de diferentes práticas de manejo, e monitoramento da cadeia produtiva do milho buscando atender às exigências dos mercados interno e externo no sentido de reduzir os riscos à saúde pública e animal.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MILHO

O milho (*Zea mays* L.) é um dos mais tradicionais cereais cultivados no mundo, desempenha importante papel econômico e social no país. Há muitos séculos, tem sido utilizado na alimentação humana e animal e considerado como matéria-prima indispensável para impulsionar diferentes complexos agroindustriais (FANCELLI; NETO, 2000), e gerar empregos no setor primário.

O Brasil é o 3º maior produtor mundial de milho com 4,97% da produção, superado apenas pelos Estados Unidos e China que respondem com 40,2% e 19,2% da produção, respectivamente. Dados preliminares da safra de 2005/2006 e as previsões para a safra de 2006/2007, mostram aumento da produção brasileira de milho ao redor de 31,3% (safra 2005/2006) e de 42,3% para a safra de 2006/2007, comparada às safras anteriores. Dados da CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento) no período entre 1993 até 2006 comprovam os rendimentos da cultura para o país, mostrando um aumento na produtividade de 930 Kg.ha⁻¹ e na produção de 13 milhões de toneladas. O Estado do Paraná é o maior produtor, sendo responsável por 24,4% da produção nacional.

A produtividade do milho pode ser correlacionada com a disponibilidade de nitrogênio. É uma cultura exigente desse elemento e a sua falta leva a deficiência nas folhas, redução do tamanho das espigas e espessura dos colmos, levando ao quebraamento da planta (MUZILLI, 1981b). A baixa produtividade e qualidade dos grãos podem estar relacionadas com a contaminação por microrganismos, condições climáticas e às práticas agrícolas inadequadas (PEREIRA, 1995). As práticas agrícolas podem influenciar na incidência e severidade das doenças do milho. Diferenças quanto às exigências nutricionais da cultura, tipo de cobertura do solo e os restos culturais são fatores que favorecem a população de patógeno antes da semeadura do milho (NAZARENO, 1981).

O teor de nutrientes em grãos pode conferir característica de substrato ideal, para o desenvolvimento de microrganismos, incluindo os fungos toxigênicos principalmente sob condições climáticas favoráveis, o que possibilita a síntese de metabólitos secundários tóxicos (PEDROSA; DEZEN, 1991).

A contaminação pode ocorrer na formação, colheita, transporte e armazenamento dos grãos e a identificação das espécies fúngicas importante indicador da presença de micotoxinas (POZZI, 1993). Entretanto, Ranjan e Sinha (1991), afirmaram que o isolamento e a identificação desses fungos nem sempre está ligada à detecção de micotoxinas nos grãos devido a existência de cepas dentro da mesma espécie, com capacidade ou não de sintetizar micotoxinas.

2.2 FUNGOS TOXIGÊNICOS E MICOTOXINAS

Os fungos são microrganismos heterotróficos, encontrados em plantas, solo e ampla variedade de substratos (SINHA; SINHA, 1991). Cerca de 100.000 fungos tem sido identificados, e destes mais de 400 são potencialmente tóxicos, produtores de compostos ou classes de compostos que causam perdas econômicas e riscos à saúde humana e animal no mundo (DE KOE, 1993).

Convencionalmente divide-se em fungos de campo e de armazenamento. Como de campo tem-se os dos gêneros *Fusarium* spp., *Cephalosporium* spp., *Giberella* spp., *Helminthosporium* spp., *Alternaria* spp. e *Cladosporium* spp. e que requerem elevado teor de umidade (20–21%). Dentre os de estocagem ou armazenamento estão o *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Rhizopus* spp. e *Mucor* spp. os quais colonizam os grãos após a colheita, durante a secagem e estocagem e, sobrevivem sob baixas condições de umidade (16 – 18%) e baixa atividade de água (CHRISTENSEN; SAUER, 1982; KPODO; THRANE; HALD, 2000). Como principais fungos toxigênicos, envolvidos na cadeia alimentar estão os dos gêneros *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. (HUSSEIN; BRASEL, 2001).

As micotoxinas, metabólitos secundários tóxicos, são compostos orgânicos com diferentes grupos funcionais (TOMAŠEVIĆ-ČANOVIĆ, et al., 2003), produzidos pelos fungos filamentosos principalmente no final da fase exponencial de crescimento (BATA; LÁSZTITY, 1999). Uma única espécie de fungo pode produzir uma ou várias micotoxinas e também uma mesma micotoxina pode ser produzida por diferentes espécies de fungos (HUSSEIN; BRASEL, 2001). Esses metabólitos são muito estáveis, apresentam estabilidade química significativa nos alimentos, o que permite sua persistência mesmo após vários processamentos dos grãos (BITTENCOURT et al., 2005).

O seu sistema funciona baseado nas interações em três subsistemas: 1) metabolismo e toxicologia; 2) saúde e produtividade; 3) e no bem-estar. Quando se expõe à toxicidade da micotoxina, seja por contato pela pele, ingestão, ou inalação, ocorre uma série de eventos envolvidos pelo metabolismo até a excreção da toxina e seus metabólitos. A toxina revela o seu efeito na saúde pública e animal, na produtividade dos produtos agrícolas, cujos efeitos influenciarão na produção e no bem-estar que estão associados a problemas a humanos e a agricultura e seus derivados (FAO, 2001).

Resultados de pesquisas realizadas em duas décadas indicaram que dentre, os fungos toxigênicos, o gênero *Fusarium* spp. é o mais representativo na agricultura. A contaminação dos grãos por este fungo muitas vezes é inevitável, devido ele ser habitante natural do solo (D'MELLO et al., 1999).

A podridão de espigas do milho é principal responsável pela baixa qualidade dos grãos, da origem aos grãos ardidos, caracterizados pela descoloração (PEREIRA, 1995) causada por fungos do gênero *Fusarium* (MILLER, 1994; CASA et al., 1998), sendo o *F. graminearum* o principal causador da doença, porém outras espécies também podem causar a podridão das espigas, incluindo o *F. verticillioides*, *F. subglutinans* e *F. proliferatum*, os quais podem sintetizar fumonisinas durante o estágio patogênico na planta (MYCOTOXIN, 2003).

As espécies do gênero *Fusarium* são produtoras de micotoxinas, como fumonisinas, as fusarinas, moniliformina, ácido fusárico, toxina T-2, diacetoxiscirpenol, deoxinivalenol e zearalenona (LI et al., 2000). São importantes patógenos de cereais durante os diferentes estágios da planta, incluindo o período pós-colheita e durante o armazenamento (DIAZ; BOERMANS, 1994). A temperatura ideal é 21 °C e a síntese das suas toxinas ocorrem em uma faixa de temperatura entre 12 – 24 °C (HUSSEIN; BRASEL, 2001).

O *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg (anteriormente denominado como *Fusarium moniliforme* Sheldon) (RHEEDER; MARASAS; VISMER, 2002) é o principal fungo endêmico em grãos de milho (MILLER, 1994), desenvolvendo-se sob condições de clima tropical e baixas temperaturas (PLACINTA et al., 1999). Os fungos dos gêneros *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. também considerados endêmicos, são causadores de problemas para a agricultura, mas de modo menos acentuado em grãos de milho quando comparados aos do gênero *Fusarium* spp..

Fungos do gênero *Aspergillus* spp. comumente são encontrados em milho, amendoim, algodão, em algumas variedades de nozes (VIQUEZ, 1994), ou em produtos derivados destes (GRIFFIN, 1994). Seu crescimento e produção de metabólitos em substratos naturais sofrem influencia da umidade do ambiente, temperatura, componentes minerais,

atividade de água do substrato e por danos físicos presentes (VIQUEZ, 1994). Podem estar presentes em toda cadeia produtiva do produto, e sua colonização se inicia logo após o início da formação dos grãos, desenvolvendo-se durante a maturação (LACEY et al., 1991) e disseminando na forma de conídios, escleródios ou micélios pelo ar, solo e insetos (WILSON; PAYNE, 1994). A podridão da espiga por *Aspergillus flavus* pode se dar a partir de conídios presentes no solo os quais se translocam das raízes até a espiga, onde sob condições apropriadas se desenvolvem e causam a infecção (MYCOTOXIN, 2003).

Segundo Dhingra e Netto (1998), o inóculo em quantidade suficiente em períodos de maior suscetibilidade, devido altas temperaturas e estresse hídrico, favorece a colonização fúngica e formação de suas toxinas (as aflatoxinas) nos grãos na pré-colheita. Sendo que estas micotoxinas podem ser sintetizadas nos grãos de milho com até 15% de umidade aproximadamente (MYCOTOXIN, 2003).

Segundo Huwig et al. (2001) as micotoxinas contaminam os grãos de cereais em duas formas. A primeira por meio do crescimento do fungo na planta e, outra por meio do crescimento deste como saprófita em plantas ou cereais armazenados. Deve ser considerado que nem todos os fungos sintetizam micotoxinas e a detecção destes depende de fatores como o estado de desenvolvimento no qual se encontra e do substrato no qual se desenvolve. Como medidas de prevenção da contaminação por micotoxinas podem ser empregadas práticas como, colheita dos grãos na maturidade e sob condições de seca, no entanto, práticas de difícil utilização em países tropicais.

Quando presentes no milho, principalmente no período de pré-colheita as micotoxinas encontradas são: ocratoxinas, aflatoxinas, toxina T-2, deoxinivalenol, zearalenona e fumonisinas (FONSECA, 1999). Dentre estas a mais freqüentes no milho e as mais abundantes no Brasil, encontradas principalmente na região Sul (Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina) são as toxinas sintetizadas por *Fusarium* sp. (FONSECA, 1999), onde a estimativa anual da contaminação dos produtos agrícolas por estas micotoxinas é de 25% (LOPEZ-GARSIA; PARK; PHILLIPS; 1999; FINK-GREMMELS, 1999).

Considerando a segurança alimentar a ingestão de dietas contaminadas com micotoxinas mesmo nas baixas concentrações, por período prolongado de tempo pode levar a alterações drásticas da saúde humana e animal (PLACINTA et al., 1999). Devido a exposição a riscos resultantes de efeitos anabolizantes, estrogênicos, mutagênicos, teratogênicos, carcinogênicos principalmente no fígado e rins e, impactos imunossupressores, onde os animais são os mais prejudicados devido à baixa qualidade dos grãos a eles ministrados (HAYES; CAMPBELL, 1986; CASTEEL, ROTTINGHOUSE, 2000). As micotoxicoses,

doenças ou síndromes causadas devido à ingestão de micotoxinas, causam danos econômicos, comercial e sanitário pelos seus efeitos diversos (HAYES; CAMPBELL, 1986; BATA, LÁSZTITY, 1999).

Como estratégias preventivas para os efeitos prejudiciais devido às micotoxinas têm-se a prevenção da contaminação, descontaminação do alimento e a inibição da absorção da micotoxina pelo trato digestivo do animal. (BATA; LÁSZTITY, 1999)

Órgãos fiscalizadores governamentais têm estabelecido limites, envolvendo uma série de fatores, como a disponibilidade de dados toxicológicos, métodos analíticos, distribuição da concentração de micotoxinas, onde a exposição em relação à contaminação não são iguais devido aos diferentes níveis desta e aos diferentes hábitos alimentares nas diferentes regiões do mundo (FAO, 2004a).

Atividades ligadas à área das micotoxinas, como a pesquisa, fiscalização, monitoramento, prevenção e controle, dependem de dados analíticos confiáveis para o seu bom desempenho (RODRIGUEZ-AMAYA, 2000). Também fatores como a amostragem, limite de detecção, quantificação, exatidão, precisão, reprodutibilidade, repetibilidade (SOARES, 2006), integridade e pureza dos padrões analíticos (THIEL; SYDENHAM; SHEPHARD, 1996) são parâmetros a serem considerados quando da detecção e quantificação de micotoxinas para que análise seja confiável.

2.3 FUMONISINAS

As fumonisinas consistem de diésteres de propano-1,2,3 ácido tricarbóxico com vários 2 amino-12,16-dimetil-polihidroxiicosanos (Figura 1) (BEZUIDENHOUT et al., 1988). Embora 28 análogos tenham sido caracterizados (Tabela 1) (RHEEDER; MARASAS; VISMER, 2002), as fumonisinas B₁ (FB₁), B₂ (FB₂) e B₃ (FB₃) são as de maior ocorrência em milho e derivados (Figura 2) (MARÍN; SANCHIS; MAGAN, 1995). A FB₁ é a mais abundante, representando 70% a 80% da concentração total em alimentos e sementes naturalmente contaminados (MURPHY; RICE; ROSS, 1993; MARÍN; SANCHIS; MAGAN, 1995), FB₂ de 15 a 25% e FB₃ de 3 a 8% (MARÍN; SANCHIS; MAGAN, 1995). Apresentam elevada estabilidade térmica e persistem nos alimentos mesmo após o processamento (DUPUY et al., 1993).

Causam leucoencefalomalácia em eqüinos, edema pulmonar em suínos, imunossupressão em aves e apresentam atividade promotora de câncer comprovada em ratos (NORRED; VOSS, 1994). A Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC – International Agency for Research on Câncer) classificou as toxinas de *F. verticillioides* como possíveis carcinógenos para humanos (grupo 2B) (IARC, 1993).

Embora os limites para fumonisinas em alimentos ainda não estejam estabelecidos, o “Mycotoxin Committee of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians” recomenda níveis máximos de 5, 10, 50 e 50 $\mu\text{g.g}^{-1}$ para rações de eqüinos, suínos, bovinos e aves, respectivamente (MUNKVOLD; DESJARDINS, 1997). A Suíça recomenda o limite de 1 $\mu\text{g.g}^{-1}$ para os derivados de milho destinados ao consumo humano (VISCONTI; BOENKE, 1995). A Food and Drug Administration (FDA) recomenda o nível máximo de 2,0 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de fumonisinas ($\text{FB}_1 + \text{FB}_2 + \text{FB}_3$) para farelos de milho, 3,0 $\mu\text{g.g}^{-1}$ para milho pipoca e 4,0 $\mu\text{g.g}^{-1}$ para milho destinado à produção de massas (AVANTAGGIATO et al., 2002). O Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA), estabeleceu um limite provisório de tolerância máxima para ingestão diária de fumonisinas B₁, B₂ e B₃ de 2,0 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, limite excedido rapidamente por um indivíduo com dieta alimentar baseada em 400g ao dia (FAO, 2004a).

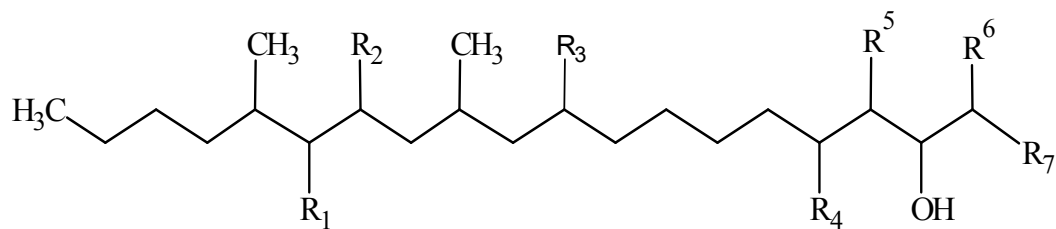
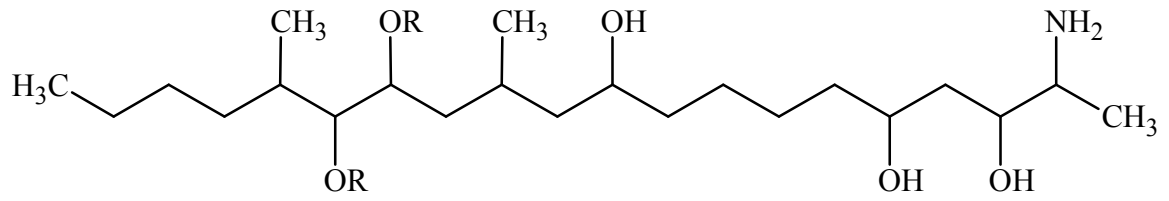
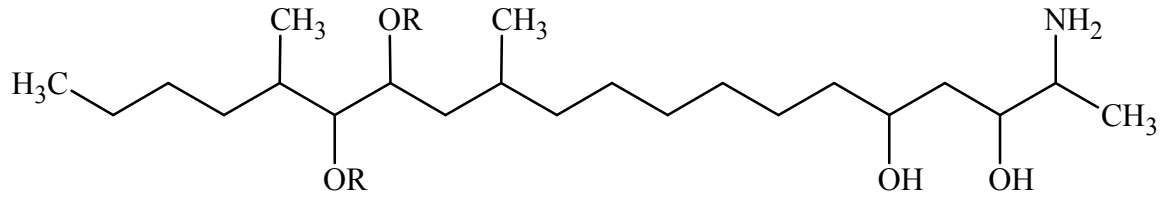


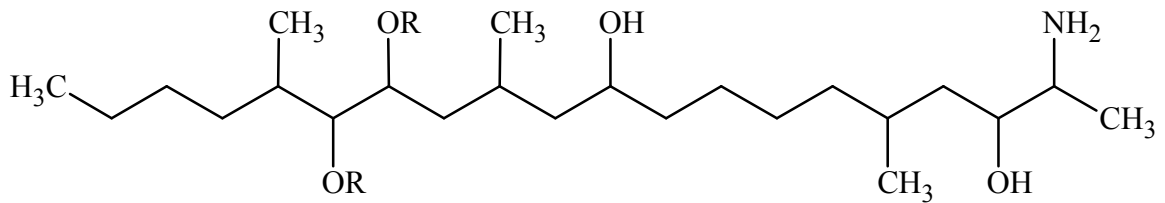
Figura 1 – Estrutura básica das fumonisinas



Fumonisina B₁ (F B₁)



Fumonisina B₂ (F B₂)



Fumonisina B₃ (F B₃)

Figura 2 – Fumonisininas de maior ocorrência em produtos agrícolas

Tabela 1 – Análogos de fumonisinas

<i>Cadeias laterais da estrutura principal de fumonisinas</i>								
Análogos	R₁	R₂	R₃	R₄	R₅	R₆	R₇	Referências
FA₁	TCA	TCA	OH	OH	H	NHCOCH ₃	CH ₃	BEZUIDENHOUT, et al., 1988
FA₂	TCA	TCA	H	OH	H	NHCOCH ₃	CH ₃	BEZUIDENHOUT, et al., 1988
FA₃	TCA	TCA	OH	H	H	NHCOCH ₃	CH ₃	MUSSER; PLATTNER, 1997
PHFA_{3a}	TCA	OH	OH	H	H	NHCOCH ₃	CH ₃	POLING; PLATTNER, 1999
PHFA_{3b}	OH	TCA	OH	H	H	NHCOCH ₃	CH ₃	POLING; PLATTNER, 1999
HFA₃	OH	OH	OH	H	H	NHCOCH ₃	CH ₃	POLING; PLATTNER, 1999
FAK₁	=O	TCA	OH	OH	H	NHCOCH ₃	CH ₃	MUSSER; EPPLEY; MAZZOLA, 1995
FBK₁	=O	TCA	OH	OH	H	NH ₂	CH ₃	MUSSER; PLATTNER, 1997
FB₁	TCA	TCA	OH	OH	H	NH ₂	CH ₃	GELDERBLOM, et al., 1988
Iso-FB₁	TCA	TCA	OH	H	OH	NH ₂	CH ₃	MACKENZIE, et al., 1998
PHFB_{1a}	TCA	OH	OH	OH	H	NH ₂	CH ₃	SYDENHAM, et al., 1995
PHFB_{1b}	OH	TCA	OH	OH	H	NH ₂	CH ₃	SYDENHAM, et al., 1995
HFB₁	OH	OH	OH	OH	H	NH ₂	CH ₃	POLING; PLATTNER, 1999
FB₂	TCA	TCA	H	OH	H	NH ₂	CH ₃	GELDERBLOM, et al., 1988
FB₃	TCA	TCA	OH	H	H	NH ₂	CH ₃	CAWOOD, et al., 1991
FB₄	TCA	TCA	H	H	H	NH ₂	CH ₃	CAWOOD, et al., 1991
FB₅^c								MUSSER; PLATTNER, 1997
FC₅	TCA	TCA	OH	OH	H	NH ₂	H	BRANHAM; PLATTNER, 1993
N-ACETIL- FC₁	TCA	TCA	OH	OH	H	NHCOCH ₃	H	SEO; KIM; LEE, 1999
Iso-FC₁	TCA	TCA	OH	H	OH	NH ₂	H	SEO; KIM; LEE, 1999
N-ACETIL-iso- FC₁	TCA	TCA	OH	H	OH	NHCOCH ₃	H	SEO; KIM; LEE, 1999
OH-FC₁	TCA	TCA	OH	OH	OH	NH ₂	H	SEO; KIM; LEE, 1996
N-ACETIL-OH- FC₁	TCA	TCA	OH	OH	OH	NHCOCH ₃	H	SEO; KIM; LEE, 1999
FC₃	TCA	TCA	OH	H	H	NH ₂	H	SEO; KIM; LEE, 1996
FC₄	TCA	TCA	H	H	H	NH ₂	H	PLATTNER, 1995
FP₁	TCA	TCA	OH	OH	H	3HP	CH ₃	MUSSER; MAZZOLA, 1996
FP₂	TCA	TCA	H	OH	H	3HP	CH ₃	MUSSER; MAZZOLA, 1996
FP₃	TCA	TCA	OH	H	H	3HP	CH ₃	MUSSER; MAZZOLA, 1996

Fonte: Adaptado de Rheeder et al. (2002)

2.4 AFLATOXINAS

São metabólitos secundários tóxicos produzidos principalmente por *A. flavus* e *A. parasiticus* (BENNETT; KLICH, 2003; FAO, 2004b). Dentre as espécies, *A. parasiticus* geralmente é o maior produtor, produzindo as aflatoxinas B₁ (AFB₁), B₂ (AFB₂), G₁ (AFG₁) e G₂ (AFG₂) (Figura 3), ocorrendo principalmente na África e nas Américas (IARC, 1993) e o *A. flavus* produz apenas AFB₁ e AFB₂ (TANIWAKI; FONSECA; PIZZIRANI-KLEINER, 1993) ocorrendo em todas as partes do mundo. Podem ser associadas ao milho, amendoim, nozes, centeio, aveia, trigo, sementes de algodão, castanha brasileira, também em fígado de suínos, ovinos e aves de corte, em baixa concentração (VILDES, 1998).

Essas toxinas pertencem ao grupo das bisfuranocumarinas, onde os grupos B e G diferem entre si, através de sua estrutura química. As aflatoxinas do grupo B apresentam um anel ciclopentanona (JAIMEZ et al., 2000), e as do grupo G um anel lactona (BÜCHI et al., 1966; JAIMEZ et al., 2000) e os seus análogos B₁ e G₁, diferem dos análogos B₂ e G₂ devido a presença da dupla ligação no furano terminal (Figura 3). Essas pequenas variações em suas estruturas são responsáveis pelas diferenças na intensidade de fluorescência, quando expostas à radiação ultravioleta. As aflatoxinas do grupo B₁ e B₂ apresentam fluorescência azul-violeta e G₁ e G₂ fluorescência amarelo-esverdeada (ASAO et al., 1965), sendo que os análogos B₂ e G₂ apresentam maior intensidade de fluorescência quando comparados aos análogos B₁ e G₁ (JAIMEZ et al., 2000) (Figura 4).

A AFB₁ é considerada a mais tóxica, com efeitos carcinogênicos, teratogênicos, afetam o metabolismo de carboidratos, lipídeos, ácidos nucleicos e proteínas (BRADBURN; COKER, 1993). Em animais e homens o principal órgão-alvo é o fígado, podendo afetar ainda rins, baço e pâncreas (PHILLIPS; CLEMENT; PARK, 1994).

Quanto ao potencial genotóxico da AFB₁, estudos *in vivo* e *in vitro* demonstraram que a presença desta toxina aumenta: os aductos de DNA, a permuta das cromátides irmãs e, reversão de histidinas, assim como a anomalia cromossomal (NEAL, 1995). Sua forma ativa (epóxidos) é capaz de reagir covalentemente de uma forma muito rápida com macromoléculas, incluindo o DNA, RNA e proteínas (BIEHL; BUCK, 1987), indicando que as aflatoxinas são carcinógenos genotóxicos que mesmo em quantidades muito baixas pode acarretar a ocorrência de tumores (FAO, 2004b).

Com relação à legislação para níveis de tolerância das aflatoxinas, cada país estabelece a sua legislação. Na tabela 2 estão apresentados os limites máximos tolerados para aflatoxinas pelo Brasil, Estados Unidos e União Européia.

De acordo com a legislação brasileira, o Ministério da saúde, na Resolução RDC nº. 274, da ANVISA, de 15 de outubro de 2002, publicado no Diário Oficial da União, de 16 de outubro de 2002, diz que o limite máximo permitido para a somatória de aflatoxinas ($B_1+B_2+G_1+G_2$) em grãos de milho inteiro, partido, amassado, moído, farinhas e sêmolos é de $20 \mu\text{g.kg}^{-1}$ (ppb) (ANVISA, 2007).

