



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

WAGNER EZEQUIEL RISSO

**INFLUÊNCIA DE PRÁTICAS AGRÍCOLAS NA COMPOSIÇÃO  
QUÍMICA E QUALIDADE SANITÁRIA -  
FUMONISINA EM  
MILHO**

---

Londrina  
2013

WAGNER EZEQUIEL RISSO

**INFLUÊNCIA DE PRÁTICAS AGRÍCOLAS NA COMPOSIÇÃO  
QUÍMICA E QUALIDADE SANITÁRIA -  
FUMONISINA EM  
MILHO**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, como um dos requisitos à obtenção de título de Doutor em Ciência de Alimentos. Apoio financeiro pelo projeto nº 5784542008-4 do CNPq-MAPA/SDA, Projeto nº 23 da CAPES/NANOBIÓ e V33/2004 da UGF/SETI Fundo Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Elisa Yoko Hirooka..

Londrina  
2013

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da  
Universidade Estadual de Londrina**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

R596i Risso, Wagner Ezequiel.  
Influência de práticas agrícolas na composição química e qualidade sanitária  
: fumonisina em milho / Wagner Ezequiel Risso. – Londrina, 2013.  
159 f. : il.

Orientador: Elisa Yoko Hirooka.  
Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina,  
Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos,  
2013.

Inclui bibliografia.

1. Alimentos – Qualidade – Teses. 2. Milho – Inoculação – Teses. 3. Solos –  
Lixiviação – Teses. 4. Azospirillum brasilense – Teses. 5. Micotoxinas – Teses.  
I. Hirooka, Elisa Yoko. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências  
Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. III. Título.

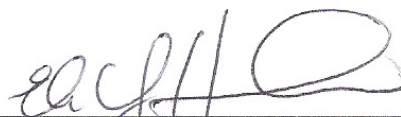
CDU 641.002.61

WAGNER EZEQUIEL RISSO

INFLUÊNCIA DE PRÁTICAS AGRÍCOLAS NA COMPOSIÇÃO QUÍMICA  
E QUALIDADE SANITÁRIA - FUMONISINA EM MILHO

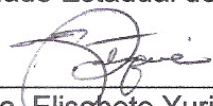
Tese de Doutorado apresentada ao Programa  
de Pós-graduação em Ciência de Alimentos da  
Universidade Estadual de Londrina, como um  
dos requisitos à obtenção de título de Doutor  
em Ciência de Alimentos.

**BANCA EXAMINADORA**



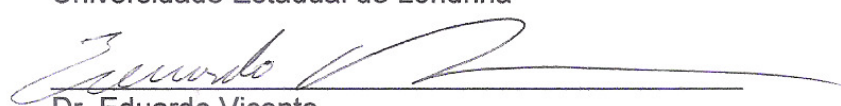
---

Profa. Orientadora: Dra. Elisa Yoko Hirooka  
Universidade Estadual de Londrina



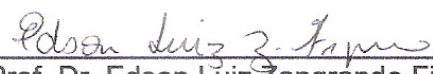
---

Profa. Dra. Elisabete Yurie Sataque Ono  
Universidade Estadual de Londrina



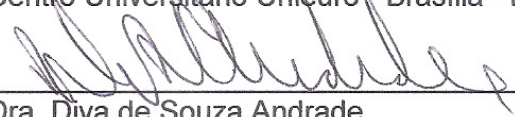
---

Dr. Eduardo Vicente  
Instituto de Tecnologia de Alimentos - Campinas - SP



---

Prof. Dr. Edson Luiz Zangrando Figueira  
Centro Universitário Unieuro - Brasília - DF



---

Dra. Diva de Souza Andrade  
Instituto Agrônômico do Paraná

Londrina, 29 de julho de 2013.