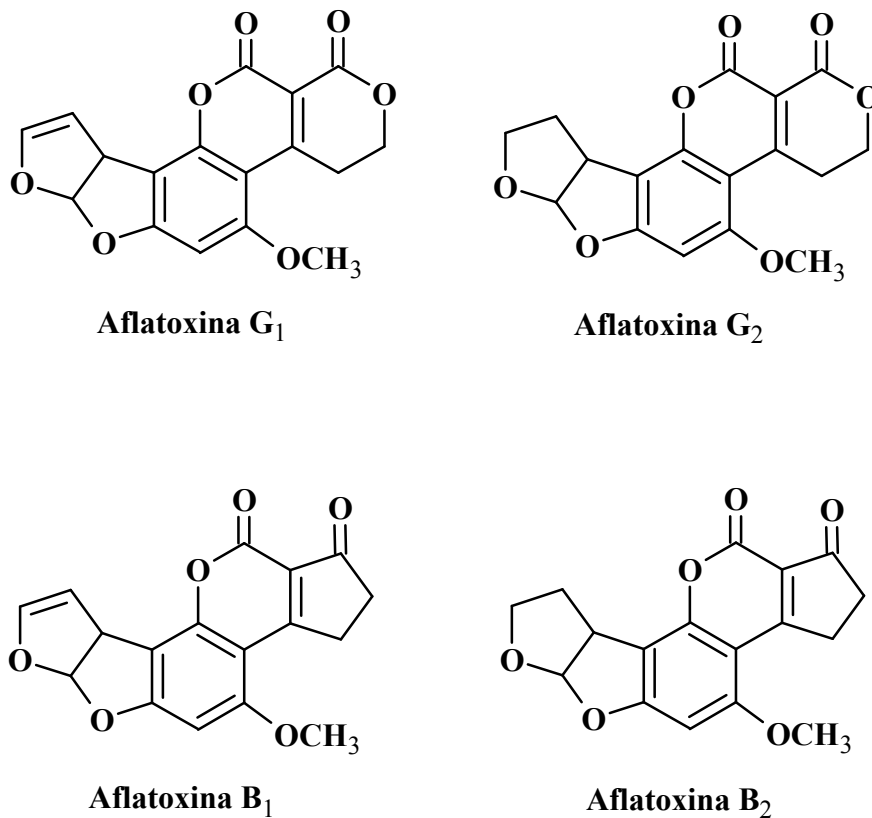


Figura 3 – Estrutura das principais aflatoxinas

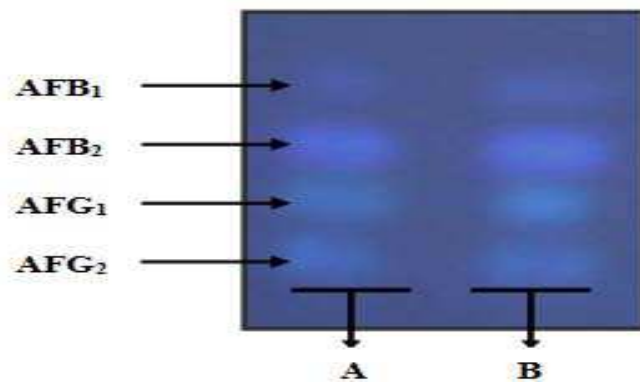


Figura 4 – Fluorescência e intensidade das aflatoxinas. (A) 5µL do padrão (2,0 µg.mL⁻¹) – AFG₂, AFG₁, AFB₂ e AFB₁; (B) 10µL do padrão (2,0 µg.mL⁻¹) – AFG₂, AFG₁, AFB₂ e AFB₁

Tabela 2 – Legislação para aflatoxinas

País	Produtos	AF total µg.kg ⁻¹
Brasil	grãos de milho inteiro partido amassado moído	20
	farinhas	20
	sêmolas	20
Estados Unidos	consumo humano alimentos em geral leite	10 0,5
	consumo animal (grãos de milho) animais jovens gado leiteiro	20
	gado de corte jovens suínos jovens aves jovens	100
	suínos adultos gado de corte adulto	200 300
	farinha de semente de algodão como ingrediente de alimento	300
	demais alimentos	20
União Européia	alimentos em geral	50
	alimentos com 12% de umidade amendoim sementes de algodão	20
	babaçu milho e derivados	20

Fonte: Fao (2004a)

2.5 OCORRÊNCIA NATURAL DE FUMONISINAS E AFLATOXINAS

A possibilidade de co-ocorrência de micotoxinas em alimentos leva a preocupações, pelo fato de não se conhecer ao certo os efeitos das interações entre esses compostos. A incidência de fungos e a presença de micotoxinas nos alimentos dependem de condições favoráveis, as quais variam de espécie para espécie, e a adaptabilidade depende da espécie dominante. Embora a adaptabilidade das espécies dominantes, não seja conhecida, elas encontram-se nos alimentos, e se correlacionam com as características e propriedades dos alimentos, bem como com contaminação do nicho ecológico (SAMSON et al., 1995a).

Os fungos bem como suas micotoxinas podem ser encontrados no mesmo substrato. As rações utilizadas na alimentação animal geralmente são as mais afetadas devido o emprego de diferentes tipos de grãos, e a procedência disto levando a possibilidade da co-ocorrência de duas ou mais micotoxinas em uma mesma dieta. Quando há a co-ocorrência de duas ou mais micotoxinas na ração animal, a toxicidade de algumas micotoxinas pode ser ou não aumentada de modo aditivo ou sinérgico (BERMUDEZ et al., 1997; KUBENA et al., 1997; WEIBKING et al., 1994).

Diferentes estudos têm sido realizados no sentido do entendimento do sinergismo natural, bem como dos efeitos decorrentes da ocorrência simultânea de micotoxinas.

Abbas et al., (2002) ao avaliarem a resistência de 45 híbridos comerciais de milho em relação à contaminação por micotoxinas durante um ano (1998–1999) sob efeito de altos e moderados estresses de calor, detectaram AFB₁ e AFB₂ em uma proporção total $(4,34 \pm 0,32) \times 10^3 \mu\text{g.kg}^{-1}$ em 100% e 88% das amostras, respectivamente. As FB₁, FB₂ e FB₃ foram detectadas em 100%, FB₄ e C₄ em 94% das amostras, em uma proporção total de $11,2 \pm 1,2 \text{ mg.kg}^{-1}$, indicando que o estresse provocado pelo calor desempenha importante papel na suscetibilidade do milho à contaminação por aflatoxinas e fumonisinas. Trabalhos subsequentes entre 1999 a 2001, com avaliação de 65 híbridos de milho naturalmente infectados com *Fusarium* spp. e *Aspergillus* spp. verificou que a presença de fumonisinas e aflatoxinas foi constante durante todo o período. Para as aflatoxinas observou-se um excesso de $20 \mu\text{g.kg}^{-1}$ (20 ppb) em 1998 o qual permaneceu idêntico nos demais anos. Para as fumonisinas observou-se $2 \mu\text{g.g}^{-1}$ (2 ppm) e para os demais anos, níveis de 0,3 a $83,8 \mu\text{g.g}^{-1}$ (0,3 a 83,6 ppm) (ABBAS et al., 2006).

Hirooka et al. (1996) detectaram em 48 amostras de milho provenientes dos Estados do Paraná, Mato Grosso do Sul e Goiás, as micotoxinas FB₁ e FB₂ em percentuais de 97,4% e 94,8% das amostras, respectivamente. Nas amostras do Mato Grosso do Sul e Goiás todas as amostras apresentaram contaminação por FB₁ e FB₂ em níveis de 4,90 a 18,52 $\mu\text{g.g}^{-1}$ e 3,62 a 19,13 $\mu\text{g.g}^{-1}$, respectivamente, enquanto que nas do Paraná os níveis de FB₁ foram de 0,60 a 12,55 $\mu\text{g.g}^{-1}$ e FB₂ de 1,20 a 10,24 $\mu\text{g.g}^{-1}$.

Orsi et al. (2000) ao avaliarem 197 amostras de três híbridos de milho, detectaram FB₁ em níveis de 0,87 a 49,31 $\mu\text{g.g}^{-1}$ em 90,2% das amostras e FB₂ em níveis de 1,96 a 29,16 $\mu\text{g.g}^{-1}$ em 97,4% das amostras.

Na Venezuela avaliaram 37 amostras de milho e verificaram a presença simultânea de AFB₁ e FB₁ em 19% das amostras, sendo que 16,6% das amostras apresentaram contaminação por AFB₁ e 83,78% por FB₁ (MEDINA-MARTÍNEZ; MARTÍNEZ, 2000). Na Argentina analisaram 15 amostras de genótipos de milho e 50 amostras de farinha de milho comercial, detectaram a presença de *A. flavus* e *A. parasiticus*, sendo este último o mais freqüente (38%). Dentre os genótipos apenas um apresentou contaminação por aflatoxinas (5 $\mu\text{g.kg}^{-1}$), porém nenhuma contaminação foi detectada na farinha de milho, indicando que o milho daquele país apresenta baixo grau de exposição de dietas contaminadas por aflatoxinas para humanos (ETCHEVERRY et al., 1999).

2.6 SISTEMAS DE PLANTIO

A adoção de práticas agrícolas como preparo do solo, condução durante o cultivo e a colheita são fatores decisivos no rendimento e na produção. Esse sistema deve ser sustentável de modo a proporcionar rendimentos estáveis a longo prazo com utilização de técnicas de manejo que agreguem componentes do sistema de maneira a melhorar a sua eficiência biológica. Para isso o sistema agrícola deve ser considerado como um ecossistema, no qual além do aumento do rendimento e da produção, a estabilidade ecológica deve ser considerada (DAROLT, 1998).

O sistema de plantio é caracterizado por dois tipos de manejo, o convencional e o direto, buscando a melhoria do solo e conseqüentemente da cultura.

O sistema de plantio convencional (SPC) também denominado de ciclo não sustentável é caracterizado pelo intenso revolvimento do solo, incorporação de restos de

culturas e controle de plantas daninhas (PACHECO, 2007). Neste sistema a intensidade e a capacidade de infiltração de água no solo são baixas (PACHECO, 2007), devido à ação direta e intemperizadora dos fatores climáticos, como a chuva, vento e o sol os quais atuam sobre as camadas superficiais do solo promovendo a erosão (REGO, 1999). A compactação do solo provocada pela pressão de máquinas agrícolas constitui um dos principais fatores responsáveis pela queda acentuada da produção, devido à redução da capacidade de infiltração de água no solo (FANCELLI, 2000).

No SPC ocorre aceleração da degradação dos recursos naturais devido ao sobreuso da área agrícola, facilitando o processo erosivo e conseqüentemente o desequilíbrio ecológico (DAROLT, 1998). A conseqüência desse processo ligado a fatores naturais, econômicos e sociais inclui a menor disponibilidade de água, queda da produtividade, menor capacidade de tolerância a períodos de seca e maior susceptibilidade a enchentes, a queda de renda do sistema, do solo e a diminuição do emprego rural (DAROLT, 1998).

Frente aos fatores naturais, econômicos e sociais, pesquisadores e agricultores buscaram um sistema de cultivo próximo a um ecossistema natural, “o sistema de plantio direto” (SPD), apresentando maior sustentabilidade e estabilidade às perturbações e estresses, causados por fatores culturais ou climáticos, como fortes enxurradas ou ataque de pragas, bem como variações de temperatura e seca (DAROLT, 1998).

Considerado como um dos maiores avanços da agricultura brasileira, o SPD foi introduzido no Sul do Brasil no início da década de 1970 (COSTA; XAUD, 2007), tendo como objetivo principal o controle da erosão hídrica. O SPD começou a ser utilizado apenas na década de 1980. Em 2004/2005, o Brasil encontra-se em segundo lugar apresentando 23.600.000 de hectares de área cultivada de acordo com dados apresentados pela Federação Brasileira de Plantio Direto na Palha (FEBRAPDP), superado apenas pelos Estados Unidos com 25.304.000 de hectares de área cultivada. É considerado um sistema conservacionista do solo, no qual a introdução da semente é realizada em sulco ou cova sob solo não revolvido (DERPSCH, 1984).

O SPD, quando comparado ao SPC, apresenta vantagens por ser próximo ao ecossistema natural, com a grande capacidade de reaproveitamento dos nutrientes, relação entre a produtividade e a diminuição da biomassa, a agregação dos nutrientes através dos ciclos minerais evitando a lixiviação (DAROLT, 1998). Com menor mão-de-obra, uso de fertilizantes e herbicidas em doses baixas, diminuição de riscos de erosão (REGO, 1999), maior disponibilidade de oxigênio, maior atividade biológica, umidade por períodos mais longos e maior influência da matéria orgânica (FANCELLI, 2000).

No Paraná tem sido observado aumentos significativos de 0 a 5 cm do conteúdo da matéria orgânica após 5 anos sob SPD (SIDIRAS; PAVAN, 1985) e de 0 a 10 cm após 15 anos sob SPD em comparação ao SPC (SÁ, 1995). Esse sistema busca a mínima dependência de insumos agroquímicos, ressaltando as interações e sinergismos entre os vários componentes biológicos dos agroecossistemas, melhorando assim a produção do meio ambiente, a eficiência biológica e econômica, agrupando as extensões culturais, sócio-econômicas e biofísica (DAROLT, 1998). Na tabela 3 estão apresentados alguns atributos desse sistema comparado ao sistema convencional.

Tabela 3 – Diferenças entre os sistemas de plantio direto e convencional

Atributos	Plantio	
	Convencional	Direto
Biofísicos		
Capacidade de reciclagem de nutrientes	B	M-A
Capacidade de conservação de água e solo	B	M-A
Nível de biodiversidade	B	M-A
Estabilidade frente a pragas e doenças	B	M-A
Armazenagem de carbono	B-M	A
Estabilidade	B	M-A
Produtividade	M	M-A
Sustentabilidade	B	M-A
Sociais		
Manutenção do homem no campo	B-M	M-A
Aceitabilidade política	M-A	M-A
Econômicos		
Dependência de insumos externos (<u>combustíveis, mão-de-obra, etc</u>)	A	M-A
Receita líquida	M	M-A

B – baixo; M – médio; A – alto

Fonte: Adaptado de Darolt (1998)

O sistema de plantio adotado na cultura do milho é de grande importância na produtividade e recuperação do solo. O SPD é comum na cultura do milho, principalmente na “safrinha” do milho, devido à maior exploração da área agrícola (CRUZ, et al., 2002).

Trabalhos realizados por Yokoyama, Silveira e Stone (2002) em Santo Antônio de Goiás/GO sob latossolo vermelho, durante seis anos consecutivos (1992-1998), demonstraram que o uso do sistema com arado de aveia nas culturas de soja, milho e trigo, proporciona maior rentabilidade em relação ao SPD, porém este apresenta menos custos.

O SPD por apresentar diversas vantagens em relação à produtividade e sustentabilidade torna-se um sistema economicamente viável. Porém, algumas desvantagens são encontradas pelos produtores em relação ao uso deste sistema, quando se diz respeito à adaptação das técnicas a serem empregadas na propriedade, tais como, o uso de determinados defensivos, sistema de colheita, manejo diferenciado de adubação (COSTA; XAUD, 2007), assim como o problema do estabelecimento das espécies de plantas destinadas à cobertura do solo após a colheita de uma determinada cultura, ficando este solo exposto durante todo o período seco, sujeito à ação intemperizadora dos fatores climáticos e ao ataque por plantas daninhas (MEDEIROS, 2007). Outra desvantagem observada na adoção deste sistema está relacionada à contaminação por fungos necrófagos, fitopatogênicos e patogênicos que se proliferam nos restos de culturas.

Os restos de culturas na superfície do solo influenciam na temperatura afetando os processos físicos, químicos e biológicos, entre eles a propagação de microorganismos 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 e 25°C em solos de regiões temperadas (HENKLAIN, 1997).

A probabilidade da incidência de doenças no SPD vai depender do tipo de patógeno envolvido, do esquema de rotações e sucessão de culturas adotados, das várias interações dos microrganismos com o solo e a planta e do nível de resistência da planta. Observações com aproximadamente uma década na região Sul do país comprovam que a intensidade de doenças tem sido maior no SPD, em cereais de inverno (REIS; SANTOS, 1993). O controle biológico e o melhoramento de plantas constituem em estratégias potenciais para minimizar o problema das pragas e das diversas doenças no plantio direto (FERNANDES, 1997). O não revolvimento do solo no SPD pode favorecer a sobrevivência de alguns insetos pragas, mas ao mesmo tempo proporciona o habitat de inimigos naturais como insetos predadores e ácaros mantendo desta maneira o equilíbrio, através do controle biológico, diminuindo, com isso, o uso de insumos agrícolas (DERPSCH, 1997).

Em relação à nutrição, a maioria dos solos apresenta níveis insuficientes de nitrogênio para atender o processo de crescimento da maioria das plantas. Quando se adota um sistema de manejo onde os resíduos vegetais são depositados sobre o solo, estes resíduos passam a ser fonte de carbono e energia para os microrganismos que promovem o aumento da biomassa dos microrganismos que necessitarão de nitrogênio e outros nutrientes para formar novas células. Quando a concentração de nitrogênio nos resíduos em decomposição demonstrar-se baixa, a quantidade de nitrogênio mineralizado não será suficiente para atender a demanda dos microrganismos, os quais imobilizarão o nitrogênio mineral (NH_4^+ e/ou, NO_3^-) da solução do solo (imobilização líquida) (OLIVEIRA, et al., 2002). Por outro lado, quando o sistema não possuir nenhum preparo, as exigências de nitrogênio poderão ser relativamente mais elevadas, proporcionadas pelo aumento da atividade microbiana nas camadas superficiais do solo (SCHULTZ, 1978).

Dentre os nutrientes essenciais para o desenvolvimento e crescimento da planta de milho destaca-se o nitrogênio, por ser um constituinte essencial dos aminoácidos, componentes das proteínas que são responsáveis pela formação dos grãos. O nitrogênio também confere a cor verde às folhas (FERREIRA; SCHWARZ; STRECK, 2000). A adubação com fertilizantes nitrogenados aumenta a produtividade dos grãos de milho, assim como a matéria seca da parte aérea da planta, conforme o aumento das doses (ARAÚJO; FERREIRA; CRUZ, 2004).

O potássio contribui para o desenvolvimento das raízes, frutos, sementes e, melhora o armazenamento das colheitas. Deficiência leva a redução no crescimento das plantas e maturação desuniforme dos frutos e sementes. Reduz a perda de água pelas plantas em períodos de seca, também proporciona o espessamento dos tecidos conferindo às plantas maior resistência a doenças (FERREIRA; SCHWARZ; STRECK, 2000).

A adoção do SPD em relação à adubação nitrogenada proporciona um efeito positivo. Sidiras e Pavan (1985) observaram que no plantio direto, a partir de três a quatro anos, os valores de pH, cálcio, magnésio, potássio trocável e fósforo aumentavam na camada superficial do solo de 0 –10 cm. Bayer e Mielniczuk (1997) relataram que os teores de carbono total e a capacidade de troca de cátions aumentaram na camada superficial do solo após cinco anos sob SPD.

As práticas culturais para híbridos de milho quando relacionadas com a adubação de nitrogênio e amônia no solo podem aumentar a infecção por *Fusarium* de uma forma incontrollável (MILLER, 1994).

Schiabel (2004) demonstrou que de 72 amostras de milho (safras 2000/2001, 2001/2002 e 2002/2003) colhidas de plantas sob sistema de plantio direto e convencional, com sucessão a aveia e pousio, 97,2% (n = 70) apresentaram contaminação natural por fumonisinas. As amostras submetidas ao SPD com pousio no inverno apresentaram a maior média de contaminação ($7,6 \mu\text{g.g}^{-1}$), enquanto aquelas submetidas ao SPC com pousio no inverno apresentaram a menor média ($2,6 \mu\text{g.g}^{-1}$). Por outro lado, Nazareno (1981) na Região Sul do Paraná (Safrá 1979/1980), demonstrou que a podridão do colmo causada por *Fusarium* spp. na cultura do milho pode ser influenciada pelo sistema de plantio empregado, sendo que 51,3% da cultura sobre SPD apresentou infecção por *Fusarium* spp., enquanto 35,6% sobre o SPC. Um estudo subsequente (Safrá 1980/1981) realizado em Londrina, Região Norte do Paraná, demonstrou que as condições para o desenvolvimento da doença foram menos favoráveis, independente do sistema de cultivo empregado, quando se adotou a rotação de culturas tri-anual com algodão e soja (NAZARENO, 1981).

Desse modo, dentre os fatores responsáveis pela baixa produtividade e qualidade da cultura do milho, encontra-se o tipo de manejo empregado (TEIXEIRA et al., 1994), tornando-se um fator de extrema importância tanto no aspecto, econômico, social, cultural, sanitário e nutricional dos grãos.

Algumas medidas podem ser tomadas em relação à contaminação de culturas por fungos fitopatogênicos, prevenindo a interação entre doenças e o SPD, como a destruição imediata da palha após a colheita por meio da queima, a decomposição microbiana até a mineralização total dos restos de cultura, associadas ao sistema de rotação e a incorporação dos restos de culturas por meio de arados e grades (GRUPO PLANTIO DIRETO, 2000).

2.7 ROTAÇÃO DE CULTURAS

A combinação de distintas espécies vegetais torna um sistema de manejo mais eficiente, devido às diferenças nutricionais, velocidade de decomposição e a produção de fitomassa (CRUZ, et al., 2002). A rotação de culturas consiste de uma prática agrícola que visa assegurar a estabilidade produtiva do agroecossistema (FANCELLI; NETO, 2000a), através da alternância de espécies agrícolas em uma mesma área, a qual dependerá da região, do tipo de solo, manejo empregado, clima e até mesmo a infra-estrutura da propriedade, com

objetivos de melhorar o rendimento e diminuir o uso de insumos agrícolas (CALEGARI, 2000). Segundo Santos et al. (1993), a rotação de culturas permite o controle natural de plantas daninhas, por meio de substâncias químicas e do efeito físico das coberturas.

A rotação de culturas tem um papel muito importante no controle das doenças e pragas, no sistema de manejo do solo, aumentando a estabilidade do rendimento dos grãos. Dados apresentados por Santos et al. (2000) comprovam o aumento e a estabilidade no rendimento dos grãos com a adoção de rotação de culturas, assim como a redução da gravidade de doenças relacionadas às raízes de trigo. Na cultura do milho tem sido empregada no controle de ferrugens, helmintosporiose, antracnose, mancha de *Phaeosphaeria* (FANCELLI; NETO, 2000b) e na diminuição da quantidade de inóculo de *Aspergillus flavus* (FONSECA, 1999).

O sistema de rotação de culturas e plantas de cobertura quando agregados ao SPD, proporciona o aumento da matéria orgânica do solo e, em consequência, melhora a agregação de partículas no solo, aumentando a infiltração de água e a aeração no solo (CALEGARI, et al., 2006).

O acréscimo de espécies de plantas no solo deve ocorrer principalmente no outono/inverno, onde mais da metade da área ocupada por culturas de verão, permanecem em pousio, expostas às chuvas erosivas e infestações (DAROLT, 1998).

Estudos realizados por pesquisadores do IAPAR (Instituto Agronômico do Paraná) com rotações de culturas envolvendo pousio no inverno apresentaram mau desempenho em relação à infiltração de água no solo durante o desenvolvimento da próxima cultura (CALEGARI; VIGIRA, 1999).

Alguns aspectos devem ser considerados no planejamento do sistema de rotação, (DAROLT, 1998) tais como:

- Disponibilidade de equipamentos para o manejo dos adubos verdes e restos culturais;
- Exigência nutricional, sustentabilidade a fitopatógenos e pragas de cada cultura;
- Alternância de culturas de diferentes famílias;
- Infestação de doenças, pragas e plantas daninhas.

Para uma boa rotação de cultura é necessário que a fitomassa seca sobre a superfície do solo seja superior a $4,0 \text{ t.ha}^{-1}$. A quantidade de palhada indicada para se ter uma segurança confiável é em média $6,0 \text{ t.ha.ano}^{-1}$ de fitomassa seca (CRUZ, et al., 2002). Os restos culturais do milho quando bem manejados proporcionam boa estabilidade, por deixar uma grande quantidade de fitomassa seca sobre o solo (CRUZ, et al., 2002).

No Paraná o sistema de rotação de culturas indicado consiste de (CALEGARI, 2000):

- Ervilhaca/milho → aveia/soja → trigo/milheto/soja;
- Tremoço/milho → aveia/soja → trigo/soja;
- Aveia/feijão → nabo + aveia/milho → aveia + ervilha forrageira/soja;
- Aveia/soja → aveia + ervilha forrageira Iapar-83/milho → nabo + aveia/soja.

A rotação de cultura com uma leguminosa e uma gramínea (no caso, o milho) é uma das práticas mais efetivas para se obter altas produções, tanto de milho quanto de leguminosa. A rotação reduz o nível de pragas e melhora as condições físicas do solo para a cultura seguinte. No caso do milho, a rotação com soja permite a economia de nitrogênio.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

- Avaliar a co-ocorrência natural de fumonisinas e aflatoxinas em amostras de milho recém-colhido em duas safras consecutivas (2003 e 2004);
- Avaliar a contaminação fúngica e os níveis de fumonisinas em milho cultivado sob diferentes sistemas de plantio e sucessão de culturas em duas safras consecutivas (2005 e 2006).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a co-ocorrência natural de fumonisinas e aflatoxinas em amostras de milho recém-colhido da região Norte do Paraná em três pontos da cadeia produtiva: campo, recepção e pré-secagem;
- Avaliar a contaminação de fúngica e os níveis de fumonisinas em milho cultivado sob:
 - Sistema de plantio direto e convencional em sucessão a aveia e pousio no inverno;
 - Sistema de plantio direto e convencional em sucessão a aveia e pousio, nas diferentes dosagens de nitrogênio em cobertura nas proporções de 0; 22,5; 45,0 e 90,0 Kg.ha⁻¹ e suplementada com óxido de potássio nas proporções de 90,0 + 13,2 Kg.ha⁻¹ respectivamente (safra 2005/2006).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAS DE MILHO

4.1.1 Sistema de Plantio e Sucessão de Culturas

O híbrido de milho AGROESTE-33 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 e espaçamento de 0,90 m entre linhas, totalizando 20 parcelas para cada sistema de plantio na safra de 2006 (Anexo A) e parcela única para cada sistema de plantio na safra de 2007 (Anexo B). Foram avaliados os sistemas de plantio direto e convencional em sucessão a aveia e pousio no inverno nas safras 2006 e 2007 (Figura 5). Na safra 2006 também foram avaliados os efeitos da aplicação de diferentes doses de nitrogênio (N) (0; 22,5; 45,0 e 90,0 Kg.ha⁻¹) correspondente a 0, 25, 50 e 100% da dose de nitrogênio em cobertura (DNC) e suplementação com óxido de potássio (K₂O) utilizado como fonte o cloreto de potássio (KCl) (90,0 Kg.ha⁻¹ de N + 13,2 Kg.ha⁻¹ de K₂O) (Tabela 4).

A amostragem foi realizada através da coleta de 10 espigas de milho por parcela, homogeneizadas e feita uma amostra composta com 500g por partes da espiga, totalizando 1,5 kg.

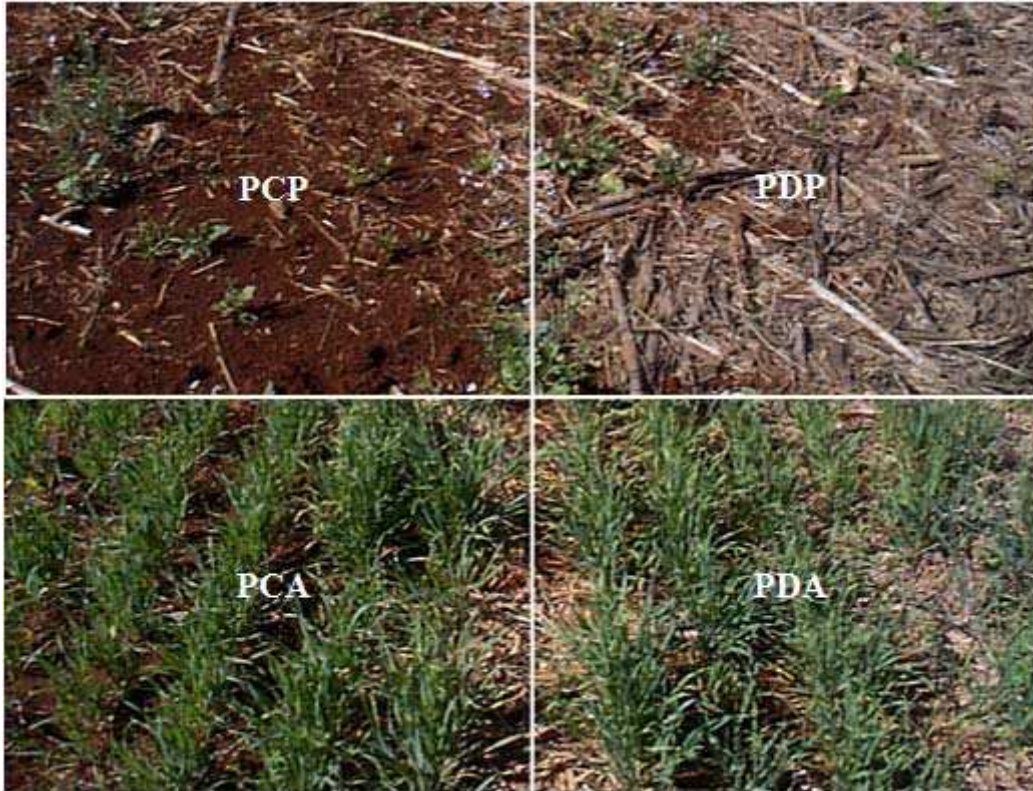


Figura 5 – Sistema de plantio e sucessão de culturas. PCP: plantio convencional com pousio no inverno; PDP: plantio direto com pousio no inverno; PCA: plantio convencional com aveia no inverno; PDA: plantio direto com aveia no inverno.

Tabela 4 – Níveis de adubação, sistemas de plantio e cultivo de inverno.

Amostras	Nível de adubação	Sistema de plantio	Cultivo de inverno
PDA-1	0% da DNC	Plantio direto	Aveia
PDA-2	25% da DNC	Plantio direto	Aveia
PDA-3	50% da DNC	Plantio direto	Aveia
PDA-4	100% da DNC	Plantio direto	Aveia
PDA-5	100% da DNC + K ₂ O	Plantio direto	Aveia
PCA-1	0% da DNC	Plantio convencional	Aveia
PCA-2	25% da DNC	Plantio convencional	Aveia
PCA-3	50% da DNC	Plantio convencional	Aveia
PCA-4	100% da DNC	Plantio convencional	Aveia
PCA-5	100% da DNC + K ₂ O	Plantio convencional	Aveia
PDP-1	0% da DNC	Plantio direto	Pousio
PDP-2	25% da DNC	Plantio direto	Pousio
PDP-3	50% da DNC	Plantio direto	Pousio
PDP-4	100% da DNC	Plantio direto	Pousio
PDP-5	100% da DNC + K ₂ O	Plantio direto	Pousio
PCP-1	0% da DNC	Plantio convencional	Pousio
PCP-2	25% da DNC	Plantio convencional	Pousio
PCP-3	50% da DNC	Plantio convencional	Pousio
PCP-4	100% da DNC	Plantio convencional	Pousio
PCP-5	100% da DNC + K ₂ O	Plantio convencional	Pousio

DNC: dose de nitrogênio em cobertura.

K₂O: suplementação com óxido de potássio

PDA: plantio direto com aveia no inverno

PCA: plantio convencional com aveia no inverno

PDP: plantio direto com pousio no inverno

PCP: plantio convencional com pousio no inverno

1; 2; 3; 4 e 5: níveis de DNC

4.1.2 Co-ocorrência de Aflatoxinas e Fumonisinias

Um total de 300 amostras de milho recém-colhido foram coletadas em três pontos da cadeia produtiva de três empresas processadoras de milho da região Norte do Paraná. A amostragem foi realizada imediatamente após a colheita (n=20), na recepção da indústria (n=70) e antes da secagem (n=60) para cada safra. A fim de facilitar, as amostras coletadas imediatamente após a colheita, recepção das indústrias e antes da secagem foram denominadas de amostras de campo, recepção e pré-secagem, respectivamente. As amostras de campo e recepção foram coletadas de 9 a 12 pontos da carga do caminhão e reunidas (10 kg), seguindo o protocolo de amostragem estabelecido pela legislação brasileira (BRASIL, 1976). As amostras de campo e recepção foram coletadas do mesmo caminhão, enquanto que as amostras de pré-secagem foram coletadas da esteira que as conduz ao secador, i.e., 650 g a cada 30 min. e reunidas (10 kg). Após a homogeneização, as amostras de milho (1 kg) foram enviadas ao laboratório e mantidas a 4 °C no máximo por 7 dias para a análise microbiológica (Figura 6). Para determinação de fumonisinias e aflatoxinas, 200 g de cada amostra foram triturados até 50 “mesh” e estocados a -20 °C.

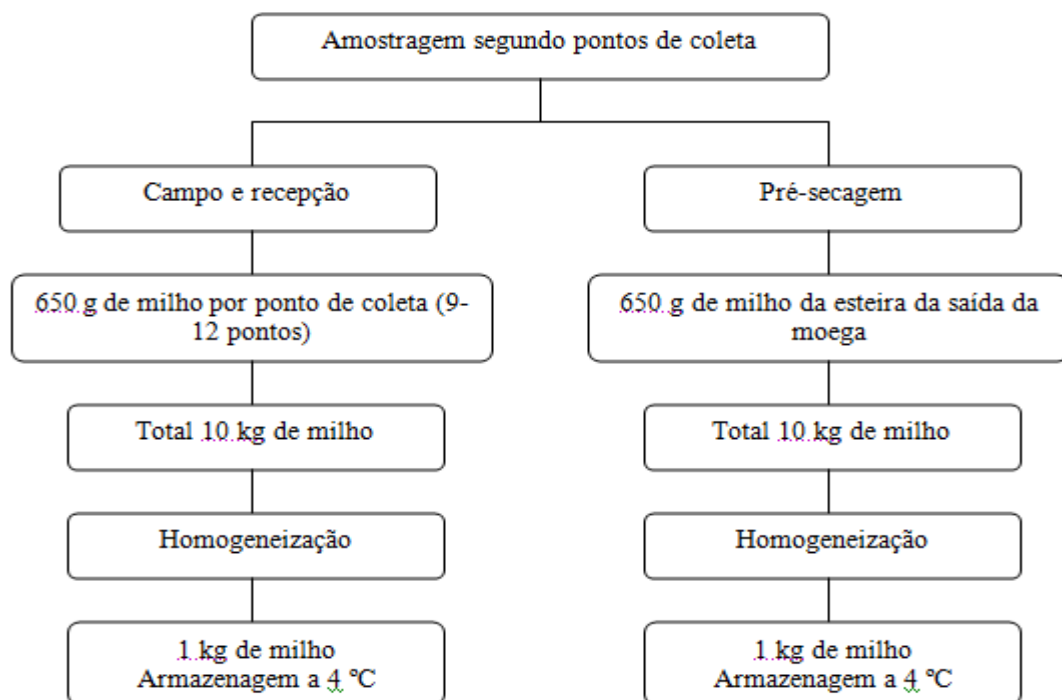


Figura 6 – Fluxograma da amostragem

4.2 DETERMINAÇÃO DE PONTOS DE FLUORESCÊNCIA.

Uma alíquota de 100g da amostra foi triturada e analisada sob luz UV (365 nm) pelos funcionários da indústria processadora de milho. O número de pontos com fluorescência luminosa amarelo-esverdeado (FLAE) foi avaliado, sendo que lotes com três ou mais pontos de fluorescência eram considerados suspeitos para contaminação por aflatoxinas.

4.3 DETERMINAÇÃO DE NITROGÊNIO

A determinação de nitrogênio foi realizada pelo método de Kjeldahl de acordo com o método oficial da AACC (American Association of Cereal Chemists) (AACC, 1990) (Figura 7). Uma alíquota de 0,2 g da amostra previamente homogeneizada, juntamente com o papel de pesagem foi adicionada em tubo digestor contendo 0,2 g de sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), 1,0 g de sulfato de potássio ($\text{K}_2\text{SO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e 5 mL de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4). Em seguida os tubos digeridos foram agitados cuidadosamente e levados para blocos digestores com temperatura de 350 °C, por aproximadamente 5 h. Após a digestão os tubos foram deixados chegar a temperatura ambiente e acrescidos de 10 mL de água destilada e procedido a destilação. Na destilação conectou-se o tubo no destilador, neutralizou com hidróxido de sódio 50% (NaOH) e destilou em ácido bórico 2% (H_3BO_3) com indicador misto contendo verde de bromocresol 0,1% e vermelho de metila 0,1% até um volume de 50 mL do destilado. O destilado foi titulado em H_2SO_4 0,02 N padronizado com carbonato de sódio (Na_2CO_3).

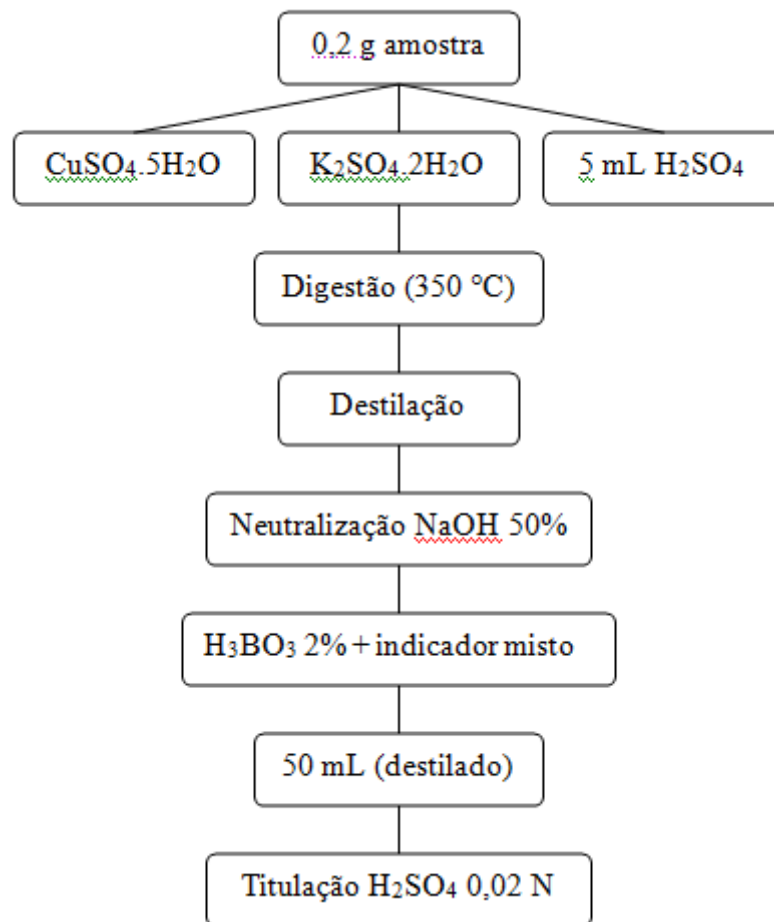


Figura 7 – Determinação de nitrogênio

4.4 AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA FÚNGICA

Duzentos gramas de milho foram triturados até granulometria de 50 “mesh” e homogeneizados. 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 $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de cloranfenicol e incubados a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ por 6 dias, procedendo-se à contagem e identificação dos gêneros de acordo com os métodos preconizados por Nelson et al. (1983), Singh et al. (1991) e Samson et al. (1995b), conforme demonstrado na figura 8.

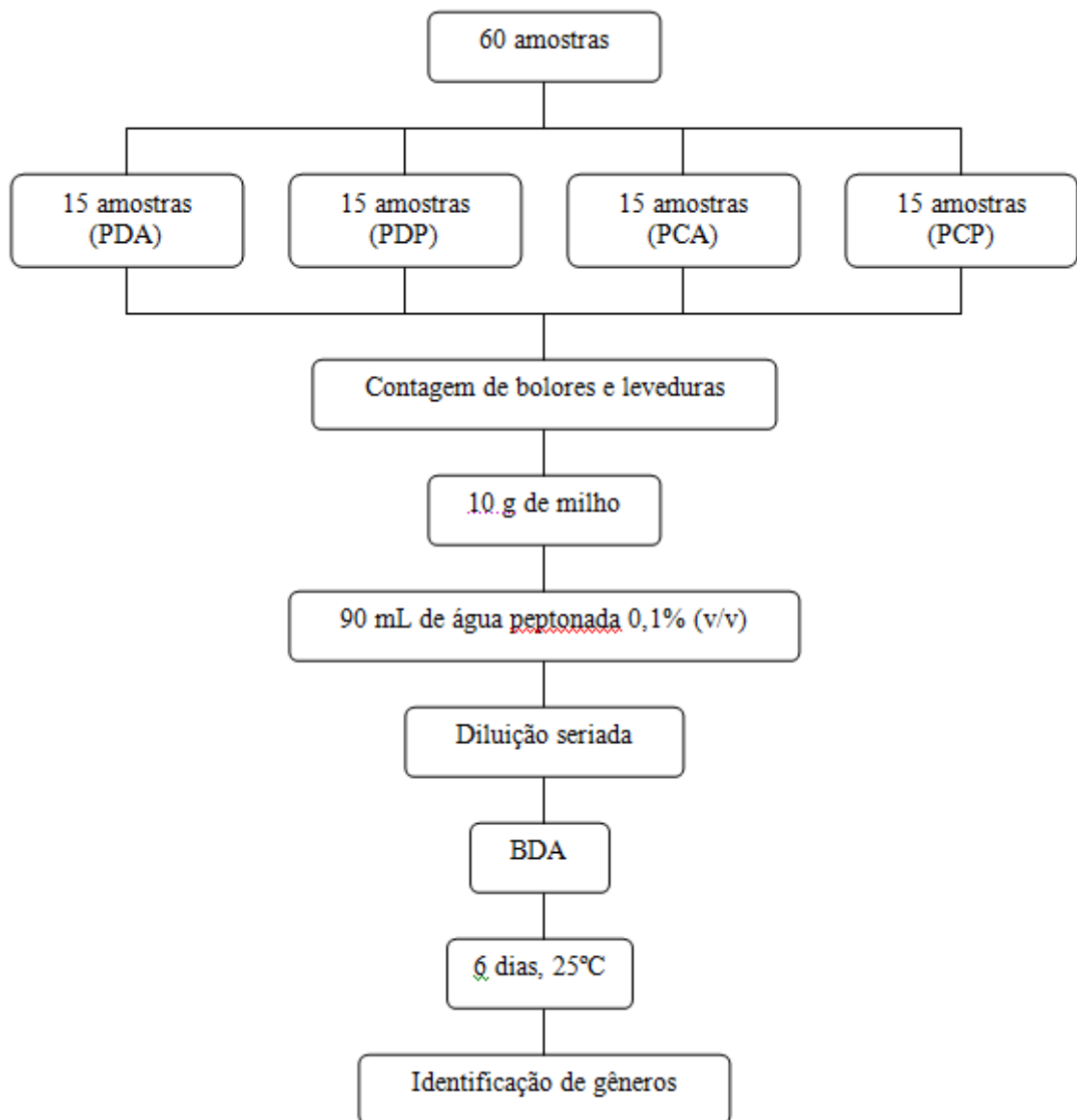


Figura 8 – Contagem de bolores e leveduras

PDA: plantio direto com aveia no inverno

PCA: plantio convencional com aveia no inverno

PDP: plantio direto com pousio no inverno

PCP: plantio convencional com pousio no inverno

4.5 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 r.p.m. 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 μ L de metanol:água (3:1, v/v), a seguir fracionado em alíquotas de 200 μ L e novamente secos sob fluxo de gás N₂ a 45 °C, procedendo-se ao acondicionamento em freezer (-20 °C) para posterior análise de fumonisinas, de acordo com a representação esquemática da figura 9.

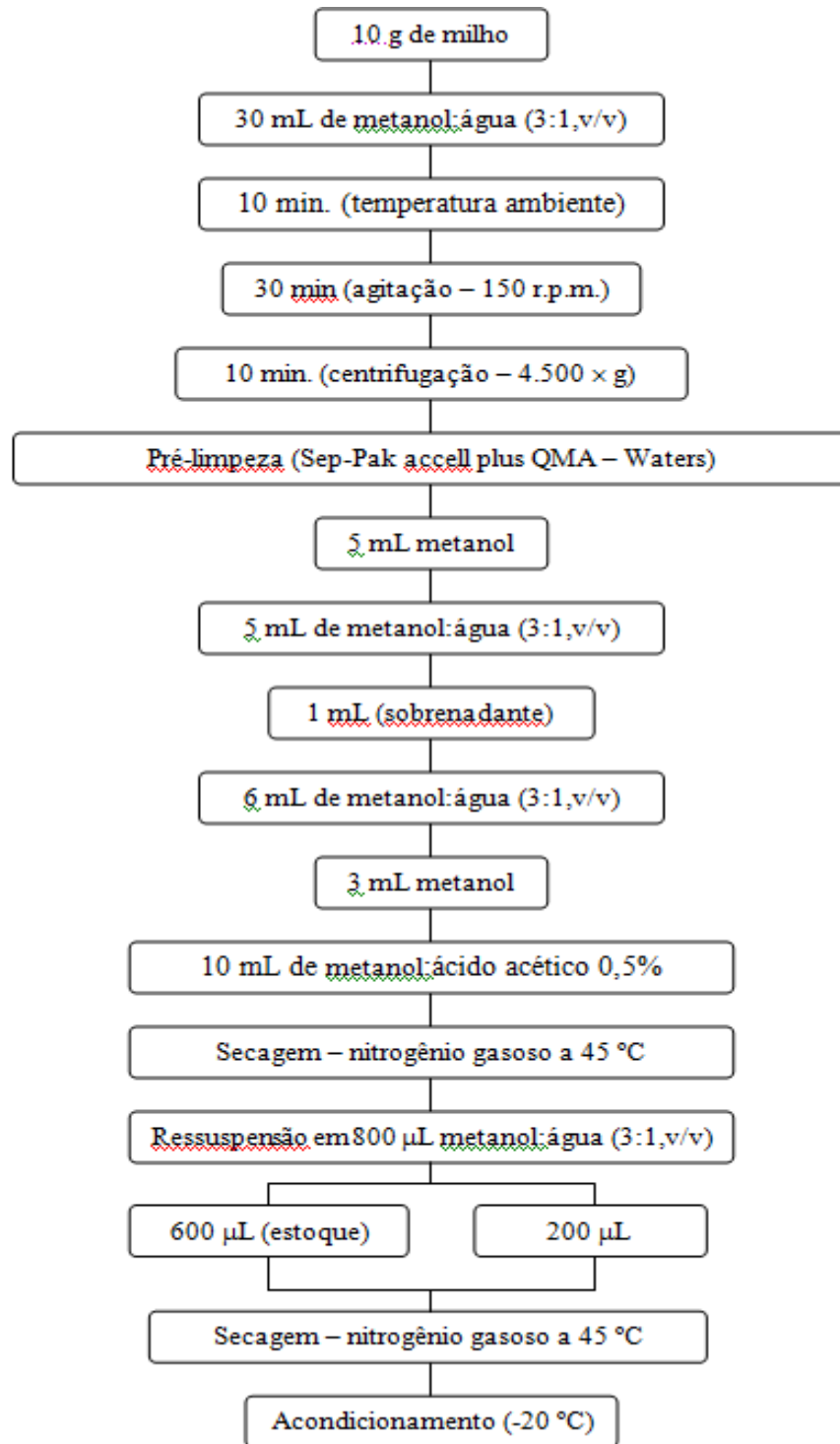


Figura 9 – Extração de fumonisinas

4.6 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) modificado por Ueno et al. (1993) (Figura 10). A alíquota de 200 µL seca sob nitrogênio 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 0,1M e 50 µL de 2-mercaptoetanol), injetado 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.

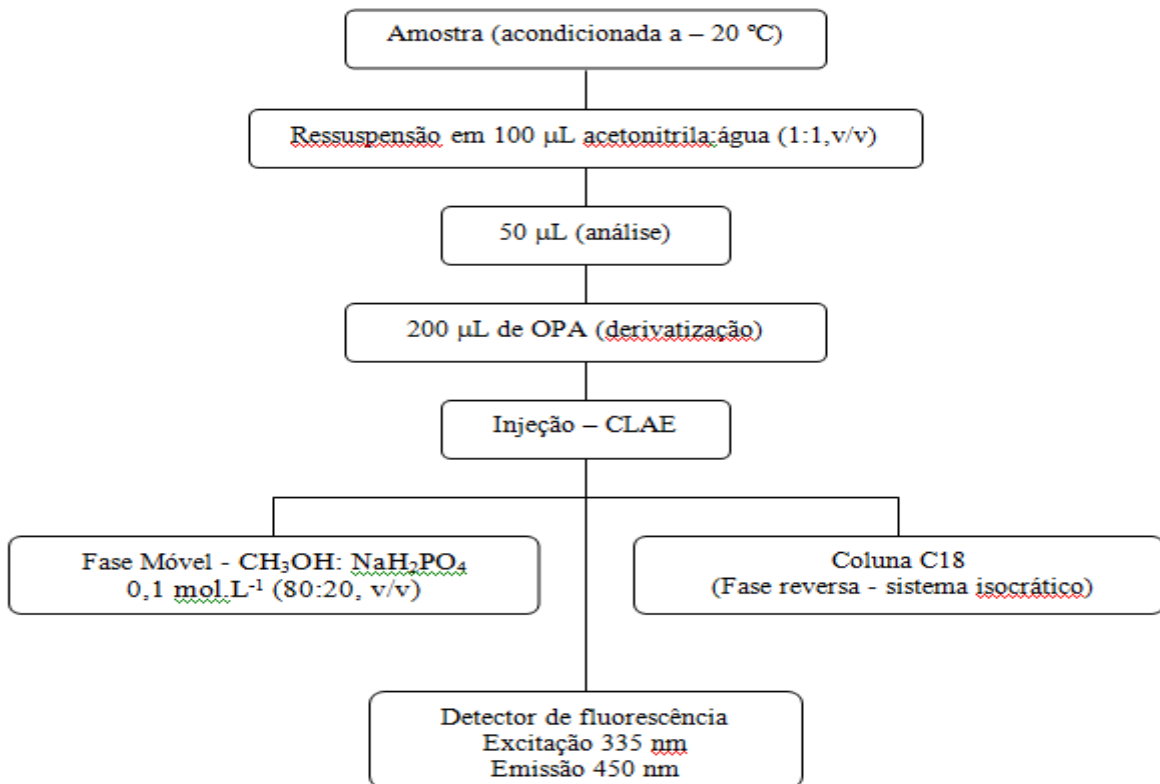


Figura 10 – Determinação de fumonisinas

4.7 EXTRAÇÃO DE AFLATOXINAS

A extração de aflatoxinas foi realizada segundo o método descrito por Soares e Rodriguez-Amaya (1989) (Figura 11). Uma alíquota de 50g da amostra, previamente triturada e homogeneizada, foi acrescida de 270 mL de metanol (CH_3OH) e 30 mL de cloreto de potássio (KCl) 4%, seguida de homogeneização em liquidificador por 5 minutos e filtração em papel de filtro Whatman n°. 4. Uma alíquota de 150 mL do filtrado foi retirada e adicionada de 150 mL de sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 30% e cerca de 20g de celite. Após homogeneização, o material foi filtrado com papel de filtro Whatman n°. 4 e 150 mL do filtrado adicionado de 150 mL de água ultrapura e 10 mL de clorofórmio foram submetidos ao processo de partição em funil de separação. O conteúdo do funil de separação foi agitado por 3 minutos e após 5 minutos de decantação, foram coletados 5 mL, adicionados mais 10 mL de clorofórmio à solução do funil de separação e agitados por mais 3 minutos, decantados por 5 minutos e coletados mais 5 mL. As duas frações de clorofórmio foram reunidas e evaporadas em banho-maria a 50 °C. As amostras foram estocadas a -20 °C até serem analisadas.