## AGRADECIMENTOS

- À Professora Dra. Elisa Yoko Hirooka pela ótima orientação e principalmente pela amizade e dedicação na realização de todas as etapas do trabalho.
- Ao Prof. Dr. Claudemir Zucarelli, Dr. André Mateus Prando e Ms. Denis Piazzoli pelas colaborações e por terem cedido gentilmente amostras de milho para a realização deste trabalho.
- À Dra. Diva de Souza Andrade pela oportunidade da realização dos experimentos com lixiviado de aterro sanitário e coleta de amostras para realização desta tese.
- À Professora Dra. Sandra Márcia Cesário Pereira da Silva pelos contatos e orientações em relação a coleta de lixiviado nos aterros sanitários;
- À Professora Dra. Maria Claudia Bueno dos Reis Martinez por ter cedido e orientado no uso do Espectrômetro de Absorção Atômica;
- À Professora Dra. Elisabete Sataque Ono pela colaboração nas análises de contaminação do milho por fumonisininas por meio da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.
- As Professoras Dra. Ieda Spacino Scarminio e Dra. Sandra Garcia pelas orientações e sugestões dadas no exame de qualificação;
- À minha namorada Fernanda Delarozza, pelo seu carinho, paciência, motivação e companheirismo durante toda esta longa jornada.
- Aos estagiários que ajudaram muito durante a realização deste trabalho: Suzy Kurokawa, Artur Kikuchi, Renata Hamada e Ágata Barradas.
- Aos amigos do laboratório: Dani Luce, Joice Sifuentes, Cássia Takabayashi, Angélica Ishikawa, Thiago Montagner, Leandro Ferrari, Tatiana Oliveira, Tatiane Miguel, Marsilvio Filho, Juliano Zanela, Mônica Reis, Cintia Handa, Diogo Pedrolo, Uenifer Couto, Aline Vicensoti.
- A todos do Instituto Agrônomo do Paraná, em especial ao técnico Antonio Rosa, pela imprescindível colaboração no campo experimental.
- A todos do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, especialmente a Patrícia Sambatti e Neusa Cassula.
- Aos professores do Programa de pós-graduação em Ciência de Alimentos.
- A todos do Departamento de Ciências Fisiológicas, professores e técnicos.
- À minha família pela confiança e motivação.
- A todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

RISSO, Wagner Ezequiel. **Influência de práticas agrícolas na composição química e qualidade sanitária - fumonisina em milho.** 2013. 159 p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

## RESUMO

Práticas agrícolas de manejo e tratos culturais em milho, associadas ao sistema de plantio e fertilização, constitui controle fitossanitário visando melhorar a qualidade de grão e redução da contaminação por micotoxinas, além de associar à sustentabilidade e conservação do solo. Visando avaliar o efeito de três práticas agrícolas em grão de milho produzido perante composição química e qualidade sanitária, com ênfase à fumonisinas, procedeu-se: (i) fertilização com cinco doses de lixiviado de aterro sanitário (composição química, metais, contagem fúngica, fumonisinas e produtividade); (ii) densidade de plantas sob cinco doses de N em cobertura (análise físico-química, contagem fúngica e fumonisinas); (iii) inoculação de sementes com *Azospirillum brasilense* acoplado ao cultivo sob doses de N em cobertura nas regiões Norte e Centro-Sul do Estado do Paraná (teor de proteínas, contagem fúngica e fumonisinas). Aplicação de doses crescentes de lixiviado (0; 32,7; 65,4; 98,1 e 130,8 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup>) aumentou a produtividade e os teores de proteínas, cinzas e lipídios nos grãos. Maior concentração de fumonisina total (FB<sub>1</sub> + FB<sub>2</sub>) foi detectada no controle sem adubação e nos tratamentos com lixiviado, no qual apresentaram maior frequência de amostras contaminadas com níveis superiores ao limite máximo tolerado pela ANVISA-MS (5,0 µg g<sup>-1</sup>). A fertilização com lixiviado não afetou o teor de cálcio, magnésio, sódio, potássio, zinco, cobre, níquel e chumbo do grão, exceto manganês, cuja concentração aumentou com aplicação de lixiviado. (p > 0,05). Contudo, observou-se tendência de aumento na concentração de chumbo no ano 2009/2010 e sódio em 2011/2012 com incremento nas doses de lixiviado. O manejo orientado para densidade de plantas (60, 75, 90 e 105 mil plantas ha<sup>-1</sup>) e doses de N em cobertura (0, 60, 120, 180 e 240 kg ha<sup>-1</sup>) não afetou contaminação fúngica em grãos de milho. Fumonisinas foram detectadas em milho com média de 1,50 µg g<sup>-1</sup> (2009/2010) e 1,72 µg g<sup>-1</sup> (2010/2011). A tendência no aumento de contaminação por fumonisinas ocorreu incrementando a densidade de plantas, obtendo-se maior frequência de amostras com nível superior ao limite máximo permitido. Embora as respostas variassem conforme ano de avaliação, teores de proteínas e cinzas aumentaram incrementando doses de N e diminuíram pelo aumento na densidade de plantas. O teor de amido em grão aumentou com incremento de densidade de plantas e diminuiu pelo incremento na fertilização nitrogenada. Em experimentos conduzidos nas regiões Norte e Centro-Sul do Estado do Paraná, a inoculação de sementes com *Azospirillum brasilense* (com e sem) e doses de N (0, 30, 60, 90 e 120 kg ha<sup>-1</sup> na Região Norte e 0, 50, 100, 150 e 200 kg ha<sup>-1</sup> na Centro-Sul) não afetou a contaminação de milho por fungos (p > 0,05). Nas duas regiões, o teor de proteínas em grãos aumentou com incremento nas doses de N e a inoculação com *A. brasilense* não produziu efeito significativo para esta variável. Na Região Norte, fumonisinas foram detectadas em 90% das amostras em 2010/2011 (média de 0,62 µg g<sup>-1</sup>) e 97,5% em 2011/2012 (média de 4,34 µg g<sup>-1</sup>). Na Região Centro-Sul, fumonisinas foram detectadas em 45% das amostras em 2010/2011 (média de 0,14 µg g<sup>-1</sup>) e 100% em 2011/2012 (média de 2,67 µg g<sup>-1</sup>), no qual amostras oriundas de tratamentos com inoculante apresentaram redução (43%)