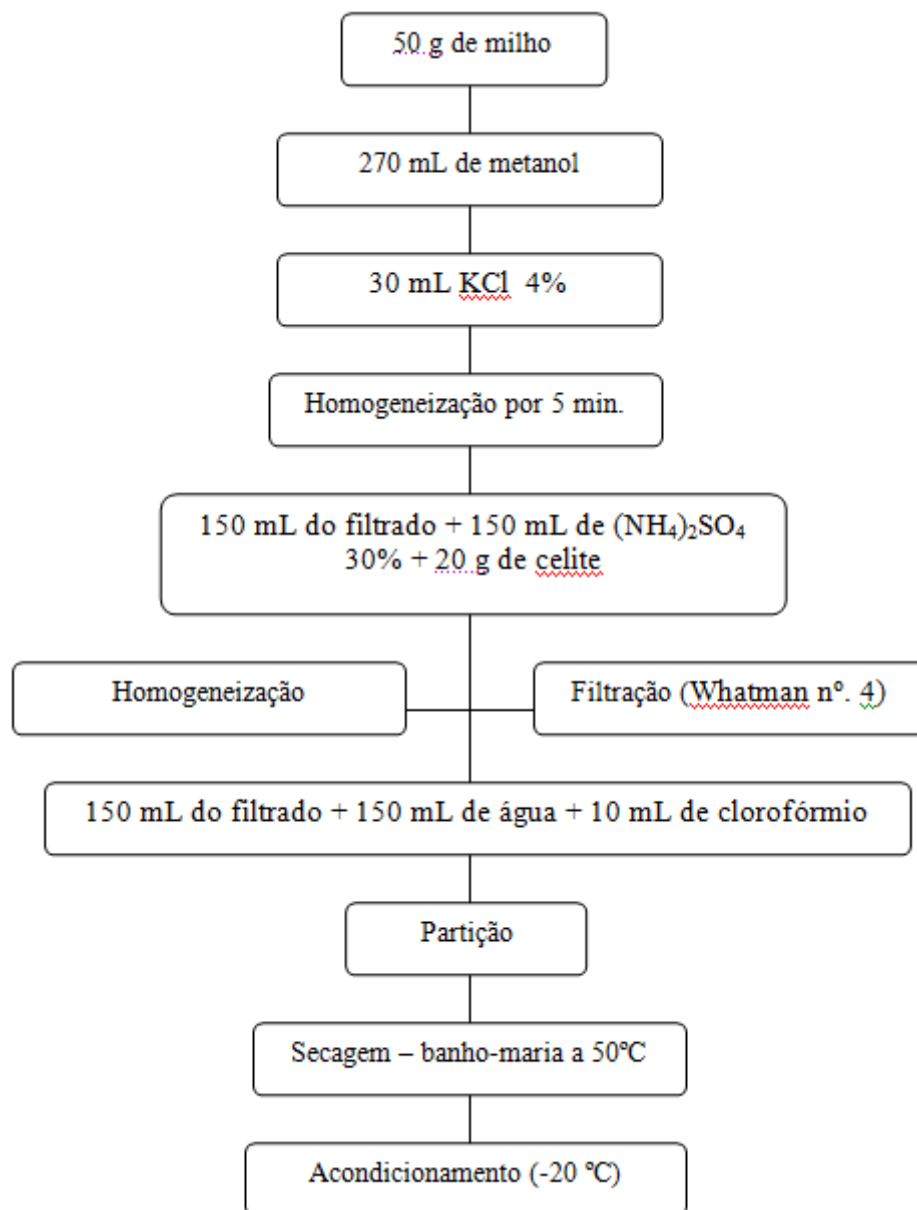


Figura 11 – Extração de aflatoxinas

4.8 DETERMINAÇÃO DE AFLATOXINAS

A determinação de aflatoxinas (AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂) foi realizada segundo Gimeno (1979) em cromatofolhas de alumínio 20 × 20 cm de sílica gel 60 (Merck), utilizando como fase móvel tolueno: acetato de etila: clorofórmio: ácido fórmico, (70:50:50:20, v/v/v/v). O extrato estocado a - 20 °C foi redissolvido em 200 µL de clorofórmio e submetido à cromatografia de camada delgada (CCD), e revelada sob luz

ultravioleta (UV) com comprimento de onda de 366 nm (Figura 12). Os padrões utilizados para qualificar e quantificar as aflatoxinas, foram da marca Sigma ($2,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$), nas concentrações de $0,005 \mu\text{g}$, $0,01 \mu\text{g}$, $0,015 \mu\text{g}$ e $0,02 \mu\text{g}$ para cada micotoxina.

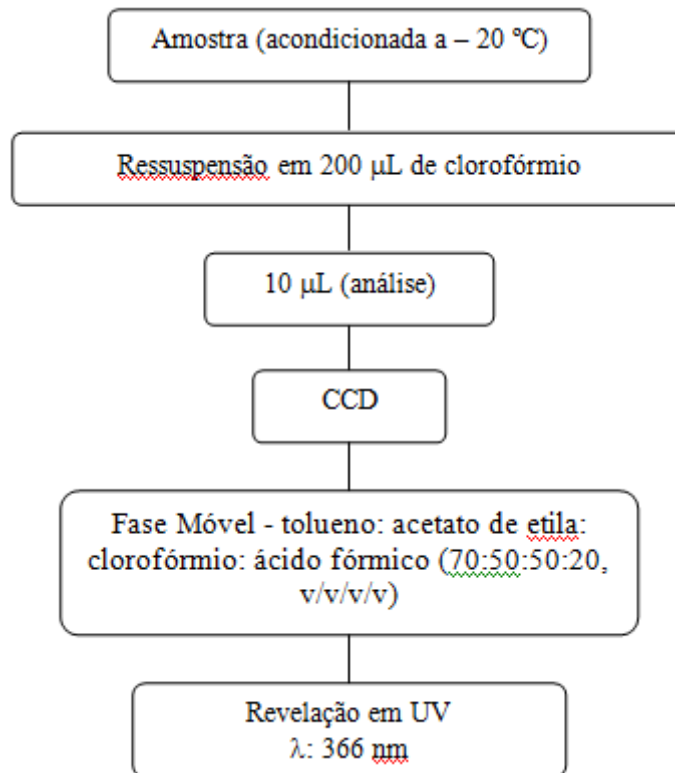


Figura 12 – Determinação de aflatoxinas

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados foi avaliada utilizando ANOVA seguido pelos testes de Tukey, Duncan e teste T-student ($P < 0,05$) e as correlações pelo teste de correlação de Pearson ($p < 0,05$). Toda análise estatística foi realizada pelo software, Statistic 6.0 (Stat Soft, Inc.).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão foram redigidos sob forma de artigos a serem submetidos para publicação, os quais se encontram listados abaixo:

- I. CO-OCORRÊNCIA NATURAL DE FUMONISINAS E AFLATOXINAS EM AMOSTRAS DE MILHO DA REGIÃO NORTE DO PARANÁ.
- II. EFFECT OF DIFFERENT SOIL MANAGEMENT SYSTEMS ON NATURAL FUNGAL CONTAMINATION AND FUMONISIN LEVELS IN CORN.

No primeiro artigo (Co-ocorrência natural de fumonisinas e aflatoxinas em amostras de milho da Região Norte do Paraná) teve como objetivo avaliar a co-ocorrência natural de fumonisinas e aflatoxinas em 300 amostras de milho recém-colhido (Safras 2003 e 2004) da região Norte do Paraná em três pontos da cadeia produtiva: campo, recepção e pré-secagem. As amostras foram coletadas em três empresas processadoras de milho. As fumonisinas foram detectadas na maioria das amostras de milho de ambas as safras, no entanto os níveis de contaminação foram mais baixos na safra de 2004. As aflatoxinas foram detectadas em apenas 24 amostras (8%), sendo que os níveis excederam o limite máximo permitido pela legislação brasileira em 13 amostras (4,3%).

O segundo artigo (Effect of different soil management systems on natural fungal contamination and fumonisin levels in corn) foi avaliado a contaminação fúngica e os níveis de fumonisinas em milho cultivado sob diferentes sistemas de plantio e sucessão de culturas (safras 2006 e 2007). As amostras foram obtidas da Fazenda Escola da Universidade Estadual de Londrina. Os resultados obtidos demonstraram que as amostras submetidas ao sistema de plantio direto apresentaram maior contaminação por fumonisinas.

ARTIGO A

**CO-OCORRÊNCIA NATURAL DE FUMONISINAS E AFLATOXINAS EM
AMOSTRAS DE MILHO DA REGIÃO NORTE DO PARANÁ**

CO-OCORRÊNCIA NATURAL DE FUMONISINAS E AFLATOXINAS EM AMOSTRAS DE MILHO DA REGIÃO NORTE DO PARANÁ

Resumo

A contaminação de milho por fungos toxigênicos reduz a qualidade nutricional e fitossanitária, além de representar riscos à saúde humana e animal. Neste trabalho foi avaliada a co-ocorrência natural de fumonisinas e aflatoxinas em 300 amostras de milho recém-colhido (safra 2003 e 2004) da Região Norte do Paraná. A amostragem foi realizada em três pontos da cadeia produtiva de empresas processadoras de milho, i.e., após a colheita (n=20), na recepção da indústria (n=70) e antes da secagem (n=60) para cada safra. Na safra de 2003, as fumonisinas foram detectadas em 100% das amostras, enquanto as aflatoxinas em 12%. Os níveis de fumonisinas variaram de 0,11 a 15,32 $\mu\text{g.g}^{-1}$ (média 2,84 $\mu\text{g.g}^{-1}$) em amostras de campo, de 0,08 a 8,96 $\mu\text{g.g}^{-1}$ (média 2,46 $\mu\text{g.g}^{-1}$) e de 0,11 a 18,78 $\mu\text{g.g}^{-1}$ (média 2,96 $\mu\text{g.g}^{-1}$) em amostras da recepção e pré-secagem, respectivamente. As aflatoxinas foram detectadas em níveis variando de 5 a 54 ng.g^{-1} (média 21,14 ng.g^{-1}) em amostras da recepção (n=7), de 10 a 56 ng.g^{-1} (média 23,4 ng.g^{-1}) nas de pré-secagem (n=10) e em apenas uma amostra do campo (45 ng.g^{-1}). Por outro lado, na safra de 2004, as fumonisinas foram detectadas em 97% e as aflatoxinas em 4% das amostras. Os níveis de fumonisinas variaram de 0,37 a 1,89 $\mu\text{g.g}^{-1}$ (média 0,94 $\mu\text{g.g}^{-1}$) em amostras de campo, de 0,07 a 18,16 $\mu\text{g.g}^{-1}$ (média 1,41 $\mu\text{g.g}^{-1}$) e de 0,06 a 6,28 $\mu\text{g.g}^{-1}$ (média 1,36 $\mu\text{g.g}^{-1}$) em amostras da recepção e pré-secagem, respectivamente. As aflatoxinas foram detectadas em 5 amostras da pré-secagem com níveis variando de 12 a 52 ng.g^{-1} (média 35,2 ng.g^{-1}) e em apenas uma amostra da recepção (40 ng.g^{-1}). Esses resultados ratificam a importância do constante monitoramento da cadeia produtiva do milho para atender às exigências dos mercados interno e externo e minimizar os riscos à saúde humana e animal.

Palavras-chave: Milho. Fumonisinas. Aflatoxinas. Cadeia produtiva.

Introdução

O Estado do Paraná é o principal produtor de milho (*Zea mays* L.) do Brasil, sendo responsável por 24,4% da produção nacional (CONAB).

Este cereal está sujeito à contaminação por uma ampla variedade de fungos toxigênicos, sendo os de maior ocorrência *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. e *Aspergillus* spp. (CHULZE, et al., 1996; CARDWELL, et al. 2000).

A possibilidade de co-ocorrência de micotoxinas em alimentos é preocupante, devido ao fato de serem desconhecidos os efeitos das interações entre estes compostos. As micotoxinas podem estar presentes em um mesmo substrato. As rações utilizadas na alimentação animal são as mais afetadas por esse problema devido à utilização de diferentes tipos de grãos, de diferentes origens, acarretando a possibilidade da co-

ocorrência de duas ou mais micotoxinas em uma mesma dieta (BERMUDEZ et al., 1997; KUBENA et al., 1997; WEIBKING et al., 1994).

Fusarium verticillioides (Sacc.) Nirenberg (anteriormente denominado de *Fusarium moniliforme* Sheldon) (RHEEDER; MARASAS; VISMER, 2002) é um importante patógeno do milho, sendo considerado um dos principais responsáveis pela podridão de sementes e morte da planta, principalmente quando a semeadura é realizada em condições de estresse, com alta umidade e baixas temperaturas (TANAKA, 2001). A incidência deste fungo e de outras espécies toxigênicas de *Fusarium* e a síntese de toxinas nos produtos agrícolas são determinadas em parte pelo desenvolvimento de fatores no campo, no transporte e no armazenamento (GAMANYA; SIBANDA, 2001).

As fumonisinas são diésteres de propano-1,2,3 ácido tricarboxílico com vários 2 amino-12,16-dimetil-polihidroxi-eicosanos (BEZUIDENHOUT et al., 1988), as de maior ocorrência em milho e derivados são fumonisinas B₁ (FB₁), B₂ (FB₂) e B₃ (FB₃) (MARÍN; SANCHIS; MAGAN, 1995). A FB₁ é a mais abundante, representando 70% a 80% da concentração total em alimentos e sementes naturalmente contaminadas (MURPHY; RICE; ROSS, 1993; MARÍN; SANCHIS; MAGAN, 1995).

Os fungos do gênero *Aspergillus* comumente são encontrados em milho, amendoim, algodão e algumas variedades de nozes (VIQUEZ, 1994), assim como em produtos derivados dessas matérias-primas (GRIFFIN, 1994). O crescimento deste patógeno e a produção de seus metabólitos em seus substratos naturais sofrem influencia de fatores, como a umidade do ambiente, temperatura, componentes minerais, atividade de água do substrato e dos danos físicos (VIQUEZ, 1994).

Esses fungos podem estar presentes em toda cadeia produtiva do produto, iniciar sua colonização imediatamente após o início da formação dos grãos e desenvolver-se durante a maturação e amadurecimento (LACEY et al., 1991).

As aflatoxinas são potentes metabólitos tóxicos sintetizadas principalmente por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, são micotoxinas potencialmente hepatotóxicas, teratogênicas, mutagênicas e carcinogênicas (WIDSTROM, 1996). Existem vários análogos de aflatoxinas conhecidas nesses grupos de fungos, porém as de maior ocorrência em produtos agrícolas são as aflatoxinas B₁ (AFB₁), B₂ (AFB₂), G₁ (AFG₁) e G₂ (AFG₂), sendo a AFB₁ considerada a mais tóxica (FARIAS et al., 2000).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a co-ocorrência de fumonisinas e aflatoxinas em amostras de milho recém-colhido da Região Norte do Paraná em três pontos da cadeia produtiva: campo, recepção e pré-secagem.

Material e Métodos

Amostragem

Um total de 300 amostras de milho recém-colhido foram coletadas de três pontos da cadeia produtiva de três empresas processadoras de milho da região Norte do Paraná. A amostragem foi realizada imediatamente após a colheita (n=20), na recepção da indústria (n=70) e antes da secagem (n=60) para cada safra. A fim de facilitar, as amostras coletadas imediatamente após a colheita, recepção das indústrias e antes da secagem foram denominadas de amostras de campo, recepção e pré-secagem, respectivamente. As amostras de campo e recepção foram coletadas de 9 a 12 pontos da carga do caminhão e reunidas (10 kg), seguindo o protocolo de amostragem estabelecido pela legislação brasileira (BRASIL, 1976). As amostras de campo e recepção foram coletadas do mesmo caminhão, enquanto que as amostras de pré-secagem foram coletadas da esteira que as conduz ao secador, i.e., 650 g a cada 30 min. e reunidas (10 kg). Após a homogeneização, as amostras de milho (1 kg) foram enviadas ao laboratório e mantidas a 4 °C no máximo por 7 dias para a análise microbiológica. Para determinação de fumonisinas e aflatoxinas, 200 g de cada amostra foram triturados até 50 “mesh” e estocados a -20 °C.

Determinação de pontos de fluorescência.

Uma alíquota de 100g da amostra foi triturada e analisada sob luz UV (365 nm) por funcionários da própria indústria processadora de milho. O número de pontos com fluorescência luminosa amarelo-esverdeado (FLAE) foi avaliado, sendo que lotes com três ou mais pontos de fluorescência eram considerados suspeitos para contaminação por aflatoxinas.

Avaliação da microbiota fúngica

Duzentos gramas de milho foram triturados até granulometria de 50 “mesh” e homogeneizados. 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 $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 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), Singh et al. (1991) e Samson et al. (1995).

Determinação 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 r.p.m. por 30 minutos. A suspensão foi centrifugada a $4500 \times g$ por 10 minutos e o sobrenadante 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 N_2 a 45 °C, procedendo-se ao acondicionamento em freezer (-20 °C) para posterior análise de fumonisinas.

A determinação de fumonisinas (FB_1 e FB_2) foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) segundo o método de Shephard et al. (1990) modificado por Ueno et al. (1993). A alíquota de 200 μL seca sob nitrogênio 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 0,1M e 50 μL de 2-mercaptoetanol), injetado 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 $\text{CH}_3\text{OH}:\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 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 FB_1 e de 35,3 ng.g^{-1} para FB_2 .

Determinação de aflatoxinas

A extração de aflatoxinas foi realizada segundo o método descrito por Soares e Rodriguez-Amaya (1989). Uma alíquota de 50g da amostra, previamente triturada e homogeneizada, foi acrescida de 270 mL de metanol (CH_3OH) e 30 mL de cloreto de potássio

(KCl) 4%, seguida de homogeneização em liquidificador por 5 minutos e filtração em papel de filtro Whatman n°. 4. Uma alíquota de 150 mL do filtrado foi retirada e adicionada de 150 mL de sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 30% e cerca de 20g de celite. Após homogeneização, o material foi filtrado com papel de filtro Whatman n°. 4 e 150 mL do filtrado adicionado de 150 mL de água ultrapura e 10 mL de clorofórmio foram submetidos ao processo de partição em funil de separação. O conteúdo do funil de separação foi agitado por 3 minutos e após 5 minutos de decantação, foram coletados 5 mL, adicionados mais 10 mL de clorofórmio à solução do funil de separação e agitados por mais 3 minutos, decantados por 5 minutos e coletados mais 5 mL. As duas frações de clorofórmio foram reunidas e evaporadas em banho-maria a 50 °C. As amostras foram estocadas a -20 °C até serem analisadas.

A determinação de aflatoxinas (AFB_1 , AFB_2 , AFG_1 e AFG_2) foi realizada segundo Gimeno (1979) em cromatofolhas de alumínio 20 × 20 cm de sílica gel 60 (Merck), utilizando como fase móvel tolueno: acetato de etila: clorofórmio: ácido fórmico, (70:50:50:20, v/v/v/v). O extrato estocado a - 20 °C foi redissolvido em 200 μL de clorofórmio e submetido à cromatografia de camada delgada (CCD), e revelada sob luz ultravioleta (UV) com comprimento de onda de 366 nm. Os padrões utilizados para qualificar e quantificar as aflatoxinas, foram da marca Sigma ($2,0 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$), nas concentrações de 0,005 μg , 0,01 μg , 0,015 μg e 0,02 μg para cada micotoxina. O limite de detecção foi $4 \mu\text{g}.\text{kg}^{-1}$

Dados Climatológicos

Os dados climatológicos (temperatura máxima, mínima e média, umidade relativa e índice pluviométrico) dos municípios de Cambará, Bandeirantes e Apucarana referentes aos meses de colheita das amostras de milho, foram fornecidos pelo Instituto Agrônômico do Paraná (IAPAR).

Análise Estatística

Os níveis de fumonisinas totais ($\text{FB}_1 + \text{FB}_2$) e os dados climatológicos foram estatisticamente avaliados utilizando ANOVA seguido por teste de Tukey ($p < 0,05$). Toda análise estatística foi realizada pelo software Statistic 6.0 (Stat Soft, Inc.).

Resultados e discussão

Na tabela 1 estão apresentadas as freqüências absoluta e relativa dos principais gêneros fúngicos em 240 amostras de milho recém-colhido das safras 2003 (n = 150) e safra 2004 (n = 90) da região Norte do Paraná. Os gêneros *Fusarium* e *Penicillium* foram os gêneros de maior ocorrência com 100% e 97,3% (safra 2003) e 100% e 91,1% (safra 2004) respectivamente, em relação ao gênero *Aspergillus* com 37,3% (safra 2003) e 3,3% (safra 2004).

A alta freqüência de *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp. está de acordo com os dados relatados por Ono et al. (1999) e Almeida et al. (2002). Ono et al. (1999) analisando 150 amostras de milho recém-colhido de três regiões do Estado do Paraná (Centro-Sul, Centro-Oeste e Norte), detectaram *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp. em 98,7% a 100% das amostras quando comparada a 27,7% e 2,7% para *Aspergillus* spp. em amostras das regiões Centro-Oeste e Norte, respectivamente. Almeida et al. (2002) demonstraram a predominância de *Fusarium verticillioides* 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.

Como apresentado na tabela 2, *Fusarium* spp. foi detectado na faixa de 10^2 a 10^5 UFC.g⁻¹ em amostras da recepção (n = 70), pré-secagem (n = 60) e campo (n = 20) da safra de 2003, assim como em amostras de recepção (n = 30) da safra de 2004, enquanto que nas amostras de campo (n = 20) da safra de 2004 situou-se na faixa de 10^3 a 10^4 UFC.g⁻¹. A média de *Fusarium* spp. apresentou-se constante situando na faixa de 10^4 UFC.g⁻¹ em todas as etapas de ambas as safras. A média de contaminação por *Penicillium* spp. situou-se na faixa de 10^3 UFC.g⁻¹ em amostras de campo e na faixa de 10^4 UFC.g⁻¹ nas amostras de recepção de ambas as safras. *Aspergillus* spp. apresentou a menor faixa de contaminação dentre os gêneros fúngicos, sendo a maior média ($1,1 \times 10^4$ UFC.g⁻¹) detectada em amostras da recepção da safra de 2003.

Na tabela 3 estão apresentados os pontos de fluorescência e a contaminação natural por fumonisinas e aflatoxinas em 300 amostras de milho da Região Norte do Paraná em três pontos de coleta (campo, recepção e pré-secagem). Os pontos de fluorescência foram detectados em 20%, 32,9% e 15% das amostras de campo, recepção e pré-secagem, respectivamente da safra de 2003. Na safra de 2004 nenhum ponto de fluorescência foi detectado nas amostras, embora as aflatoxinas tenham sido detectadas indicando que nem sempre o teste para detecção dos pontos de fluorescência está associado à contaminação por

aflatoxinas, uma vez que as amostras possuem compostos interferentes na matriz do milho que emitem fluorescência no mesmo comprimento de onda fornecendo resultados falso-positivos (THOMPSON; HENKE, 2000). Além disso, as aflatoxinas também podem estar presentes em regiões mais internas do grão impedindo a detecção por esse método em grãos íntegros e fornecendo resultados falso-negativos (SHOTWELL; GOULDEN; HESSELTINE, 1974). Uma alternativa para evitar resultados falso-negativos consiste na trituração da amostra (SHOTWELL; HESSELTINE, 1981). Em relação à contaminação por micotoxinas, amostras da safra de 2003 apresentaram maior contaminação por fumonisinas e aflatoxinas em comparação as da safra de 2004. As fumonisinas foram detectadas em 100% das amostras com níveis variando de 0,11 a 15,32 $\mu\text{g.g}^{-1}$ (média 2,84 $\mu\text{g.g}^{-1}$) em amostras de campo, de 0,08 a 8,96 $\mu\text{g.g}^{-1}$ (média 2,46 $\mu\text{g.g}^{-1}$) e de 0,11 a 18,78 $\mu\text{g.g}^{-1}$ (média 2,96 $\mu\text{g.g}^{-1}$) em amostras da recepção e pré-secagem, respectivamente. As aflatoxinas foram detectadas em 12% das amostras com níveis variando de 5 a 54 ng.g^{-1} (média 21,14 ng.g^{-1}) em amostras da recepção (n=7), de 10 a 56 ng.g^{-1} (média 23,4 ng.g^{-1}) nas de pré-secagem (n=10) e em apenas uma amostra do campo (45 ng.g^{-1}). Por outro lado, na safra de 2004, os níveis de fumonisinas variaram de 0,37 a 1,89 $\mu\text{g.g}^{-1}$ (média 0,94 $\mu\text{g.g}^{-1}$) em amostras de campo, de 0,07 a 18,16 $\mu\text{g.g}^{-1}$ (média 1,41 $\mu\text{g.g}^{-1}$) e de 0,06 a 6,28 $\mu\text{g.g}^{-1}$ (média 1,36 $\mu\text{g.g}^{-1}$) em amostras da recepção e pré-secagem, respectivamente. Não houve diferença estatística pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) das médias de fumonisinas entre as amostras de campo, recepção e pré-secagem em ambas as safras. As aflatoxinas foram detectadas em 5 amostras da pré-secagem com níveis variando de 12 a 52 ng.g^{-1} (média 35,2 ng.g^{-1}) e em apenas uma amostra da recepção (40 ng.g^{-1}).

Ono et al. (2001), avaliando a co-ocorrência natural de fumonisinas e aflatoxinas em 150 amostras de milho do Estado do Paraná (Centro-Oeste, Norte e Sul), detectaram fumonisinas em 98% (n=147) das amostras, porém as aflatoxinas detectadas foram detectadas em 19,8% das amostras (n = 86) pertencentes a região Centro-Oeste. A positividade para fumonisinas foi de 92,6% (n=25) com níveis variando de 0,096 a 2,88 $\mu\text{g.g}^{-1}$ (média $1,14 \pm 0,79 \mu\text{g.g}^{-1}$) na região Sul, de 98,8% (n=85) com níveis variando de 0,44 a 22,0 $\mu\text{g.g}^{-1}$ (média $5,08 \pm 4,36 \mu\text{g.g}^{-1}$) e de 100% (n=37) com níveis variando de 0,74 a 24,6 $\mu\text{g.g}^{-1}$ (média $9,85 \pm 6,07 \mu\text{g.g}^{-1}$) nas regiões Centro-Oeste e Norte, respectivamente. As aflatoxinas foram detectadas apenas em amostras da região Centro-Oeste, com níveis variando de 38,0 a 460,0 ng.g^{-1} (média de 191 ng.g^{-1}).

Abbas et al. (2006) avaliando 65 híbridos de milho provenientes de Arkansas (EUA) em 2001 detectaram fumonisinas em todos os híbridos variando de 8 a 83,6 $\mu\text{g.g}^{-1}$ e níveis de aflatoxina de $<5 \text{ ng.g}^{-1}$ a 131 ng.g^{-1} .

Os dados climatológicos de três municípios da região Norte do Paraná durante os meses de colheita (safra 2003 e 2004), assim como os níveis médios de fumonisinas estão apresentados na tabela 4. A comparação múltipla das temperaturas máxima, mínima e média, umidade relativa e precipitação pluviométrica pelo teste de Tukey, indicou não haver diferença significativa entre os três municípios. Em relação aos níveis de fumonisinas as amostras da safra de 2003 apresentaram maior contaminação em comparação a safra de 2004, sendo a região de Bandeirantes a que apresentou a maior média ($5,98 \pm 5,98 \mu\text{g.g}^{-1}$) no mês de fevereiro no qual ocorreu maior precipitação pluviométrica (234 mm) com temperaturas máxima de $32,2 \text{ }^\circ\text{C}$. O crescimento fúngico e a síntese de seus metabólitos nos substratos naturais são influenciados por diversos fatores, entre eles a umidade do ambiente, temperatura, os componentes minerais e a atividade de água do substrato. Os fungos de campo nos quais se enquadra o gênero *Fusarium*, requerem alto teor de umidade (20–21%) (CHRISTENSEN; SAUER, 1982; KPODO; THRANE; HALD, 2000).

Tabela 1 – Frequência absoluta e relativa dos principais gêneros fúngicos em grãos de milho recém-colhido da Região Norte do Estado do Paraná (Safra 2003 e 2004)

Gêneros fúngicos	Safras			
	2003 (n = 150)		2004 (n = 90)	
	FA	FR	FA	FR
<i>Fusarium</i> spp.	150	100	90	100
<i>Penicillium</i> spp.	146	97,3	82	91,1
<i>Aspergillus</i> spp.	56	37,3	3	3,3

FA = Frequência absoluta
FR = Frequência relativa (%)

Tabela 2 – Contagem de bolores e leveduras de amostras de milho da Região Norte do Paraná (Safra 2003 e 2004)

Safra	Ponto de Coleta	<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	
		Média	Variação	Média	Variação	Média	Variação	Média	Variação
2003	Campo (n = 20)	$2,7 \times 10^4$	$1,0 \times 10^2 - 1,5 \times 10^5$	$7,2 \times 10^3$	$1,0 \times 10^2 - 5,5 \times 10^4$	$7,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^2 - 1,0 \times 10^3$	$8,0 \times 10^4$	$5,2 \times 10^3 - 2,3 \times 10^5$
	Recepção (n = 70)	$2,4 \times 10^4$	$2,0 \times 10^2 - 2,5 \times 10^5$	$1,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^2 - 7,0 \times 10^4$	$1,1 \times 10^4$	$1,0 \times 10^2 - 1,5 \times 10^4$	$1,2 \times 10^5$	$2,3 \times 10^3 - 1,5 \times 10^6$
	Pré-secagem (n = 60)	$2,4 \times 10^4$	$1,5 \times 10^2 - 2,0 \times 10^5$	$1,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^2 - 8,0 \times 10^4$	$6,8 \times 10^3$	$1,0 \times 10^2 - 1,0 \times 10^5$	$6,6 \times 10^4$	$2,0 \times 10^3 - 4,9 \times 10^5$
2004	Campo (n = 20)	$2,5 \times 10^4$	$1,2 \times 10^3 - 8,0 \times 10^4$	$7,6 \times 10^3$	$1,0 \times 10^3 - 4,0 \times 10^4$	$3,0 \times 10^2$	-	$5,5 \times 10^4$	$7,8 \times 10^3 - 1,7 \times 10^5$
	Recepção (n = 70)	$4,8 \times 10^4$	$8,0 \times 10^2 - 6,5 \times 10^5$	$1,4 \times 10^4$	$5,0 \times 10^2 - 3,0 \times 10^5$	$5,0 \times 10^2$	-	$1,1 \times 10^5$	$3,1 \times 10^3 - 9,6 \times 10^5$

n = número de amostras

Tabela 3 – Contaminação de fumonisinas e aflatoxinas em 300 amostras de milho da Região Norte do Paraná (Safras 2003 e 2004)

Safras	Ponto de Coleta	Fumonisinas			Aflatoxinas			Amostras com pontos de fluorescência (%)
		Amostras positivas (%)	Média* (µg/g)	Varição (µg/g)	Amostras positivas (%)	Média (ng/g)	Varição (ng/g)	
2003	Campo (n = 20)	100	2,84 ^{ab}	0,11 – 15,32	5	45	0 – 45	20
	Recepção (n = 70)	100	2,46 ^{ab}	0,08 – 8,96	10	21,14	5 – 54	32,9
	Pré-secagem (n = 60)	100	2,96 ^a	0,11 – 18,78	16,67	23,4	10 – 56	15
2004	Campo (n = 20)	95	0,94 ^b	0,37 – 1,89	ND	ND	ND	ND
	Recepção (n = 70)	100	1,41 ^b	0,07 – 18,16	5	40	0 – 40	ND
	Pré-secagem (n = 60)	95	1,36 ^b	0,06 – 6,28	8,33	35,2	12 – 52	ND

ND: Não Detectado; *As médias seguidas das mesmas letras não apresentaram diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) para cada safra. n = número de amostras

Tabela 4 – Dados climatológicos e medias de fumonisinas em amostras de milho em três municípios da região Norte do Paraná.

Municípios	Ano	Mês	n	Total FB ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Tmax (°C)	Tmin (°C)	Tmédia (°C)	UR (%)	Precipitação pluviométrica (mm)
Cambará	2003	Mar	7	2,69 ± 1,87	30,9 ^a	19,1 ^a	23,8 ^a	75,3 ^a	141 ^a
	2004	Mar	32	0,85 ± 0,72	31,0 ^a	17,9 ^a	23,4 ^a	68,9 ^a	21 ^a
Bandeirantes	2003	Fev	4	5,98 ± 5,98	32,2 ^a	21,2 ^a	25,6 ^a	77,7 ^a	234 ^a
	2003	Mar	28	2,08 ± 2,66	31,1 ^a	19,5 ^a	24,4 ^a	71,3 ^a	87 ^a
	2004	Mar	8	1,01 ± 0,48	31,0 ^a	18,0 ^a	23,7 ^a	67,3 ^a	72 ^a
Apucarana	2003	Fev	21	2,23 ± 2,43	30,5 ^a	20,1 ^a	24,5 ^a	78,6 ^a	147 ^a
	2003	Mar	29	2,69 ± 2,25	30,6 ^a	18,7 ^a	24,0 ^a	69,7 ^a	60 ^a
	2004	Jan	2	1,47 ± 0,50	30,0 ^a	17,5 ^a	23,1 ^a	67,2 ^a	108 ^a
	2004	Mar	46	1,68 ± 2,61	28,4 ^a	17,6 ^a	22,4 ^a	75,0 ^a	102 ^a
	2004	Abr	2	1,06 ± 0,45	21,0 ^a	12,3 ^a	16,2 ^a	63,0 ^a	117 ^a

*Médias dos dados climatológicos (Tmax, Tmin, Tmédia, UR) e a precipitação pluviométrica seguidos pela mesma letra não apresentam diferença estatística significativa pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).

n = número de amostras; FB total = FB₁ + FB₂; Tmax = temperatura máxima; Tmin = temperatura mínima; Tmédia = temperatura média; UR = umidade relativa.

Os resultados obtidos mostram que apenas um percentual de 8% das amostras da região Norte do Paraná, estavam contaminadas simultaneamente por fumonisinas e aflatoxinas, sendo que níveis baixos dessas micotoxinas foram detectados na maioria das amostras. Entretanto se faz necessário um constante monitoramento da cadeia produtiva do milho quer seja para atender as exigências do mercado interno e/ou externo, de modo a minimizar os riscos a saúde humana e animal.

Agradecimentos

Os autores agradecem à FINEP (Financiadora de Estudos e Projetos), ao Fundo Paraná/SETI, a Fundação Araucária e CNPq pelo apoio financeiro e pela concessão de bolsa. Os autores também agradecem às cooperativas pelo fornecimento de amostras de milho e à ADETEC (Agência de Desenvolvimento Tecnológico da Cidade de Londrina e Região) pelo apoio e gerenciamento administrativo do projeto.

Referências

- ABBAS, H.K.; CARTWRIGHT, R.D.; XIE, W.; SHIER, W.T. Aflatoxin and fumonisin contamination of corn (maize, *Zea mays*) hybrids in Arkansas. **Crop Protection**, v.25, p.1-9, 2006.
- ALM EIDA, P.A.; FONSECA, H.; FANCELLI, A.L.; DIREITO, G.M.; ORTEGA, E.M.; CORREIA, B. Mycoflora and Fumonisin Contamination in Brazilian Corn from Sowing to Harvest. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.3877-3882, 2002.
- BERMUDEZ, A.J.; LEDOUX, D.R.; ROTTINGHAUS, G.E.; BENNETT, G.A. The individual and combined effects of the *Fusarium* mycotoxins moniliformin and fumonisin B₁ in turkeys. **Avian Diseases**, v.41, p.304-311, 1997.
- BEZUIDENHOUT, S.C.; GELDERBLOM, W.C.A.; GORST-ALLMAN, C.P.; HORAK, R.M.; MARASAS, W.F.O.; SPITELLER, G.; VLEGGAR, R. Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, p.743-745, 1988.
- BRASIL, Portaria n. 845 de 8 de novembro de 1976. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, 30 de nov. 1976.
- CARDWELL, K.F.; KING, J.G.; MAZIYA-DIXON, B.; BOSQUE-PEREZ, N.A. Interactions between *Fusarium verticillioides*, *Aspergillus flavus*, and insect infestation in four maize genotypes in Lowland Africa. **Phytopathology** v.90, p.276–284, 2000.
- CHRISTENSEN, C.N.; SAUER, D.B. Mycoflora: In: Christensen, C.N. (ed.). **Storage of cereal grains and their products**. Minnesota: American Association of Cereal Chemists, 1982, p.219-240.
- CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Safras de grãos: Brasil/produtores**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/BrasilProdutoSerieHist.xls>. Acesso em: 13 nov. 2007.
- CHULZE, S.N.; RAMIREZ, M.L.; FARNOCHI, M.; PASCALE, M.; VISCONTI, A.; MARCH, G. *Fusarium* and fumonisins occurrence in Argentinian corn at different ear maturity stages. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p.2797–2801, 1996.
- FARIAS, A.X.; ROBBS, C.F.; BITTENCOURT, A.M.; ANDERSEN, P.M.; CORRÊA, T.B.S. Contaminação endógena por *Aspergillus* spp. em milho pós-colheita no estado do Paraná. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, p.617-621, 2000.
- GAMANYA, R.; SIBANDA, L. Survey of *Fusarium moniliforme* (*F. verticillioides*) and production of fumonisin B₁ in cereal grains and oilseeds in Zimbabwe. **International Journal of Food Microbiology**, v.71, p.145-149, 2001.
- GIMENO, A. Thin layer chromatographic determination of aflatoxins, ochratoxins, sterigmatocystin, zearalenone, citrinin, T-2 toxin, diacetoxyscirpenol, penicillic acid, patulin and penitrem. **Journal - Association of Official Analytical Chemists**, v.62, p.579-585, 1979.

GRIFFIN, D.H. Introduction to the Fungi. In: _____ **Fungal Physiology**. 2.ed. New York: Wiley-Liss, 1994.

KPODO, K.; THRANE, U.; HALD, B. *Fusaria* and fumonisins in maize from Ghana and their co-occurrence with aflatoxins. **International Journal of Food Microbiology**, v.61, p.147-157, 2000.

KUBENA, L. F.; HARVEY, R. B.; BUCKLEY, T. S.; EDRINGTON, T. S.; ROTTINGHAUS, G. E. Individual and combined effects of moniliformin present in *Fusarium fujikuroi* culture material and aflatoxin in broiler chicks. **Poultry Science**, v.76, p.265-270, 1997.

LACEY, J.; RAMAKRISHNA, N.; HAMER, A.; MAGAN, N.; MARFLEET, I.C. Grain fungi. In: ARORA, D. K.; MUKERJI, K. G.; MARTH, E. H. **Handbook of Applied Mycology**, New York, 1991. p.121-178.

MARÍN, S.; SANCHIS, V.; MAGAN, N. Water activity, temperature, and pH effects on growth of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* isolates from maize. **Canadian Journal of Microbiology**, v.41, p.1063-1070, 1995.

MURPHY, P.A.; RICE, L.G.; ROSS, P.F. Fumonisin B₁, B₂ and B₃ content of Iowa, Wisconsin, and Illinois corn and corn screenings. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.41, p.263-266, 1993.

NELSON, P.E., TOUSSON, T.A., MARASAS, W.F.O. *Fusarium* species – An illustrated manual for identification. Pennsylvania: **Pennsylvania State University Press**, 1983.

ONO, E.Y.S.; ONO, M.A.; FUNO, F.Y.; MEDINA, A.E.; OLIVEIRA, T.C.R.M.; KAWAMURA, O.; YOSHIO, U.; HIROOKA, E.Y. Evaluation of fumonisin-aflatoxin co-occurrence in Brazilian corn hybrids by ELISA. **Food Additives and Contaminants**, v.18, p.719-729, 2001.

ONO, E.Y.S.; SUGIURA, Y.; HOMECHIM, M.; KAMOGAE, M.; VIZZONI, E.; UENO, Y.; HIROOKA, E.Y. Effect of climatic conditions on natural mycoflora and fumonisins in freshly harvested corn of the State of Paraná, Brazil. **Mycopathologia**, v.147, p.139-148, 1999.

RHEEDER, J.P.; MARASAS, W.F.O.; VISMER, H.F. Production of Fumonisin Analogs by *Fusarium* Species. **Applied and Environmental Microbiology**, n.5, v.68, p.2101-2105, 2002.

SAMSON, R.A., HOESKSTRA, E.S., FRISVAD, J.C., FILTENBORG, O. **Introduction to food-borne fungi**. 4.ed. The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 1995.

SHEPHARD, G.S., SYDENHAM, E.W., THIEL, P.G., GELDERBLUM, W.C.A. Quantitative determination of fumonisins B₁ and B₂ by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Liquid Chromatography**, v.13., p.2077-2087, 1990.

SHOTWELL, O.L.; GOULDEN, M.L.; HESSELTINE, C.W. Aflatoxin: distribution in contaminated corn. **Cereal Chemistry**, v.51, p.492-499, 1974.

SHOTWELL, O.L.; HESSELTINE, C.W. Use of bright greenish yellow fluorescence as presumptive test for aflatoxin in corn. **Cereal Chemistry**. V.58, p.124-127, 1981.

SINGH, K., FRISVAD, J.C., THRANE, U., MATHUR, S.B. An illustrated manual on identification of some seed-borne *Aspergilli*, *Fusaria*, *Penicillia* and their mycotoxins. Hellerup/Denmark/: **Danish Government**, 1991.

SOARES, L. M. V.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Survey of aflatoxins, ochratoxins, zearalenone and sterigmatocystin in some Brazilian foods by using mult-toxin thin layer chromatographic method. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, v.72, p.22-26, 1989.

TANAKA, M.A.S. Sobrevivência de *Fusarium moniliforme* em sementes de milho mantidas em duas condições de armazenamento. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, p.60-64, 2001.

THOMPSON, C.; HENKE, S.E. Effect of climate and type of storage container on aflatoxin production in corn and its associated risks to wildlife species. **Journal of Wildlife Diseases**, v.36, p.172-179, 2000.

UENO, Y., AOYAMA, S., SUGIURA, Y., WANG, D.S., LEE, U.S., HIROOKA, E.Y., HARA, S., KARKI, T., CHEN, G., YU, S.Z. A limited survey of fumonisins in corn and corn-based products in Asian countries. **Mycotoxin Research**, v.9, p.27-34, 1993.

VIQUEZ, O.M.; PERES, M.E.C.; SHELBY, R.A.; BROWN, G. Aflatoxin contamination in corn samples due to environmental conditions, aflatoxin-producing strains, and nutrients in grain grown in Costa Rica. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.42, p. 2551-2555, 1994.

WEIBKING, T.S.; LEDOUX, D.R.; BERMUDEZ, A.J.; ROTTINGHAUS, G.E. Individual and combined effects of feeding *Fusarium moniliforme* culture material, containing known levels of fumonisin B1 and aflatoxin B1 in the young turkey poult. **Poultry Science**, v.73, p.1517-1525, 1994.

WIDSTROM, N.W. The aflatoxin problem with corn grain. **Advances in Agronomy**, v.56, p.219-280, 1996.

ARTIGO B

**EFFECT OF DIFFERENT SOIL MANAGEMENT SYSTEMS ON NATURAL
FUNGAL CONTAMINATION AND FUMONISIN LEVELS IN CORN**

EFFECT OF DIFFERENT SOIL MANAGEMENT SYSTEMS ON NATURAL FUNGAL CONTAMINATION AND FUMONISIN LEVELS IN CORN

Abstract

In this study the effect of different soil management systems and culture successions on natural fungal contamination and fumonisin levels in corn was evaluated. The soil tillage systems consisted of conventional and no-tillage area cultivated with corn in the summer followed either by oat or fallow in the winter (2006 and 2007 crops). In addition, in 2006 crop the effect of nitrogen fertilizer application on fumonisin contamination was evaluated. The side dressing N-rates applied were: 0, 22.5, 45.0 and 90.0 Kg.ha⁻¹ and supplementation with potassium oxide (K₂O) using potassium chloride as potassium source (90.0 Kg.ha⁻¹ N + 13.2 Kg.ha⁻¹ K₂O). In both crops, no-tillage corn followed by oat showed the highest mean fumonisin levels and differed significantly (P<0.05) from all the others (2006 crop) and from conventional tillage corn followed either by oat or fallow in the winter (2007 crop). Fumonisin levels and the side dressing N-rates ($\rho = -0.313$) showed negative correlation ($p < 0.05$). These results indicated that agricultural practices can influence the fumonisin content in corn kernels and are important tools for minimizing mycotoxin contamination in order to assure the quality and safety of products.

Keywords: Corn. No tillage. Conventional tillage. Culture succession. Mycotoxin.

Introduction

Corn (*Zea mays* L.) is one of the main crops in Brazil. During the harvest season 2006/2007 corn production reached 42.5 million tons, ranking the country as the third largest corn producer in the world (CONAB 2007). Southern Brazil produces 45% of Brazilian corn, whereas the State of Paraná accounts for 25% of the Brazilian production (CONAB 2007).

Corn grains can be contaminated by a variety of toxigenic mould species. *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg is a primary corn pathogen and one of the main fumonisin producers. It has caused stalk, root and ear rot resulting in severe economic losses in corn crops (NELSON, 1992). Although 28 fumonisin analogues has been characterized since 1988 (RHEEDER et al. 2002), fumonisins B₁ (FB₁), B₂ (FB₂) and B₃ (FB₃) are the most frequent in corn and corn-based products (THIEL et al. 1991).

Fumonisin cause leukoencephalomalacia in equines (MARASAS et al. 1988), pulmonary edema in swine (ROSS et al. 1990), hepatocarcinoma in rats (NORRED; VOSS 1994) and immunosuppression in poultry (WEIBKING et al. 1993). In humans, epidemiological studies indicate its association with esophageal cancer and primary liver

cancer (GELDERBLUM et al. 1992; UENO et al. 1997). Taking into account the high corn contamination by *F. verticillioides* and fumonisins, their evaluation is essential in order to establish a proposal for the maximum concentration to be tolerated during the quality control of products intended for human and animal consumption.

The best strategy for the effective control of fumonisin contamination is the prevention of *F. verticillioides* infection and fumonisin production in the field and during storage. The major strategies for corn phytosanitary control involve the use of pesticides and the application of agricultural practices, e.g., nutrition tillage and crop rotation. The latter affect the chemical and biological characteristics of soil and, therefore, the cereal microflora (ROTHROCK, 1992).

In Brazil, two planting systems, conventional tillage and no tillage are used in the corn producing area. Nowadays, no tillage is preferred due to the inclusion of crop debris, soil moisture retention and slow and gradual decomposition.

The conventional tillage provides adequate conditions for seed germination, root growth and development with the aim of increasing productivity (SCHULTZ, 1978), besides reducing the problems caused by the pests which remain at least one phase of their biological cycle in soil or on its surface (BIANCO, 1985). On the other hand, no tillage offers new possibilities to reduce cost of production and erosion (BOCKUS; SHROYER, 1998).

Taking into account that agronomic practices are one of the approaches to minimize toxigenic fungi contamination, in this study the effect of two different soil management systems and culture successions on natural fungal contamination and fumonisin levels in corn was evaluated

Material and Methods

Characterization of experimental site

This study was carried out at the experimental farm of State University of Londrina (Oxisol), Northern region of Paraná State, Brazil (Figure 1) during 2006 and 2007 crops. Londrina municipality (23°37'00"S; 51°17'00"W-GR, altitude 585 m) consists of 1728.7 km² (CITY BRAZIL, 2008) and is characterized as a mesothermic humid subtropical climate with rainy hot summers (December to February, average > 22°C), and sporadic frost during winters (May to July, average < 18°C) (PARANÁ CIDADE, 2007).

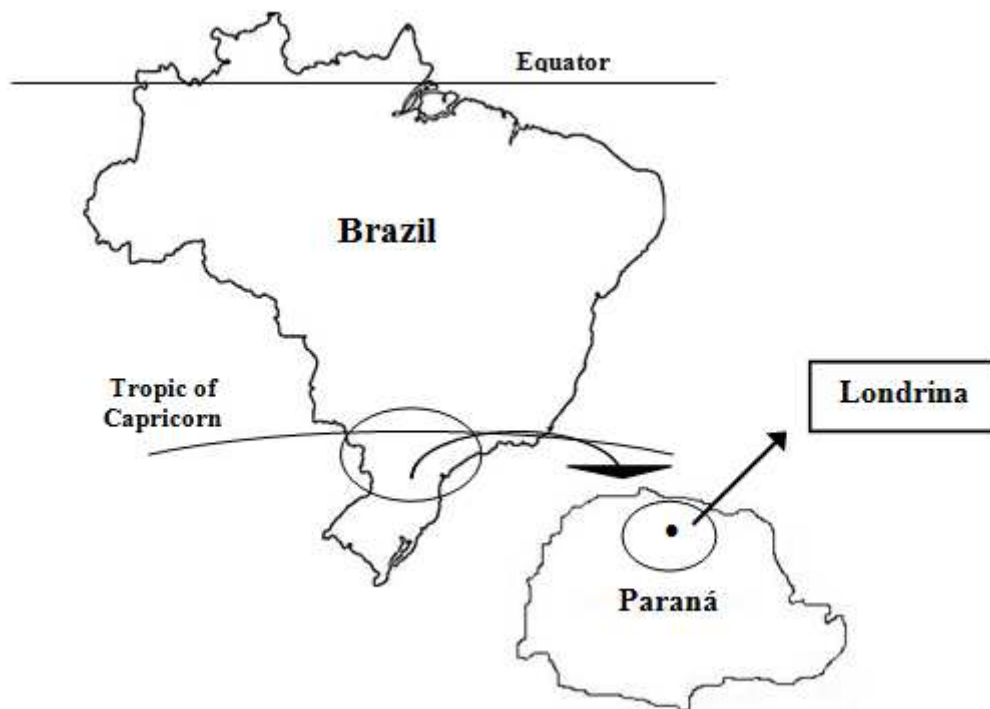


Figure 1 – Map of Paraná State, Brazil, showing Londrina municipality, the location of the experimental site.