nos níveis de fumonisinas ( $p < 0,05$ ), em comparação aos tratamentos sem inoculante, indicando fator favorável perante condução sequencial de prática agrícola com inoculante.

**Palavras-chave:** Milho, fumonisinas, lixiviado de aterro sanitário, densidade de plantas, *Azospirillum brasilense*.

RISSO, Wagner Ezequiel. **Influence of agricultural practices in chemical composition and sanitary quality - fumonisin in corn.** 2010. 159 p. Thesis (Doctor Degree in Food Science) – State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil.

## ABSTRACT

Agricultural management practices and cultural treatments of maize associated with cropping system and fertilization, pest control is to improve the quality of grain and reduction of mycotoxin contamination, besides involve sustainability and soil conservation To evaluate the effect of three agricultural practices in corn grain produced before chemical and sanitary quality, with emphasis on fumonisin, proceeded: (i) fertilization with five doses of landfill leachate (physico-chemical, metals, counting fungal, fumonisin and productivity), (ii) plant density under five levels of N fertilization (chemical analysis, fungal count and fumonisin), (iii) seed inoculation with *Azospirillum brasilense* coupled cultivation under different doses of N was in Northern and Central-Southern regions, Paraná State, Brazil (protein content, fungal count and fumonisin). Application of increasing doses of leachate (0, 32.7, 65.4, 98.1 and 130.8 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup>) increased productivity, protein content, lipid and ash in the grain. Highest concentration of total fumonisin (FB<sub>1</sub> + FB<sub>2</sub>) was detected in control without fertilization and treatments with leachate, which had a higher frequency of contaminated samples with levels above the maximum tolerated by ANVISA-MS (5.0 µg g<sup>-1</sup>). The leached fertilization did not affect the calcium, magnesium, sodium, potassium, zinc, copper, nickel and lead the grain except manganese, the concentration of which increased with application of leachate. (p > 0.05). However, there was a trend of increase in the concentration of lead in the year 2009/2010 and sodium in 2011/2012 with increased rates of leaching. The management-oriented plant density (60, 75, 90 and 105 thousand plants ha<sup>-1</sup>) and doses of N topdressing (0, 60, 120, 180 and 240 kg ha<sup>-1</sup>) did not affect fungal contamination in corn grain. Fumonisin were detected in maize with an average of 1.50 µg g<sup>-1</sup> (2009/2010) and 1.72 µg g<sup>-1</sup> (2010/2011). The trend in the increase of fumonisin contamination occurred increasing plant density, resulting in higher frequency of samples with levels higher than the maximum allowed. Although responses varied according to year of assessment, protein and ash content increased by increasing N and decreased by the increase in plant density. The starch content in grain increased with increasing plant density and decreased by the increase in nitrogen fertilization. In experiments conducted Northern and Central-Southern regions, Paraná State, Brazil, seed inoculation with *Azospirillum brasilense* (with and without) and N rates (0, 30, 60, 90 and 120 kg ha<sup>-1</sup> in Northern and 0, 50, 100, 150 and 200 kg ha<sup>-1</sup> in the Central-South) did not affect the fungal contamination of maize (p >0.05). In both regions, the protein content in grain increased with increasing doses of N and inoculation with *A. brasilense* produced no significant effect for this variable. In Northern, fumonisins were detected in 90% of samples in 2010/2011 (average of 0.62 µg g<sup>-1</sup>) and 97.5% in 2011/2012 (average of 4.34 µg g<sup>-1</sup>). In Central-Southern, fumonisins were detected in 45% of samples in 2010/2011 (average of 0.14 µg g<sup>-1</sup>) and 100% in 2011/2012 (average of 2.67 µg g<sup>-1</sup>), in which samples from treatments with inoculant had decreased (43%) in fumonisin levels (p <