Soil management system and culture succession

The corn hybrid AGROESTE-33 was cultivated sowing six seeds/ meter and the sowine experimental units consisted of four 5 m-rows and 0.90 m row spacing. The experimental design was a randomized block arranged in soil strips relative to tillage systems. The soil tillage systems consisted of conventional and no-tillage areas cultivated with corn in the summer followed either by oat or fallow in the winter (2006 and 2007 crops). In addition, in 2006 crop the effect of nitrogen fertilizer application on fumonisin contamination was evaluated. The nitrogen doses were distributed randomly into each strip, with four replications. The side dressing N-rates applied were: 0, 22.5, 45.0 and 90.0 Kg.ha⁻¹ and supplementation with potassium oxide (K₂O) using potassium chloride as potassium source (90.0 Kg.ha⁻¹ N + 13.2 Kg.ha⁻¹ K₂O).

The sampling was carried out collecting 10 corn ears by plot and pooled. After homogenization, the corn samples (1.5 kg) were sent to the laboratory and maintained at 4°C for a maximum of 7 days for microbiological analysis. For fumonisin determination, 200 g of each corn sample were ground to 50 mesh and stored at –20°C.

Nitrogen determination

Nitrogen content was determined by the Kjeldahl method (AACC, 1990) using 6.25 as the factor to obtain the total protein content.

Mycoflora analysis

Sub-samples (10 g) of ground corn were blended with 90 ml of sterile 0.1% peptone water (v/v), and serial dilutions were carried out with 9.0 ml of the same diluent to 10^{-6} . One millilitre of each dilution was transferred into a Petri dish and pour-plated with potato dextrose agar (PDA, pH 4.0) added to $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ chloramphenicol and incubated at 25°C for 6 days. After total fungal colony count, genera were identified according to Nelson et al. (1983), Singh et al. (1991) and Samson et al. (1995).

Fumonisin analysis

Fumonisin B₁ and B₂ were analysed according to Shephard et al. (1990) with some modification (Ueno et al. 1993). Ten gram sample of the ground kernels was mixed with 30 ml methanol:water (3:1, v/v). After standing for 10 min at room temperature, the suspension was shaken at 150 rpm for 30 min and centrifuged at $4500 \times g$ for 10 min. The crude extract (1.0 ml) was applied to preconditioned Sep Pak accell plus QMA cartridge (Waters Co., Ltd.). After washing the cartridge with methanol-water (3:1, 6 ml) followed by methanol (3 ml), fumonisins were eluted with 10 ml methanol containing 0.5% acetic acid. The eluate was evaporated to dryness under a stream of nitrogen at 45°C , the residue was dissolved in methanol-water (3:1, 800 μl) and a 200 μl aliquot dried under nitrogen. After derivatization with 200 μl O-phthaldialdehyde reagent (40 mg OPA, 1 ml methanol, 5 ml 0.1M sodium borate and 50 μl 2-mercaptoethanol), HPLC injections were made within 1 min. Fumonisin were analysed by a reversed-phase isocratic HPLC system (Shimadzu LC-10 AD pump and RF-10A XL fluorescence detector), using a Shim-pack CLC-ODS (M) column (4.6 x 250 mm, Shimadzu). Excitation and emission wavelengths were 335 nm and 450 nm, respectively. The eluent was $\text{CH}_3\text{OH}:0.1 \text{ M NaH}_2\text{PO}_4$ (80:20, v/v) adjusted to pH 3.3 with ortho-phosphoric acid. The flow rate was 1 ml/min. The detection limits for FB₁ and FB₂ were 27.5 ng.g^{-1} and 35.3 ng.g^{-1} , respectively. The recoveries of FB₁ and FB₂ from spiked corn in

the range 100-400 ng.g⁻¹ FB₁ and 250-450 ng.g⁻¹ FB₂ averaged 106.3% (mean CV 8%) and 96.9% (mean CV 10%), respectively, based on duplicate spiking and triplicate analyses.

Statistical analysis

The total fungal colony count, *Fusarium* sp. and *Penicillium* sp. count, fumonisin levels and protein content were statistically evaluated using ANOVA for factorial analysis (2006 crop) and totally randomized analysis (2007 crop) followed by the Tukey, Duncan and t- tests ($p < 0.05$). *Fusarium* sp., *Penicillium* sp. and the total fungal colony count of every sample were transformed to $\log(x + 1)$ and $\log x$ for samples from 2006 and 2007 crops, respectively. The side dressing N-rates, protein content and fumonisin levels were analyzed by the Pearson correlation test. Statistical analysis was performed by the 'Statistic' software version 6.0.

Results and discussion

The relative frequency of the main fungal genera (*Fusaria*, *Penicillia* and *Aspergilli*) in 72 freshly harvested corn samples from the Northern region of Paraná State of 2006 ($n = 60$) and 2007 crops ($n=12$) is shown in Table 1 and Figure 2.

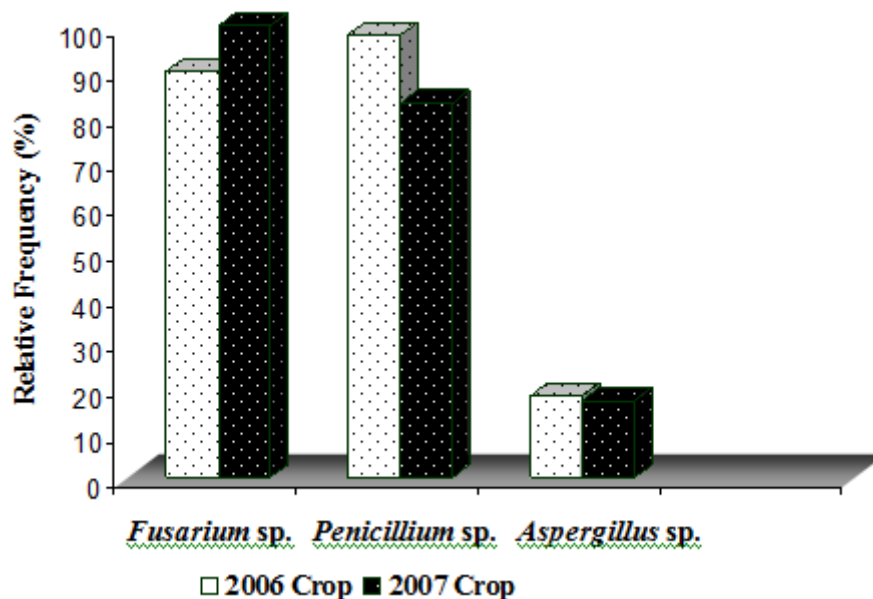


Figure 2 – Relative frequency of main fungal genera in 72 freshly harvested corn samples belonging to 2006 ($n=60$) and 2007 crops ($n=12$) from the Northern region of Paraná State.

Table 1 – *Fusarium* sp., *Penicillium* sp, *Aspergillus* sp. and total mould and yeast count in corn produced 2006 and 2007 under different soil management systems and culture succession in the Northern region of Paraná State.

Crop	SMS and CS*	<i>Fusarium</i> sp. (CFU.g ⁻¹)		<i>Penicillium</i> sp. (CFU.g ⁻¹)		<i>Aspergillus</i> sp. (CFU.g ⁻¹)		Total mould and yeast count (CFU.g ⁻¹)	
		Mean*	Range	Mean	Range	Mean	Range	Mean	Range
2006	NTO	2.7×10^4 ^{aB}	$1.0 \times 10^2 - 1.0 \times 10^5$	3.0×10^5 ^{aA}	$1.0 \times 10^3 - 2.5 \times 10^6$	3.8×10^3	$3.5 \times 10^2 - 1.0 \times 10^4$	1.0×10^5 ^{aA}	$7.1 \times 10^2 - 6.8 \times 10^5$
	NTF	6.2×10^3 ^{aB}	$1.0 \times 10^2 - 1.5 \times 10^4$	4.1×10^4 ^{abA}	$1.8 \times 10^3 - 1.3 \times 10^5$	6.9×10^3	$1.0 \times 10^2 - 2.0 \times 10^4$	2.1×10^4 ^{aA}	$5.5 \times 10^2 - 6.7 \times 10^4$
	CTO	4.6×10^4 ^{aB}	$1.0 \times 10^2 - 5.0 \times 10^5$	9.8×10^4 ^{abB}	$7.0 \times 10^2 - 8.5 \times 10^5$	9.5×10^2	-	6.8×10^4 ^{aA}	$4.0 \times 10^2 - 6.8 \times 10^5$
	CTF	2.8×10^4 ^{aB}	$1.0 \times 10^2 - 2.0 \times 10^5$	1.7×10^4 ^{baA}	$6.5 \times 10^2 - 6.0 \times 10^4$	1.0×10^4	-	1.2×10^4 ^{aB}	$2.6 \times 10^2 - 5.8 \times 10^4$
2007	NTO	4.5×10^5 ^{aA}	$2.0 \times 10^5 - 7.5 \times 10^5$	7.5×10^4 ^{aB}	$3.5 \times 10^4 - 1.5 \times 10^5$	1.5×10^2	-	2.1×10^5 ^{aA}	$1.3 \times 10^5 - 3.0 \times 10^5$
	NTF	5.0×10^5 ^{aA}	$6.0 \times 10^4 - 1.4 \times 10^6$	5.7×10^4 ^{aA}	$1.0 \times 10^4 - 1.0 \times 10^5$	ND	ND	2.7×10^5 ^{aA}	$3.6 \times 10^4 - 7.3 \times 10^5$
	CTO	2.3×10^5 ^{aA}	$6.5 \times 10^4 - 5.0 \times 10^5$	1.9×10^5 ^{aA}	$8.5 \times 10^4 - 3.0 \times 10^5$	1.0×10^3	-	1.2×10^5 ^{aA}	$5.2 \times 10^4 - 2.0 \times 10^5$
	CTF	1.2×10^5 ^{aA}	$5.0 \times 10^4 - 2.0 \times 10^5$	6.5×10^4 ^{aA}	$3.0 \times 10^4 - 1.0 \times 10^5$	ND	ND	8.4×10^4 ^{aA}	$2.6 \times 10^4 - 1.5 \times 10^5$

SMS and CS = Soil management system and culture succession.

NTO = No tillage corn in succession to oat in winter; NTF = No tillage corn in succession to fallow soil in winter; CTO = Conventional tillage corn in succession to oat in winter; CTF = Conventional tillage corn in succession to fallow soil in winter.

* Means followed by the same lowercase letter are not significantly different by the Duncan or the Tukey test ($p < 0.05$) for each crop.

* Means followed by the same uppercase letter are not significantly different by the t-test ($p < 0.05$) between crops

In 2006 crop *Penicillium* sp. was the most prevalent genera (98%) followed by *Fusarium* sp. (90%) and *Aspergillus* sp. (18%), whereas in 2007 crop *Fusarium* sp. was detected in 100% samples, followed by *Penicillium* sp. (83%) and *Aspergillus* sp. (17%). The high frequency of *Fusarium* sp. and *Penicillium* sp. (Figure 2) is in accordance with the data reported by Ono et al. (2002) and Orsi et al. (2000). Ono et al. (2002) detected *Fusarium* sp. and *Penicillium* sp. in 100% corn samples (n= 36) from the Northern region of Paraná State, Brazil. Orsi et al. (2000) evaluated the mycoflora in 195 corn samples from São Paulo State, Brazil, and showed predominance of *Fusarium* sp. (57%) and *Penicillium* sp. (40%). The low frequency of *Aspergillus* sp. is in agreement with Marin et al. (1995) who suggested a negative correlation between *Aspergillus* sp. and *Fusarium* sp. when they are co-contaminating corn kernels.

The total mould and yeast count ranged from 2.0×10^2 to 6.8×10^5 CFU.g⁻¹ and from 2.6×10^4 to 7.3×10^5 CFU.g⁻¹ in corn samples of the 2006 and 2007, respectively (Table 1). *Fusarium* sp. count (2006 crop) ranged from 1.0×10^2 to 1.5×10^4 CFU.g⁻¹ (mean 6.2×10^3 CFU.g⁻¹) in no-tillage corn followed by fallow, whereas in other planting systems this genera was detected at 10^2 to 10^5 CFU.g⁻¹ range. In 2007 crop, *Fusarium* sp. count ranged from 6.0×10^4 to 1.4×10^6 CFU.g⁻¹ in no-tillage corn followed by fallow, but in other planting systems this genera was detected at the same range as in the 2006 crop. There was no significant difference in *Fusarium* sp. count among no-tillage and conventional tillage corn followed either by oat or fallow in both crops by the Duncan test ($P < 0.05$), but *Fusarium* sp. contamination in corn samples of the 2007 crop was higher than those of 2006 crop ($P < 0.05$). *Aspergillus* sp. was detected only in planting systems followed by oat with means of 1.5×10^2 and 1.0×10^3 CFU.g⁻¹ for no-tillage and conventional tillage, respectively. Many *Fusarium* species survive in crop debris and become a hazard to further crop because these microorganisms act as inoculum's source (MYCOTOXIN, 2003).

The total fumonisin levels (FB₁ + FB₂) in corn grown in different soil management systems and culture succession are shown in Table 2 (2006 and 2007 crops).

Table 2 – Fumonisin levels and protein content in corn grown under different soil management system and culture succession (2006 and 2007 crops).

Crop	Soil management and culture succession	n	Total FB * ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)		Protein content(%)	
			Mean*	Range	Mean*	Range
2006	NTO	15	6.97 ^{aA}	0.13 – 19.52	7.91 ^{abA}	5.29 – 9.19
	NTF	15	3.28 ^{bA}	0.16 – 9.93	7.59 ^{bA}	5.01 – 9.09
	CTO	15	3.29 ^{bA}	0.08 – 15.33	8.04 ^{aA}	5.86 – 9.83
	CTF	15	2.97 ^{bA}	0.023 – 8.60	8.09 ^{aA}	7.05 – 8.97
2007	NTO	3	6.29 ^{aA}	3.70 – 7.75	6.43 ^{abA}	6.11 – 6.90
	NTF	3	2.74 ^{abA}	1.57 – 3.85	5.58 ^{bB}	4.47 – 6.50
	CTO	3	2.14 ^{bA}	0.99 – 3.41	6.24 ^{abB}	5.38 – 6.93
	CTF	3	2.24 ^{bA}	1.41 – 3.60	7.64 ^{aA}	7.45 – 7.89

Total FB = FB₁ + FB₂ (Detection limit: FB₁ = 27.5 ng.g⁻¹; FB₂ = 35.3 ng.g⁻¹)

NTO = No tillage corn in succession to oat in winter; NTF = No tillage corn in succession to fallow soil in winter; CTO = Conventional tillage corn in succession to oat in winter; CTF = Conventional tillage corn in succession to fallow soil in winter

n = number of samples

* Means followed by the same lowercase letter are not significantly different by the Duncan or the Tukey test ($p < 0.05$) for each crop.

* Means followed by the same uppercase letter are not significantly different by the t-test ($p < 0.05$) between crops.

In both crops, no-tillage corn followed by oat showed the highest mean fumonisin levels and differed significantly ($P < 0.05$) from all the others by the Duncan test (2006 crop) and from conventional tillage corn followed either by oat or fallow by the Tukey test (2007 crop), probably because oat can support *Fusarium* sp. growth and could be a substratum for fumonisin production. Fumonisin levels ranged from 0.13 to 19.52 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (mean 6.97 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) and from 3.70 to 7.75 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (mean 6.29 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) in 2006 and 2007 crops, respectively. Nevertheless, there was no significant difference in mean fumonisin levels from each soil management system and culture succession between the two crops. Similarly, the highest fumonisin level (6.84 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) was detected in no tillage corn, regardless of crop year, nitrogen fertilization and culture succession (SCHIEL, 2004).

The role of nitrogen in modulating disease resistance is important for fertilizer application, however, the results are often inconsistent and in some cases controversial. A low nitrogen supply increases the severity of infection by facultative

parasites, such as *Fusarium* sp., but has the opposite effect on disease caused by obligate parasites (MARSCHNER, 1995). As a rule, all factors which support the metabolic activities of host cells and which delay senescence of the host plant increase resistance or tolerance to facultative parasites.

Taking into account the role of nitrogen in plant nutrition and resistance, the protein content in corn kernels (2006 and 2007 crops) was evaluated (Table 2, 3 and Figure 3). Mean protein content ranged from 7.59% to 8.09% (2006 crop) and from 5.58% to 7.68% (2007 crop) (Table 2). Protein content in corn kernels and the side dressing N-rates ($\rho = 0.556$) showed positive correlation ($P < 0.05$) (Figure 3). Fumonisin levels and protein content (Table 2 and Figure 4) in corn kernels ($\rho = -0.359$) showed negative correlation ($P < 0.05$), probably due to the stress conditions caused by the competition between the pathogen and the plant for the nutrients, which trigger the fumonisin production. These results are in agreement with Lisker and Lillehoj (1991), who reported that high aflatoxin levels have been associated with fertility-related stresses, particularly with N deficiency.

Table 3 – Effect of side-dressing N rates on fumonisin contamination and protein content in no tillage and tillage corn in succession to oat or fallow soil (2006 crop).

N rate (Kg.ha⁻¹)	Total FB ($\mu\text{g.g}^{-1}$) *	Protein content (%) *
0	6.13 ^{ab}	6.40 ^b
22.5	6.59 ^a	7.98 ^a
45.0	3.70 ^{bc}	8.42 ^a
90.0	2.17 ^c	8.45 ^a
90.0 + 13.2 (K ₂ O)	3.11 ^{abc}	8.29 ^a

Total FB = FB₁ + FB₂ (Detection limit: FB₁ = 27.5 ng.g⁻¹; FB₂ = 35.3 ng.g⁻¹).

*Means followed by the same letter are not significantly different by the Duncan or the Tukey test ($p < 0.05$).

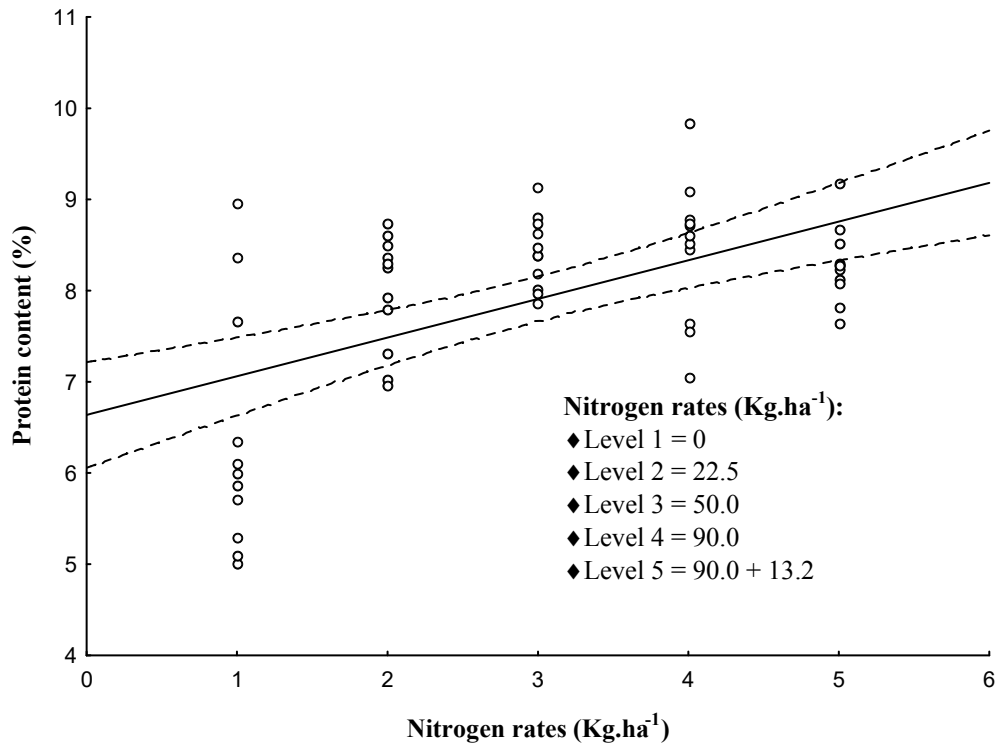


Figure 3 – Correlation between side-dressing Nitrogen rates and protein content in corn samples (n=60) from the Northern region of Paraná State (2006 crop).

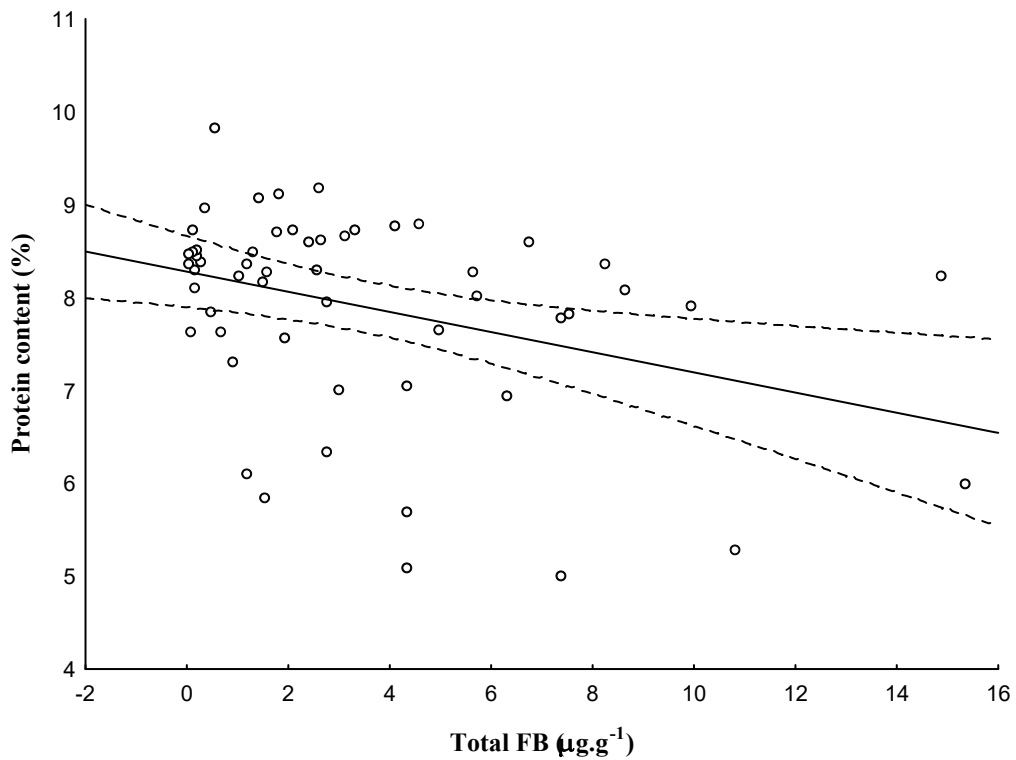


Figure 4 – Correlation between fumonisin levels (FB₁ + FB₂) and protein content in 60 freshly harvested corn samples from the Northern region of Paraná State (2006 crop).

In addition, the correlation between the side dressing N-rates on fumonisin levels in corn grown in different soil management systems and culture succession (2006 crop) was evaluated (Figure 5).

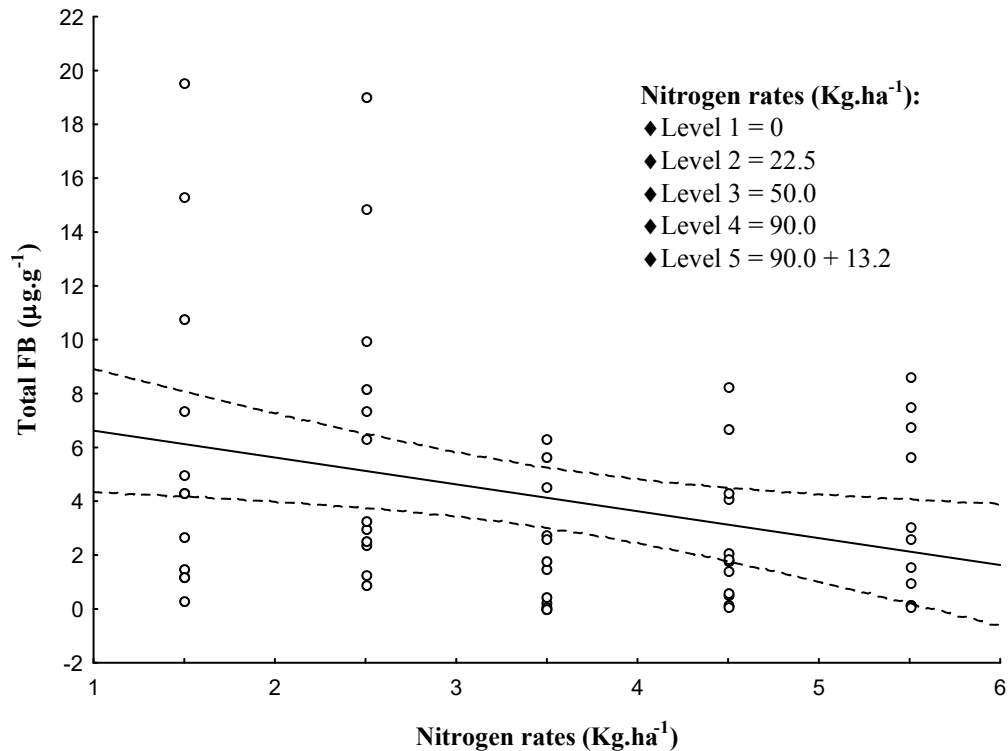


Figure 5 – Correlation between side-dressing Nitrogen rates and fumonisin levels (FB₁ + FB₂) in corn samples (n=60) from the Northern region of Paraná State (2006 crop).