0.05) compared to treatments without inoculation, indicating favorable factor towards conducting sequential agricultural practice with inoculant.

Keywords: Corn, fumonisins, landfill leachate, plant density, *Azospirillum brasilense*.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	13
2.1 OBJETIVO GERAL .....	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	13
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	14
3.1 MILHO .....	14
3.2 MICOTOXINAS EM MILHO .....	16
3.3 <i>FUSARIUM VERTICILLIOIDES</i> .....	18
3.4 FUMONISINAS .....	20
3.5 FATORES QUE INFLUENCIAM NA PRODUÇÃO DE FUMONISINAS .....	26
3.6 LEGISLAÇÃO SOBRE NÍVEIS DE FUMONISINAS EM ALIMENTOS .....	28
3.7 PRÁTICAS CULTURAIS: INFLUÊNCIA NA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E NA OCORRÊNCIA DE <i>FUSARIUM</i> SPP. E FUMONISINAS EM MILHO .....	30
3.7.1 Fertilização com Lixiviado de Aterro Sanitário .....	30
3.7.2 Adubação Nitrogenada .....	34
3.7.3 Densidade de Plantas e Espaçamento entre Linhas .....	36
3.7.4 Sistemas de Plantio .....	38
3.7.5 Utilização de Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas .....	39
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	42
4.1 MATERIAL .....	42
4.1.1 Infra-Estrutura .....	42
4.1.2 Localização das Áreas Experimentais .....	42
4.1.3 Amostras de Milho .....	42
4.2 MÉTODOS .....	43
4.2.1 Delineamento Experimental .....	43
4.2.1 Análise de Metais .....	47
4.2.2 Extração e Purificação de Fumonisinas .....	49
4.2.3 Quantificação de Fumonisinas .....	49
4.2.4 Análise da Microbiota Fúngica em Milho .....	52

4.2.5 Proteínas .....	53
4.2.6 Cinzas .....	53
4.2.7 Amido Disponível.....	54
4.2.8 Lipídios .....	56
4.2.9 Umidade .....	56
4.2.10 Atividade de Água.....	56

<b>5 ARTIGO 1: INFLUÊNCIA DE FERTILIZAÇÃO COM LIXIVIADO DE ATERRO SANITÁRIO NA COMPOSIÇÃO QUÍMICA, PRODUTIVIDADE E QUALIDADE SANITÁRIA DE MILHO .....</b>	<b>57</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>57</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>58</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>59</b>
<b>EXPERIMENTAL .....</b>	<b>61</b>
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>64</b>
<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>74</b>

<b>6 ARTIGO 2: EFEITO DE DOSES DE NITROGÊNIO EM COBERTURA E DENSIDADE DE PLANTAS EM ESPAÇAMENTO REDUZIDO NA CONTAMINAÇÃO POR FUMONISINA E PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DE GRÃOS DE MILHO.....</b>	<b>87</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>87</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>88</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>89</b>
<b>EXPERIMENTAL .....</b>	<b>91</b>
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>93</b>
<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>103</b>

<b>7 ARTIGO 3: EFEITO DA INOCULAÇÃO DE SEMENTE COM <i>AZOSPIRILLUM BRASILENSE</i> E ADUBAÇÃO NITROGENADA NA CONTAMINAÇÃO FÚNGICA E NÍVEL DE FUMONISINA EM MILHO .....</b>	<b>118</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>118</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>119</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>120</b>

<b>EXPERIMENTAL</b> .....	122
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	124
<b>CONCLUSÃO</b> .....	132
<b>8 CONCLUSÃO GERAL</b> .....	145
<b>9 REFERÊNCIAS</b> .....	146

## 1 INTRODUÇÃO

As práticas agrícolas de manejo e tratos culturais de milho, associadas ao sistema de semeadura e fertilização, constituem estratégias de controle fitossanitário visando melhorar a qualidade de grão, redução da contaminação por micotoxinas, além de associar à sustentabilidade e conservação do solo e água.

O milho constitui excelente substrato para fitopatógenos fúngicos, responsáveis por prejuízos econômicos e perdas na qualidade sanitária, física e nutricional desde o período de pré-colheita. Ênfase tem sido dada a um vasto número de espécies do gênero *Fusarium*, produtor de metabólitos secundários tóxicos, responsáveis por perigo à saúde humana e animal.

*Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg (= *Fusarium moniliforme* Sheldon, teleomorfo *Giberella moniliforme*, sinônimo *G. fujikuroi*) é o principal produtor de fumonisinas em milho, responsáveis pela leucoencefalomalácia em equinos, edema pulmonar e efeito cardiotoxico em suínos. A Agência Internacional para Pesquisa sobre o Câncer (IARC) em Lyon, França, avaliou as toxinas produzidas por *F. verticillioides* como cancerígenos do grupo 2B, isto é, possivelmente cancerígeno para seres humanos.

A elevada ocorrência de *F. verticillioides* e fumonisinas em milho incentiva a procura de alternativas capazes de garantir a produtividade e qualidade do produto. Híbridos resistentes, época de plantio e colheita, densidade de plantas, controle de pragas, manejo e fertilidade de solos destacam-se entre fatores que minimizam o impacto de contaminação por *Fusarium* spp. e, conseqüente produção de micotoxinas na fase de pré-colheita. Assim, práticas agrícolas adequadas, acopladas ao monitoramento contínuo na cadeia produtiva de milho, seriam alternativas fundamentais para minimização do perigo.

A maximização de cultivo na agricultura moderna demanda quantidade excessiva de fertilizante, sendo o milho uma das mais exigentes. A variável determinante em relação à fertilização do solo para milho é o nitrogênio, devido à participação na síntese de proteínas, enzimas, coenzimas, ácidos nucléicos, citocromos, entre outros. O milho requer adubação nitrogenada obrigatória em cobertura para complementar a quantidade suprida pelo solo, sendo a dose adequada fundamental, uma vez que a deficiência ou excesso favoreceria a proliferação fúngica, desencadeando a produção de micotoxinas.

A busca crescente pela maior produtividade e qualidade, aliado ao menor custo, elevam a participação de fertilizantes nitrogenados em 75% do custo, representando 40% do valor total da produção, além de causarem poluição ambiental. O aumento no rendimento e qualidade nutricional depende da eficiente canalização de C e N para o grão, transformando em componente estrutural e de reserva.

O uso do lixiviado de aterro sanitário na agricultura surgiu como alternativa de disposição deste resíduo devido ao alto teor de N amoniacal e carbono orgânico estabilizado. Outrossim, esta forma de disposição só será viável se os riscos ambientais forem evitados ou minimizados e, se os alimentos produzidos mantiverem níveis toleráveis de poluentes, principalmente metais pesados, assim como eventuais efeitos negativos na produtividade e qualidade das culturas agrícolas. Neste contexto, já é de conhecimento que a disponibilidade de minerais no solo influi na composição da planta e, conseqüente susceptibilidade ao ataque de patógenos. Além disso, as práticas de manejo agrícola exercem impacto direto na diversidade microbiana, principalmente em relação a sanidade do solo e cultura, influenciando a sustentabilidade.

Entre práticas culturais, a escolha do arranjo de plantas é um dos principais fatores na definição no rendimento dos grãos de milho, devido à interceptação na radiação solar e distribuição de sistema radicular no solo. A combinação adequada entre densidade de plantas e híbrido aumenta a produtividade, pois pequenas alterações na população podem afetar significativamente o rendimento de grãos. Alta população de plantas constitui fator relevante na ocorrência de doenças, a exemplo de podridão do colmo e espiga, elevando o número de grãos ardidos e conseqüente produção de micotoxinas.