Fumonisin levels and the side dressing N-rates ($\rho = -0.313$) showed negative correlation ($p < 0.05$), i.e., the mean fumonisin level increased as the N-rate application decreased (Figure 5). The highest mean fumonisin level was detected in the plot that received 22.5 kg ha⁻¹ of N and there was a significant difference ($P < 0.05$) among this treatment and the plots that received 45.0 and 90 kg ha⁻¹ of N (Table 3). Similarly, Blandino et al. (2008) reported that stress due to N deficiency significantly increased FB₁ contamination in corn. On the other hand, Anderson et al. (1975) and Jones and Duncan (1981) reported that a higher rate of N fertilizer application reduced aflatoxin levels in corn.

The N-rate application in relation to mycotoxin contamination risk is difficult to define because it can be influenced by other factors, such as soil management system, sowing time and hybrids.

In summary, these results indicated that soil management systems and culture sowing successions as well as side dressing N-rates can influence the fumonisin content in corn kernels. Therefore, more studies on this field are necessary in order to assure the quality and safety of products and to minimize the potential hazards to human and animal health.

Acknowledgements

The authors thank the CNPq (Brazilian Government Organization for grant aid and fellowship to Brazilian researchers), Araucária Foundation, Brazilian Ministry of Health, Paraná Fund/SETI and CAPES (Coordination for Formation of High Level Professionals) for the financial support.

References

- AACC – American Association of cereal chemists. **Approved methods of the American association of cereal chemists**. 8.ed. St. Paul: Minnesota, 1990.
- ANDERSON, H.W.; NEHRING, E.W.; WICHSER, W.R. Aflatoxin contamination of corn in the field. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v.23, p.775–782, 1975.
- BIANCO, R. Ocorrência de pragas no plantio direto × convencional. In: FANCELLI, A.L.; TORRADO, P.V.; MACHADO, J. (Coord) **Atualização em plantio direto**. Campinas: Fundação Cargill, 1985. p.183-194.
- BLANDINO, M.; REYNERI, A.; VANARA, F. Influence of nitrogen fertilization on mycotoxin contamination of maize kernels. **Crop Protection**, v.27, p. 222-230, 2008.
- BOCKUS, W.W.; SHROYER, J.P. The impact of reduced tillage on soil borne plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v.36, p.485-500, 1998.
- CITY BRAZIL. Números Gerais Paraná. **Web site oficial: www.pr.gov.br**. Disponível em: <http://www.citybrazil.com.br/pr/geral.htm>. Acesso em: 5 fev. 2008.
- CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Safras de grãos: Brasil/produtores**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/BrasilProdutoSerieHist.xls>. Acesso em: 13 nov. 2007.
- GELDERBLOM, W.C.A.; SAMPLE, E.; MARASAS, W.F.O. The cancer initiating potential of the fumonisins B mycotoxins. **Carcinogenesis**, p.433-437, 1992.
- JONES, R.K.; DUNCAN, H.E. Effect of nitrogen fertilizer, planting date and harvest date on aflatoxin production in corn inoculated with *Aspergillus flavus*. **Plant Disease**, v.65, p.741–744, 1981.
- LISKER, N.; LILLEHOJ, E.B. Prevention of mycotoxin contamination (principally aflatoxins and *Fusarium* toxins) at the preharvest stage. In: SMITH, J.E.; HENDERSON, R.A. (Eds.), **Mycotoxins and Animal Foods**. CRC Press, Boca Raton, FL, 1991. p.689–719.
- MARASAS, W.F.O.; KELLERMAN, T.S.; GELDERBLOM, W.C.A.; COETZER, J.A.W.; THIEL, P.G.; VAN DER LUGT, J.J. Leukoencephalomalacia in horse induced by fumonisin B1 isolated from *Fusarium moniliforme*. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v.55, p.197-203, 1988.
- MARSCHNER, H. Relationships between Mineral Nutrition and Plant Diseases and Pests. In: _____. **Mineral Nutrition of Higher Plants**. 2.ed. London: Academic Press, 1995. p.437-460.
- MYCOTOXINS: Risks in Plant, Animal and Human Systems. Council for Agricultural Science and Technology. Ames, 2003. 217p. (Task Force Report, nº.139).
- NELSON, P.E. Taxonomy and biology of *Fusarium moniliforme*. **Mycopathologia**, v.117, p.29-36, 1992

NELSON, P.E., TOUSSON, T.A., MARASAS, W.F.O. *Fusarium* species – An illustrated manual for identification. Pennsylvania: **Pennsylvania State University Press**, 1983.

NORRED, W.P.; VOSS, K.A. Toxicity and role of fumonisins in animal diseases and human esophageal cancer. **Journal of Food Protection**, Ames, v.57, p.522-527, 1994.

ONO, E. Y. S., SASAKI, E. Y., HASHIMOTO, E. H., HARA, L. N., CORREA, B., ITANO, E.N., SUGIURA, Y., UENO, Y., HIROOKA, E. Y. Post-harvest storage of corn: Effect of begining content on mycoflora and fumonisin contamination. **Food Additives and Contaminants**. London, v.19, p.1081-1090, 2002.

ORSI, R.B.; CORRÊA, B.; POSSI, C.R.; SCHAMMASS, E.A.; NOGUEIRA, J.R.; DIAS, S.M.C; MALOZZI, M.A.B. Mycoflora and occurrence of fumonisins in freshly harvested and stored hybrid maize. **Journal Stored Products Research**, v.36, p.75-87, 2000.

PARANÁ CIDADE [on line]. Disponível em:
<http://celepar6.pr.gov.br/municípios/dadosger.asp?codigo=0286600>. Acesso em: 5 fev. 2008.

RHEEDER, J.P.; MARASAS, W.F.O.; VISMER, H.F. Production of Fumonisin Analogs by *Fusarium* Species. **Applied and Environmental Microbiology**, n.5, v.68, p.2101-2105, 2002.

ROSS, P.F.; NELSON, P.E.; RICHARD, J.L.; OSWILER, G.D.; RICE, L.G.; PLATTNER, R.D.; WILSON, T.M. Production of fumonisinas by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* isolates associated with equine leukoencephalomalacia and a pulmonary edema syndrome in swine. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, p. 3225-3226, 1990.

ROTHROCK, C.S. Tillage systems and plant disease. **Soil Science**, v.154, p.308-315, 1992.

SAMSON, R.A., HOESKSTRA, E.S., FRISVAD, J.C., FILTENBORG, O. **Introduction to food-borne fungi**. 4.ed. The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 1995.

SCHIABEL, V.C. **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.

SCHULTZ, L.A. Sistema de preparo do solo. In: _____. **Manual do plantio direto: técnicas e perspectivas**. Porto Alegre:Agropecuária, 1978. p.15-19.

SHEPHARD, G.S., SYDENHAM, E.W., THIEL, P.G., GELDERBLOM, W.C.A. Quantitative determination of fumonisins B₁ and B₂ by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Liquid Chromatography**, v.13., p.2077-2087, 1990.

SINGH, K., FRISVAD, J.C., THRANE, U., MATHUR, S.B. An illustrated manual on identification of some seed-borne *Aspergilli*, *Fusaria*, *Penicillia* and their mycotoxins. Hellerup/Denmark/: **Danish Government**, 1991.

THIEL, P.C.; MARASAS, W.F.O; SYDENHAM, E.W.; SHEPHARD, G.S.; GELDERBLOM, W.C.; NIEUWENHUIS, J.J. Survey of fumonisin production by *Fusarium* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 1089-1093, 1991.

UENO, Y., AOYAMA, S., SUGIURA, Y., WANG, D.S., LEE, U.S., HIROOKA, E.Y., HARA, S., KARKI, T., CHEN, G., YU, S.Z. A limited survey of fumonisins in corn and corn-based products in Asian countries. **Mycotoxin Research**, v.9, p.27-34, 1993.

UENO, Y.; IJIMA, K., WANG, S-D.; SUGIURA Y.; SEKIJIMA, M.; TNAKA, T.; CHEN,C.; YU, S-Z. Fumonisins as a possible contributory risk factor for primary liver câncer: A 3-year study of corn harvested in Haimen, China, by HPLC and ELISA. **Fd. Chem. Toxicol**, v.35, p.1143-1150, 1997.

WEIBKING, T; LEDOUX, D.R; BERMUDEZ, A.J.; TURK, J.R.; ROTTINGHAUS, G.E.; WANG, E.; MERRIL Jr, A.H. Effects of feeding *Fusarium moniliforme* culture material, containing known levels of fumonisin B₁, on the young broiler chick. **Poultry Science**, v. 72, p.456-466, 1993.

REFERÊNCIAS

- AACC – American Association of cereal chemists. **Approved methods of the American association of cereal chemists**. 8.ed. St. Paul: Minnesota, 1990.
- ABBAS, H.K.; CARTWRIGHT, R.D.; XIE, W.; SHIER, W.T. Aflatoxin and fumonisin contamination of corn (maize, *Zea mays*) hybrids in Arkansas. **Crop Protection**, v.25, p.1-9, 2006.
- ABBAS, H.K.; WILLIAMS, W.P.; WINDHAM, G.L.; PRINGLE, H.C.; III; XIE, W.; SHIER, W.T. Aflatoxin and Fumonisin Contamination of Commercial Corn (*Zea mays*) Hybrids in Mississippi. **Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.5246-5254, 2002.
- ALMEIDA, F.S. Controle de Ervas. In: **INSTITUTO AGRONÔMICO DO PARANÁ**. Plantio direto no Estado do Paraná. Londrina: IAPAR, 1981. p.101-144. Circular n.23.
- ALMEIDA, P.A.; FONSECA, H.; FANCELLI, A.L.; DIREITO, G.M.; ORTEGA, E.M.; CORREIA, B. Mycoflora and Fumonisin Contamination in Brazilian Corn from Sowing to Harvest. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.3877-3882, 2002.
- ANDERSON, H.W.; NEHRING, E.W.; WICHSER, W.R. Aflatoxin contamination of corn in the field. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.23, p.775-782, 1975.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Legislação**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>>. Acesso em: 13 out. 2007.
- ARAÚJO, L.A.N.; FERREIRA, M.F.; CRUZ, M.C.P. Adubação nitrogenada na cultura do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, p.771-777, 2004.
- ASAO, T.; BÜCHI, G.; ABDEL-KADAR, M.M.; CHANG, S.B.; WICK, E.L.; WOGAN, G.N. The Structures of Aflatoxins B and G₁. **Journal of the American Chemical Society**, v.87, p.882-886, 1965.
- AVANTAGGIATO, G.; QUARANTA, F.; DESIDERIO, E.; VISCONTI, A. Fumonisin contamination of maize hybrids visibly damaged by *Sesamia*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 83, p. 13-18, 2002.
- BATA, A.; LÁSZTITY, R. Detoxification of mycotoxin-contaminated food and feed by microorganisms. **Food Science Technology**, v.10, p.223-228, 1999.
- BAYER, C.; MIELNICZUK, J. Características químicas do solo afetadas por métodos de preparo e sistemas de cultura. **Revista Brasileira Ciência do Solo**, v.21, p.105-112, 1997.
- BENNETT, J.W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, v.16, p.497-516, 2003.
- BERMUDEZ, A.J.; LEDOUX, D.R.; ROTTINGHAUS, G.E.; BENNETT, G.A. The individual and combined effects of the Fusarium mycotoxins moniliformin and fumonisin B1 in turkeys. **Avian Diseases**, v.41, p.304-311, 1997.
- BEZUIDENHOUT, S.C.; GELDERBLUM, W.C.A.; GORST-ALLMAN, C.P.; HORAK, R.M.; MARASAS, W.F.O.; SPITELLER, G.; VLEGGAAR, R. Structure elucidation of the

fumonisin, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, p.743-745, 1988.

BIANCO, R. Ocorrência de pragas no plantio direto × convencional. In: FANCELLI, A.L.; TORRADO, P.V.; MACHADO, J. (Coord) **Atualização em plantio direto**. Campinas: Fundação Cargill, 1985. p.183-194.

BIEHL, M.L.; BUCK, W.B. Chemical contaminants: their metabolism and their residues. **Journal of Food Protection**, v.50, p.1058-1073, 1987.

BITTENCOURT, A.B.F.; OLIVEIRA, C.A.F.; DILKIN, P.; CORREA, B. Mycotoxin occurrence in corn meal and flour traded in São Paulo, Brazil. **Food Control**, v.16, p.117-120, 2005.

BLANDINO, M.; REYNERI, A.; VANARA, F. Influence of nitrogen fertilization on mycotoxin contamination of maize kernels. **Crop Protection**, v.27, p. 222-230, 2008.

BOCKUS, W.W.; SHROYER, J.P. The impact of reduced tillage on soil borne plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v.36, p.485-500, 1998.

BRADBURN, N.; COKER, R.D. Aflatoxin contamination in maize. **Tropical Science**, v.33, p.418-428, 1993.

BRANHAM, B.E.; PLATTNER, R.D. Isolation and characterization of a new fumonisin from liquid cultures of *Fusarium moliniforme*. **Journal of Natural Products**, v.56, p.1630-1633, 1993.

BRASIL, Portaria n. 845 de 8 de novembro de 1976. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, 30 de nov. 1976.

BÜCHI, G.; FOULKES, D.M.; KURONO, M.; MITCHELL, G.F. The Total Synthesis of Racemic Aflatoxin B₁. **Journal of the American Chemical Society**, v.88, p.4534-4536, 1966.

CALEGARI, A. Rotação de culturas. In: GRUPO PLANTIO DIRETO (Coord.). **Guia para plantio direto**. 2000. p.68-78.

CALEGARI, A.; FILHO, C.C.; FILHO, J.T.; RALISCH, R.; GUIMARÃES, M.F. Melhoria da agregação do solo através do sistema de plantio direto. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.27, n.2, p.147-158, abr./jun. 2006.

CALEGARI, A.; VIGIRA, M.J. Técnicas de Controle da Erosão. In: FILHO, C.C.; MUZILLI, O. **Uso e Manejo dos Solos de Baixo Aptidão Agrícola**. IAPAR: Circular Técnico, 1999.

CARDWELL, K.F.; KING, J.G.; MAZIYA-DIXON, B.; BOSQUE-PEREZ, N.A. Interactions between *Fusarium verticillioides*, *Aspergillus flavus*, and insect infestation in four maize genotypes in Lowland Africa. **Phytopathology** v.90, p.276–284, 2000.

CASA, R.T.; REIS, E.M. ZAMBOLIN, L. Fungos associados à semente de milho produzidas nas regiões sul e sudeste do Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v.23, p.370-373, 1998.

CASTEEL, S.W.; ROTTINGHOUSE, G.E. Mycotoxins. **Encyclopedia Microbiology**, v.3, p.337-348, 2000.

CATTELAN, A. J.; VIDOR, C. Sistemas de culturas e a população microbiana do solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, p.125-131, 1990.

CAWOOD, M.E.; GELDERBLUM, W.C.A.; VLEGGAAR, R.; BEHREND, Y.; THIEL, P.G.; MARASAS, W.F.O. Isolation of the fumonisin mycotoxins – a quantitative approach. **Journal of Food Protection**, v.39, p.1958-1962, 1991.

CHRISTENSEN, C.N.; SAUER, D.B. Mycoflora: In: Christensen, C.N. (ed.). **Storage of cereal grains and their products**. Minnesota: American Association of Cereal Chemists, 1982, p.219-240.

CHULZE, S.N.; RAMIREZ, M.L.; FARNOCHI, M.; PASCALE, M.; VISCONTI, A.; MARCH, G. *Fusarium* and fumonisins occurrence in Argentinian corn at different ear maturity stages. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p.2797–2801, 1996.

CITY BRAZIL. Números Gerais Paraná. **Web site oficial: www.pr.gov.br**. Disponível em: <http://www.citybrazil.com.br/pr/geral.htm>. Acesso em: 5 fev. 2008.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Safras de grãos: Brasil/produtores**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/BrasilProdutoSerieHist.xls>. Acesso em: 13 nov. 2007.

COSTA, M.C.G.; XAUD, H.A.M. **O plantio direto na capoeira como alternativa ao uso do fogo na agricultura familiar em Roraima**. Agronline.com.br. Disponível em: <<http://www.agronline.com.br/artigos/artigo.php?id=365>>. Acesso em: 09 de fevereiro de 2007.

CRUZ, J.C.; ALVARENGA, R.C.; NOVOTNY, E.H.; FILHO, I.A.P.; SANTANA, D.P.; PEREIRA, F.T.F.; HERNANI, L.C. **Cultivo de Milho: Sistema Plantio Direto**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2002. p.1-7. (Embrapa Milho e Sorgo. Comunicado técnico, n.51).

CYMMYT. Managing trials and reporting data for CYMMYT'S. **International Maize Testing Program**. México. CYMMYT. 1985.

D'MELLO, J.P.F.; PLACINTA, C.M.; MACDONALD, A.M.C. *Fusarium* mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity. **Animal Feed Science and Technology**, v.80, p.183-205, 1999.

DAROLT, M.R. **Plantio Direto: pequena propriedade sustentável**. Londrina: IAPAR – Instituto Agrônomo do Paraná, 1998.

DE KOE, W. Moulds and Toxins in International Perspective. **Cereal Science and Technology**. Impact on Changing Africa. (Taylor, J.R.N., Randall, P.R. and Viljoen, V.H., eds), p.807-822, CSIR, Pretoria 1993.

DERPSCH, R. Histórico, requisitos, importância e outras considerações sobre plantio direto no Brasil. In: TORRADO, P.V. (Coord.); ALOISI, R.R. (Coord.). **Plantio Direto no Brasil**. Campinas: Fundação Cargill, 1984. p.1-12.

DERPSCH, R. Agricultura sustentável. In: SATURNINO, H. M.; LANDERS, J. N. ed. **O meio ambiente e o plantio direto**. Brasília: EMBRAPA-SPI, p.29-48, 1997.

DIAZ, G. J.; BOERMANS, H. J. Fumonisin toxicosis in domestic animals: a review. **Veterinary Human Toxicology**, v.36, p.548-555, 1994.

DHINGRA, O.D.; NETTO, R.A.C. Micotoxinas em grãos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 6, p. 49-101, 1998.

DUPUY, J.; BARS, P. LE; BOUDRA, H.; BARS, J. LE. Thermostability of Fumonisin B₁, a mycotoxin form *Fusarium moniliforme*, in corn. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, p.2864-2867, 1993.

ETCHEVERRY, M.; NESCI, A.; BARROS, G.; TORRES, A.; CHULZE, S. Occurrence of *Aspergillus* section *Flavi* and aflatoxin B₁ in corn genotypes and corn meal in Argentina. **Mycopathologia**, v.147, p.37-41, 1999.

FANCELLI, A.L. Manejo do solo em plantio direto. In: GRUPO PLANTIO DIRETO (Coord.). **Guia para plantio direto**. 2000a. p.16-29.

FANCELLI, A.L.; NETO, D.D. Principais doenças e seu controle. In: _____. **Produção de milho**. Guaíba Agropecuária, 2000b. p.253-282.

FANCELLI, A.L.; NETO, D.D. **Produção de milho**. Guaíba: Agropecuária, 2000.

FARIAS, A.X.; ROBBS, C.F.; BITTENCOURT, A.M.; ANDERSEN, P.M.; CORRÊA, T.B.S. Contaminação endógena por *Aspergillus* spp. em milho pós-colheita no estado do Paraná. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, p.617-621, 2000.

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.

FAO – Food and Agriculture Organization of United Nations. 2004. Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. A compendium. **FAO Food and Nutrition**. n.81., Rome, 2004a.

FAO/WHO – Regional Conference on Food Safety for Asia and Pacific. Aflatoxin contamination in foods and feeds in the Philippines. **Conference Room Document 13**, Seremban, Malaysia, p.24-27, 2004b.

FEBRAPDP - Federação Brasileira de Plantio Direto na Palha. Febrapdp.org.br. Disponível em: <http://www.febrapdp.org.br/arquivos/AreaPDMundo2005.pdf>. Acesso em: 26 de março de 2007.

FERNANDES J. M. C. As doenças das plantas e o sistema plantio direto. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DO SISTEMA PLANTIO DIRETO, Passo Fundo. **Anais...** Passo Fundo: EMBRAPA-CNPT, 1997. p.43-80.

FERREIRA, T.N.; SCHWARZ, R.A.; STRECK, E.V. **Solos: manejo integrado e ecológico – elementos básicos**. Porto Alegre: Emater/RS, 2000. p.01-95.

FINK-GREMMELS, J. Mycotoxins: their implications for human and animal health. **Vet. Quart.**, v.21, p.115-120, 1999.

FONSECA, H. Pequeno histórico das micotoxinas no mundo e no Brasil. In: SIMPÓSIO SOBRE MICOTOXINAS EM GRÃOS, n.1, 1999. **Anais...** São Paulo: Fundação Cargil, 1999, p.9-20.

FONSECA, H. Amostragem e Classificação como Técnicas de Controle de Qualidade. Amostragem: Representatividade e Técnicas Utilizadas In: SCUSSEL, V.M. **Atualidades em Micotoxinas e Armazenagem de Grãos**. Florianópolis: Ed. Da Autora, 2000. p.221-236.

GAMANYA, R.; SIBANDA, L. Survey of *Fusarium moniliforme* (*F. verticillioides*) and production of fumonisin B₁ in cereal grains and oilseeds in Zimbabwe. **International Journal of Food Microbiology**, v.71, p.145-149, 2001.

GELDERBLOM, W.C.A.; JASKIEWICZ, K.; MARASAS, W.F.O.; THIEL, P.G.; HORAK, M.J.; VLEGGAAR, R.; KRIEK, N.P.J. Fumonisin – novel mycotoxins with cancer promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, p.1806-1811, 1988.

GELDERBLOM, W.C.A.; SAMPLE, E.; MARASAS, W.F.O. The cancer initiating potential of the fumonisins B mycotoxins. **Carcinogenesis**, p.433-437, 1992.

GIMENO, A. Thin layer chromatographic determination of aflatoxins, ochratoxins, sterigmatocystin, zearalenone, citrinin, T-2 toxin, diacetoxyscirpenol, penicillic acid, patulin and penitrem. **Journal - Association of Official Analytical Chemists**, v.62, p.579-585, 1979.

GRIFFIN, D.H. Introduction to the Fungi. In: _____ **Fungal Physiology**. 2.ed. New York: Wiley-Liss, 1994.

GRUPO PLANTIO DIRETO (Coord.). Doenças das culturas de soja, milho e feijão associadas ao sistema de PD sobre a palha. In: _____ **Guia para plantio direto**. 2000. p.60-67.

HAYES, J.R.; CAMPBELL, T.C. Contaminants. In: Casarett, L.S. **Toxicology: the basic Science of Poisons**. New York: McMilliams, p.771-800, 1986.

HENKLAIN, J.C. Efeito do preparo sobre as características do solo. In: PEIXOTO, R.T.G.; AHRENS, D.C.; SAMAHA, M. J. **Plantio direto o caminho para uma agricultura sustentável**. Ponta Grossa: IAPAR, 1997. p.206-221.

HIROOKA, E.Y.; YAMAGUCHI, M.M.; AOYAMA, S.; SUGIURA, Y.; UENO, Y. The nature occurrence of fumonisins in brazilian corn kernels. **Food Additives Contaminants**, v.13, p.173-183, 1996.

HUSSEIN, H. S.; BRASEL, J. M. Review: Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v.167, p.101-134, 2001.

HUWIG, A.; FREIMUND, S.; KAPPELI, O.; DUTLER, H. Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. **Toxicology Letters**, v.122, p.179-188, 2001.

IARC – International Agency for Research on Cancer. Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Human, vol.56, Lyon, France, 1993. p.41.

JAIMEZ, J.; FENTE, C.A.; VAZQUEZ, B.I.; FRANCO, C.M.; CEPEDA, A.; MAHUZIER, G.; PROGNON, P. Application of the assay of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection in food analysis. **Journal of Chromatography A**, v.882, p.1-10, 2000.

JONES, C.A. **C4 grasses and cereals: growth, development, and stress response.** New York: Wiley, 1985.

JONES, R.K.; DUNCAN, H.E. Effect of nitrogen fertilizer, planting date and harvest date on aflatoxin production in corn inoculated with *Aspergillus flavus*. **Plant Disease**, v.65, p.741–744, 1981.

KPODO, K.; THRANE, U.; HALD, B. *Fusaria* and fumonisins in maize from Ghana and their co-occurrence with aflatoxins. **International Journal of Food Microbiology**, v.61, p.147-157, 2000.

KUBENA, L. F.; HARVEY, R. B.; BUCKLEY, T. S.; EDRINGTON, T. S.; ROTTINGHAUS, G. E. Individual and combined effects of moniliformin present in *Fusarium fujikuroi* culture material and aflatoxin in broiler chicks. **Poultry Science**, v.76, p.265-270, 1997.

LACEY, J.; RAMAKRISHNA, N.; HAMER, A.; MAGAN, N.; MARFLEET, I.C. Grain fungi. In: ARORA, D. K.; MUKERJI, K. G.; MARTH, E. H. **Handbook of applied mycology**, New York, 1991. p.121-178.

LI, Y.C.; LEDOUX, D.R.; BERMUDEZ, A.J.; FRITSCHKE, K.L.; ROTTINGHAUS, G.E. The individual and combined effects of fumonisin B₁ and moniliformin on performance and selected immune parameters in turkey poults. **Poultry Science**, v.79, p.871-878, 2000.

LISKER, N.; LILLEHOJ, E.B. Prevention of mycotoxin contamination (principally aflatoxins and *Fusarium* toxins) at the preharvest stage. In: SMITH, J.E.; HENDERSON, R.A. (Eds.), **Mycotoxins and Animal Foods**. CRC Press, Boca Raton, FL, 1991. p.689–719.

LOPEZ-GARSIA, R.; PARK, D.L.; PHILLIPS, T.D. **Food Nutrition and Agriculture**, v.23, p.38, 1999.

MACKENZIE, S.E.; SAVARD, M.E.; BLACKWELL, B.A.; MILLER, J.D.; APSIMON, J.W. Isolation of a new fumonisin from *Fusarium moniliforme* grown in liquid culture. **Journal of Natural Products**, v.61, p.367-369, 1998.

MARASAS, W.F.O.; KELLERMAN, T.S.; GELDERBLUM, W.C.A.; COETZER, J.A.W.; THIEL, P.G.; VAN DER LUGT, J.J. Leukoencephalomalacia in horse induced by fumonisin B₁ isolated from *Fusarium moniliforme*. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v.55, p.197-203, 1988.

MARSCHNER, H. Relationships between Mineral Nutrition and Plant Diseases and Pests. In: _____. **Mineral Nutrition of Higher Plants**. 2.ed. London: Academic Press, 1995. p.437-460.

- MARÍN, S.; SANCHIS, V.; MAGAN, N. Water activity, temperature, and pH effects on growth of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* isolates from maize. **Canadian Journal of Microbiology**, v.41, p.1063-1070, 1995.
- MEDINA-MARTÍNEZ, M.S.; MARTÍNEZ, A.J. Mold Occurrence and Aflatoxin B₁ and Fumonisin B₁ Determination in Corn Samples in Venezuela. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v.48, p.2833-2836, 2000.
- MEDEIROS, R.D. **Em busca de alternativas sustentáveis para o plantio direto em Roraima**. Agronline.com.br. Disponível em: <<http://www.agronline.com.br/artigos/artigo.php?id=226>>. Acesso em: 09 de fevereiro de 2007.
- MILLER, J.D. Fungi and mycotoxins in grain: implications for stored product research. **Journal of Stored Products Research**, v.31, p.1-16, 1995.
- MILLER, J.D. Epidemiology of *Fusarium* Ear disease of Cereals. In: MILLER, J.D.; TRENHOLM, H.L. **Mycotoxins In Grain: Compounds Other Than Aflatoxin**. United States: Eagan[®] Press, 1994. p.59-257.
- MONDARDO, A.; BISCAIA, R.M. Controle da Erosão. In: **INSTITUTO AGRONÔMICO DO PARANÁ**. Plantio direto no Estado do Paraná. Londrina: IAPAR, 1981. p.33-42. Circular n.23.
- MUNKVOLD, G.P.; DESJARDINS, A.E. Fumonisin in Maize Can We Redce Theuir Occurrence? **Plant Disease**, v.81, n.6, p.556-565, 1997.
- MURPHY, P.A.; RICE, L.G.; ROSS, P.F. Fumonisin B₁, B₂ and B₃ content of Iowa, Wisconsin, and Illinois corn and corn screenings. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.41, p.263-266, 1993.
- MUSSER, S.M.; EPPLEY, R.M.; MAZZOLA, E.P. Identification of an n-acetyl keto derivative of fumonisin B₁ in corn cultures of *Fusarium proliferatum*. **Journal of Natural Products**, v. 58, p.1392-1397, 1995.
- MUSSER, S.M.; GAY, M.L.; MAZZOLA, E.P. Identification of a new series of fumonisins containing 3-hydroxypyridine. **Journal of Natural Products**, v.59, p.970-972, 1996.
- MUSSER, S.M.; PLATTNER, R.D. Fumonisin composition in cultures of *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum*, and *Fusarium nygamai*. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.45, p.1169-1173, 1997.
- MUZILLI, O. Princípios e perspectiva de expansão. In: **INSTITUTO AGRONÔMICO DO PARANÁ**. Plantio direto no Estado do Paraná. Londrina: IAPAR, 1981a. p.11-17. Circular n.23.
- MUZILLI, O. Manejo da Fertilidade do Solo. In: **INSTITUTO AGRONÔMICO DO PARANÁ**. Plantio direto no Estado do Paraná. Londrina: IAPAR, 1981b. p.43-58. Circular n.23.
- MYCOTOXINS: Risks in Plant, Animal and Human Systems. Council for Agricultural Science and Technology. Ames, 2003. 217p. (Task Force Report, nº.139).

NAZARENO, N.R.X. Ocorrência e Controle de Doenças. Cultura do Milho. In: **INSTITUTO AGRONÔMICO DO PARANÁ**. Plantio direto no Estado do Paraná. Londrina: IAPAR, 1981. p.171-192. Circular n.23.

NELSON, P.E. Taxonomy and biology of *Fusarium moniliforme*. **Mycopathologia**, v.117, p.29-36, 1992

NELSON, P.E., TOUSSON, T.A., MARASAS, W.F.O. *Fusarium* species – An illustrated manual for identification. Pennsylvania: **Pennsylvania State University Press**, 1983.

NEAL, G.E. Genetic implications in the metabolism and toxicity of mycotoxins. **Toxicology Letters**, v.82/83, p.861-867, 1995.

NORRED, W.P.; VOSS, K.A. Toxicity and role of fumonisins in animal diseases and human esophageal cancer. **Journal of Food Protection**, Ames, v.57, p.522-527, 1994.

OLIVEIRA, F.H.T.; NOVAIS, R.F.; ALVAREZ, V.H.; CANTARUTTI, R.B.; BARROS, N.F. Fertilidade do Solo no Sistema de Plantio Direto. **Tópicos em Ciência do Solo**, v.2, p.393-486, 2002.

ONO, E.Y.S.; ONO, M.A.; FUNO, F.Y.; MEDINA, A.E.; OLIVEIRA, T.C.R.M.; KAWAMURA, O.; YOSHIO, U.; HIROOKA, E.Y. Evaluation of fumonisin-aflatoxin co-occurrence in Brazilian corn hybrids by ELISA. **Food Additives and Contaminants**, v.18, p.719-729, 2001.

ONO, E. Y. S.; SASAKI, E. Y.; HASHIMOTO, E. H.; HARA, L. N.; CORREA, B.; ITANO, E.N.; SUGIURA, Y.; UENO, Y.; HIROOKA, E. Y. Post-harvest storage of corn: Effect of begining content on mycoflora and fumonisin contamination. **Food Additives and Contaminants**, v.19, p.1081-1090, 2002.

ONO, E.Y.S.; SUGIURA, Y.; HOMECHIM, M.; KAMOGAE, M.; VIZZONI, E.; UENO, Y.; HIROOKA, E.Y. Effect of climatic conditions on natural mycoflora and fumonisins in freshly harvested corn of the State of Paraná, Brazil. **Mycopathologia**, v.147, p.139-148, 1999.

ORSI, R.B.; CORRÊA, B.; POSSI, C.R.; SCHAMMASS, E.A.; NOGUEIRA, J.R.; DIAS, S.M.C; MALOZZI, M.A.B. Mycoflora and occurrence of fumonisins in freshly harvested and stored hybrid maize. **Journal Stored Products Research**, v.36, p.75-87, 2000.

PACHECO, E.P. **Sistema Plantio Direto: Uma alternativa para os produtores de grãos de Sergipe**. Agronline.com.br. Disponível em: <<http://www.agronline.com.br/artigos/artigo.php?id=193>>. Acesso em: 09 de fevereiro de 2007.

PARANÁ CIDADE [on line]. Disponível em: <http://celepar6.pr.gov.br/municípios/dadosger.asp?codigo=0286600>. Acesso em: 5 fev. 2008.

PEDROSA, A.V.B.; DEZEN, R.B. O milho: características do mercado e perspectivas. **Preços agrícolas**, v.55, p.1-4, 1991.

PEREIRA, O.A.P. Situação atual de doenças da cultura do milho no Brasil e estratégias de controle. In: **Resistência genética de plantas a doenças**. Piracicaba. Departamento de

Genética, Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz, Universidade de São Paulo. 1995. p. 25-30.

PHILLIPS, T.D.; CLEMENT, B.A.; PARK, D.L. Approaches to reduction of aflatoxins in food and feeds. In: EATON, O.L.; GROOMAN, J.D. **The toxicology: human**. San Diego: Academic Press, 1994, 544 p.

PLACINTA, C.M., D'MELLO, J.P.F., MACDONALD, A.M.C. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. **Animal Feed Science and Technology**, v.78, p.21-37, 1999.

PLATTNER, R.D. Detection of fumonisins produced in *Fusarium moniliforme* cultures by HPLC with electrospray MS and evaporative light scattering detectors. **Journal of Natural Toxins**, v.3, p.294-298, 1995.

POLING, S.M.; PLATTNER, R.D. Rapid purification of fumonisins and their hydrolysis products with solid-phase extraction columns. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v.47, p.2344-2349, 1999.

POZZI, C.R. **Milho pós-colheita e armazenamento: microbiota fúngica e a ocorrência de micotoxinas**. 1993. Dissertação de Mestrado – Universidade de São Paulo, Pirassununga.

RANJAN, K.S.; SINHA, A.K. Occurrence of micotoxigenic fungi and mycotoxins in animal feed from Bihar. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.56, p.39-47, 1991.

REGO, P.G. **Plantio Direto: Economia e Gerência no Manejo dos Solos**. Castro, Kugler, 1999?

REIS, E.M.; SANTOS, H.P. Interações entre doenças de cereais de inverno e sistema de plantio direto. In: EMBRAPA – CNPT; FECOTRIGO - FUNDACEP; Fundação ABC. (Org.). **Plantio direto no Brasil**. Passo Fundo: Aldeia Norte, 1993. p.105-110.

RHEEDER, J.P.; MARASAS, W.F.O.; VISMER, H.F. Production of Fumonisin Analogs by *Fusarium* Species. **Applied and Environmental Microbiology**, n.5, v.68, p.2101-2105, 2002.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Metodologia Analítica: Validação de Metodologia. In: SCUSSEL, V.M. **Atualidades em Micotoxinas e Armazenagem de Grãos**. Florianópolis: Ed. Da Autora, 2000. p.42-47.

ROSS, P.F.; NELSON, P.E.; RICHARD, J.L.; OSWILER, G.D.; RICE, L.G.; PLATTNER, R.D.; WILSON, T.M. Production of fumonisinas by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* isolates associated with equine leukoencephalomalacia and a pulmonary edema syndrome in swine. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, p. 3225-3226, 1990.

ROTHROCK, C.S. Tillage systems and plant disease. **Soil Science**, v.154, p.308-315, 1992.

SAMSON, R.A., HOESKSTRA, E.S., FRISVAD, J.C., FILTENBORG, O. **Introduction to food-borne fungi**. 4.ed. The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 1995b.

SAMSON, R.A., HOESKSTRA, E.S., FRISVAD, J.C., FILTENBORG, O. Occurrence of Food-Borne Fungi and Factors for Growth. In: _____. **Introduction to food-borne fungi**. 4.ed. The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 1995a. p.243-250.

SANTOS, H.P.; LHAMBY, J.C.B.; PRESTES, A.M.; LIMA, M.R. Efeito de manejos de solo e de rotação de culturas de inverno no rendimento e doenças de trigo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, p.2355-2361, 2000.

SANTOS, H.P.; REIS, E.M.; DERPSCH, R. Rotação de culturas. In: EMBRAPA/CNPTrigo et al. **Plantio Direto no Brasil**. Passo Fundo: Ed. Aldeia Norte, 1993.

SCHIABEL, V.C. **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.

SCHULTZ, L.A. Sistema de preparo do solo. In: _____. **Manual do plantio direto: técnicas e perspectivas**. Porto Alegre:Agropecuária, 1978. p.15-19.

SEO, J.A.; KIM, J.C.; LEE, Y.W. Isolation and characterization of two new type C fumonisins produced by *Fusarium oxysporum*. **Journal of Natural Products**, v.59, p.1003-1005, 1996.

SEO, J.A.; KIM, J.C.; LEE, Y.W. N-acetyl derivatives of type C fumonisins produced by *Fusarium oxysporum*. **Journal of Natural Products**, v.62, p.355-357, 1999.

SHEPHARD, G.S., SYDENHAM, E.W., THIEL, P.G., GELDERBLUM, W.C.A. Quantitative determination of fumonisins B₁ and B₂ by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Liquid Chromatography**, v.13., p.2077-2087, 1990.

SHIM, W.; WOLOSHUK, C.P. Nitrogen repression of fumonisin B₁ biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*. **FEMS Microbiology Letters**, v.177, p.109-116, 1999.

SHOTWELL, O.L.; GOULDEN, M.L.; HESSELTINE, C.W. Aflatoxin: distribution in contaminated corn. **Cereal Chemistry**, v.51, p.492-499, 1974.

SHOTWELL, O.L.; HESSELTINE, C.W. Use of bright greenish yellow fluorescence as presumptive test for aflatoxin in corn. **Cereal Chemistry**. V.58, p.124-127, 1981.

SIDIRAS, N.; PAVAN, M.A. Influência do sistema de manejo do solo no seu nível de fertilidade. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.9, n.3, p.249-254, 1985.

SINGH, K., FRISVAD, J.C., THRANE, U., MATHUR, S.B. An illustrated manual on identification of some seed-borne *Aspergilli*, *Fusaria*, *Penicillia* and their mycotoxins. Hellerup/Denmark/: **Danish Government**, 1991.

SINHA, K.K.; SINHA, A.K. Effect of *Stophilus oryzae* infestation on *Aspergillus flavus* infection and alatoxin contamination in stored wheat. **Journal of Stored Products Research**, v.27, p.65-68, 1991.

SOARES, L.V. Noções de Controle de Qualidade e Segurança de Qualidade Analítica. In: _____. **Curso Básico de Instrumentação para Analistas de Alimentos e Fármacos**. Barueri: Manole, 2006. p.43-54.

SOARES, L. M. V.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Survey of aflatoxins, ochratoxins, zearalenone and sterigmatocystin in some Brazilian foods by using mult-toxin thin layer chromatographic method. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, v.72, p.22-26, 1989.

SYDENHAM, E.W.; THIEL, P.G.; SHEPHARD, G.S.; KOCH, K.R.; HUTTON, T. Preparation and isolation of the partially hydrolysed moiety of fumonisin B₁. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.43, p.2400-2405, 1995.

TANAKA, M.A.S. Sobrevivência de *Fusarium moniliforme* em Sementes de Milho Mantidas em Duas Condições de Armazenamento. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, p.60-64, 2001.

TANIWAKI, M.H.; FONSECA, H.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A. Variabilidade de produção de aflatoxinas por linhagens de *Aspergillus Flavus* EM DIFERENTES TEMPOS DE manutenção. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.50, p.140-150, 1993.

TEIXEIRA, L.A.J.; TESTA, V.M.; MIELNICZUK, J. Nitrogênio no solo, nutrição e rendimento de milho afetados por sistemas de culturas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.18, p.207-14, 1994.

THIEL, P.C.; MARASAS, W.F.O; SYDENHAM, E.W.; SHEPHARD, G.S.; GELDERBLUM, W.C.; NIEUWENHUIS, J.J. Survey of fumonisin production by *Fusarium* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 1089-1093, 1991.

THIEL, P.G.; SYDENHAM, E.W.; SHEPHARD, G.S. The Reliability and Significance of Analytical Data on the Natural Occurrence of Fumonisin in Food. In: JACKON, L.S.; DEVRIES, J.W.; BULLERMAN, L.B. **Fumonisin in Food**. New York and London: Plenum Press, 1996. p.1-17.

THOMPSON, C.; HENKE, S.E. Effect of climate and type of storage container on aflatoxin production in corn and its associated risks to wildlife species. **Journal of Wildlife Diseases**, v.36, p.172-179, 2000.

TOMAŠEVIĆ-ČANOVIĆ, M.; DACOVIĆ, A.; ROTTINGHAUS, G.; MATIJAŠEVIĆ, S.; ĐURIČIĆ, M. Surfactant modified zeolites – new efficient adsorbents for mycotoxins. **Microporous and Mesoporous Materials**, v.61, p. 173-180, 2003.

UENO, Y., AOYAMA, S., SUGIURA, Y., WANG, D.S., LEE, U.S., HIROOKA, E.Y., HARA, S., KARKI, T., CHEN, G., YU, S.Z. A limited survey of fumonisins in corn and corn-based products in Asian countries. **Mycotoxin Research**, v.9, p.27-34, 1993.

UENO, Y.; IJIMA, K., WANG, S-D.; SUGIURA Y.; SEKIJIMA, M.; TNAKA, T.; CHEN,C.; YU, S-Z. Fumonisin as a possible contributory risk factor for primary liver cancer: A 3-year study of corn harvested in Haimen, China, by HPLC and ELISA. **Fd. Chem. Toxicol**, v.35, p.1143-1150, 1997.

VILDES, M.S. Fumonisin. In: _____. **Micotoxinas em Alimentos**. Florianópolis: Insular, 1998. p.19-30.

VIQUEZ, O.M.; PERES, M.E.C.; SHELBY, R.A.; BROWN, G. Aflatoxin contamination in corn samples due to environmental conditions, aflatoxin-producing strains, and nutrients in grain grown in Costa Rica. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.42, p. 2551-2555, 1994.

VISCONTI, A.; BOENKE, A. Improvement of the determination of fumonisins (FB₁ and FB₂) in Maize-based feeds. **European Comisión BCR Information – Chemical Análisis**, Belgium, Brussels, 1995.

YOKOYAMA, L.P.; SILVEIRA, P.M.; STONE, L.F. Rentabilidade das culturas de milho, soja e trigo em diferentes sistemas de preparo do solo. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.32, n.2, p.75-79, 2002.

WEIBKING, T.S.; LEDOUX, D.R.; BERMUDEZ, A.J.; ROTTINGHAUS, G.E. Individual and combined effects of feeding *Fusarium moniliforme* culture material, containing known levels of fumonisin B₁ and aflatoxin B₁ in the young turkey poult. **Poultry Science**, v.73, p.1517-1525, 1994.

WEIBKING, T.; LEDOUX, D.R.; BERMUDEZ, A.J.; TURK, J.R.; ROTTINGHAUS, G.E.; WANG, E.; MERRIL Jr, A.H. Effects of feeding *Fusarium moniliforme* culture material, containing known levels of fumonisin B₁, on the young broiler chick. **Poultry Science**, v. 72, p.456-466, 1993.

WIDSTROM, N.W. The aflatoxin problem with corn grain. **Advances in Agronomy**, v.56, p.219-280, 1996.

WILSON, D.M.; PAYNE, G.A. Factors affecting *Aspergillus flavus* group infection and aflatoxina contamination of crops. In: EATON, D. L.; GROOPMAN, J. D. **The toxicology of aflatoxins**: human health, veterinary and agricultural significance. London: Academic Press, 1994. p. 309-346.

ANEXOS

ANEXO A

Croqui da área experimental da Fazenda escola -UEL, 1 = 0 kg.ha⁻¹ DNC; 2 = 22,5 kg.ha⁻¹ DNC; 3 = 45,0 kg.ha⁻¹ DNC; 4 = 90,0 kg.ha⁻¹ DNC; 5 = K⁺ + 90,0 kg.ha⁻¹ DNC (Safrá 2006).

Á R E A	<u>2</u>	<u>5</u>	<u>4</u>	<u>2</u>	<u>4</u>	<u>3</u>	<u>1</u>	<u>5</u>	<u>4</u>	<u>1</u>	P D A	E S T R A D A ↑ ↓
	<u>2</u>	<u>1</u>	<u>3</u>	<u>5</u>	<u>5</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>1</u>	<u>3</u>		
A V E I A	<u>4</u>	<u>2</u>	<u>5</u>	<u>3</u>	<u>3</u>	<u>1</u>	<u>4</u>	<u>2</u>	<u>1</u>	<u>3</u>	P C A	
	<u>1</u>	<u>5</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>4</u>	<u>2</u>	<u>5</u>	<u>2</u>	<u>1</u>		
Á R E A	<u>5</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>2</u>	<u>2</u>	<u>5</u>	<u>3</u>	P D P	
	<u>3</u>	<u>1</u>	<u>1</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>1</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>2</u>	<u>4</u>		
P O U S I O	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>2</u>	<u>1</u>	<u>5</u>	<u>2</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>4</u>	<u>3</u>	P C P	
	<u>1</u>	<u>5</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>2</u>	<u>4</u>	<u>1</u>	<u>1</u>	<u>3</u>	<u>5</u>		

DNC = Dose de nitrogênio em cobertura;

PDA = Plantio direto com aveia;

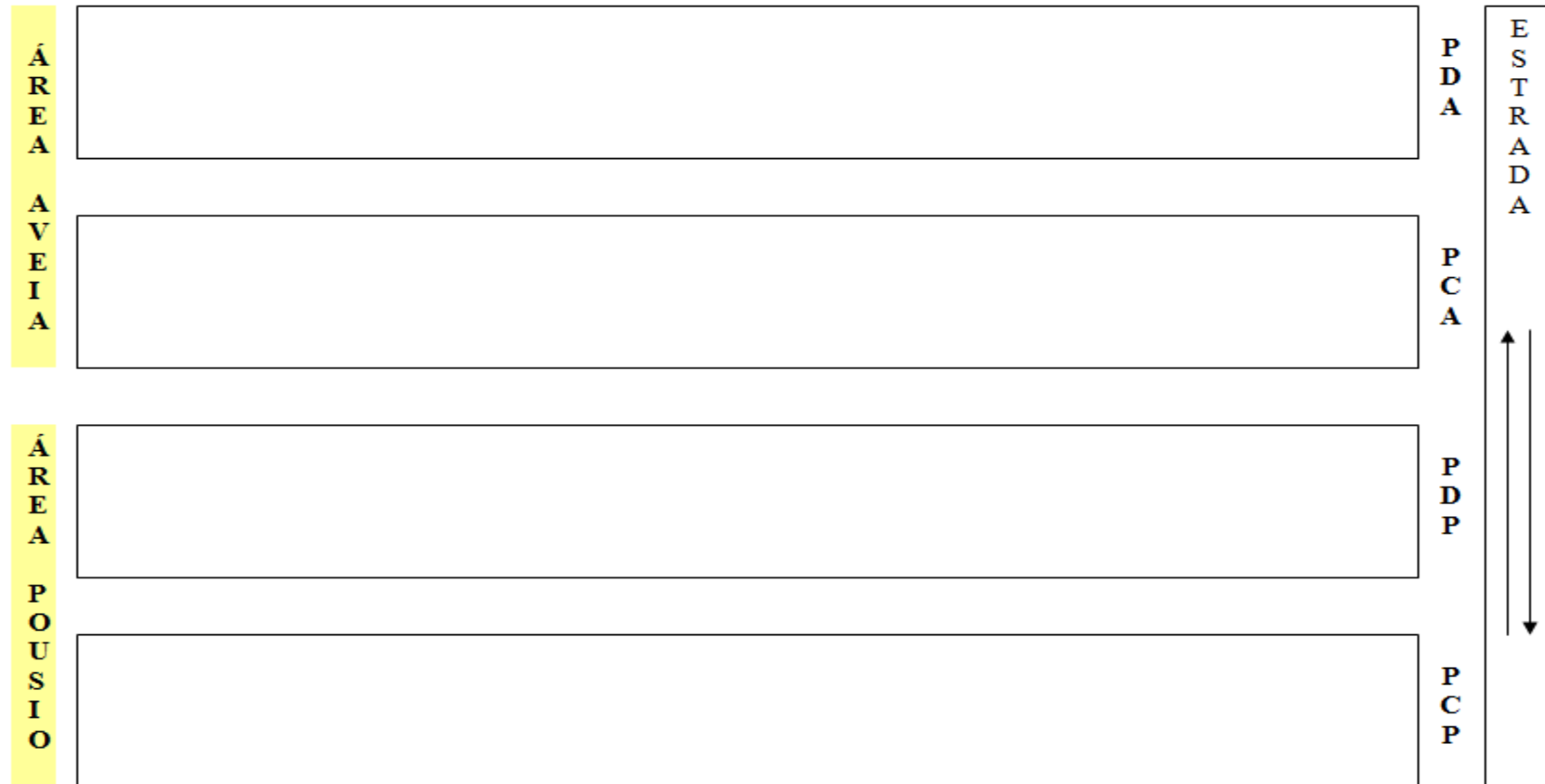
PCP = Plantio convencional com aveia;

PDP = Plantio direto com pousio;

PCP = Plantio convencional com pousio.

ANEXO B.

Croqui da área experimental da Fazenda escola –UEL (Safrá 2007).



DNC = Dose de nitrogênio em cobertura;
PDA = Plantio direto com aveia;
PCP = Plantio convencional com aveia;
PDP = Plantio direto com pousio;
PCP = Plantio convencional com pousio.