Uma alternativa promissora para suprir a demanda por nitrogênio e redução de custos seria a fixação de N<sub>2</sub> atmosférico empregando simbiontes na rizosfera, a exemplo de *Azospirillum* spp., capaz de colonizar o habitat intra ou extra-raízes de uma ampla variedade de plantas. Estas bactérias diazotróficas beneficiam-se de nutrientes secretados pela raiz e, em contrapartida, favorecem a produtividade e a qualidade de produtos agrícolas, reduzindo a necessidade de insumos externos e os riscos ambientais. A otimização simbiote entre *Azospirillum brasilense* e milho poderia incrementar a produtividade e diminuir o custo, além de melhorar a qualidade nutricional e sanitária de grãos.

Considerando o potencial do Estado do Paraná entre maiores produtores nacionais de milho, é fundamental a procura de alternativa capaz de minimizar a contaminação fúngica e micotoxinas empregando práticas de manejo e monitoramento da cadeia produtiva do milho. Ou seja, procedimentos que visem não apenas maior produtividade de grãos, mas também melhor qualidade nutricional e sanitária, capazes de atender às exigências dos mercados interno e externo, no sentido de reduzir perigo à saúde humana e animal.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito de três práticas agrícolas associado ao manejo de milho (fertilização com lixiviado de aterro sanitário, densidade de plantas sob doses de N e inoculação com *A. brasilense* sob doses de N) em grão produzido quanto às alterações nas características físico-químicas e qualidade sanitária, com ênfase na contaminação por metais, *Fusarium* spp. e fumonisinas.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito da fertilização com diferentes doses de lixiviado de aterro sanitário sobre a composição físico-química, produtividade, contaminação por metais pesados e qualidade sanitária de grãos de milho;
- Determinar o efeito de diferentes doses de nitrogênio em cobertura e população de plantas sob espaçamento reduzido sobre a contaminação fúngica, fumonisinas e parâmetros físico-químicos em grãos de milho de primeira safra;
- Avaliar o efeito da inoculação com *Azospirillum brasilense* em sementes de milho sob diferentes níveis de adubação nitrogenada em campo experimental situados em duas regiões distintas quanto a condição climática e, repercussão na qualidade de grão produzido, com ênfase no teor de proteína, contaminação fúngica e de fumonisinas.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 MILHO

O milho é uma planta anual pertencente à Ordem *Gramineae*, família *Poaceae*, gênero *Zea* e espécie *mays*, cujo nome científico é *Zea Mays* L.. Originou-se entre sete e dez mil anos atrás nas Américas, possivelmente na América Central ou Sudoeste dos Estados Unidos. Logo depois do descobrimento, foi levado para a Europa e cultivado em jardins até que seu valor alimentício se tornasse conhecido. Desde então passou a ser plantado em escala comercial e difundiu-se pelo mundo desde a latitude de 58º norte (Rússia) até 40º sul (Argentina) (FANCELLI; DOURADO NETO, 2000).

A importância econômica do milho é caracterizada pelas diversas formas de utilização, que vão desde a alimentação animal até indústria de alta tecnologia, como produção de filmes e embalagens biodegradáveis. Porém, na cadeia produtiva de suínos e aves são consumidos aproximadamente 70% do milho produzido no mundo e entre 70 e 80% do milho produzido no Brasil (PAES, 2006; DUARTE et al., 2008).

O cultivo de milho no Brasil se divide em duas épocas. A primeira consiste na semeadura da safra de verão (primeira safra), que é feita nos fins de agosto na Região Sul e até os meses de outubro/novembro na Região Sudeste e Centro-Oeste, em condições de temperatura e precipitação adequadas. A segunda época refere-se a safra de outono/inverno (segunda safra), semeado extemporaneamente, geralmente de janeiro a março ou abril, quase sempre depois da soja precoce, predominantemente na região Centro-Oeste e nos estados do Paraná, São Paulo e Minas Gerais. Neste período, as condições climáticas são menos favoráveis à cultura do milho e, devido a estas condições, a densidade de plantio é de 10 a 20% menor em comparação a primeira safra (EMBRAPA, 2006).

Os maiores produtores mundiais de milho são Estados Unidos, China e Brasil, com respectivamente 314, 192 e 73 milhões de toneladas de milho (USDA, 2013). O Estado do Paraná configurou como um dos maiores produtores, com uma produção de 17 milhões de toneladas, segundo o Acompanhamento da Safra Brasileira: Grãos, divulgado pela Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2012).

O milho é considerado um alimento energético para a alimentação humana e animal, devido à sua composição predominantemente de carboidratos (amido) e lipídios (óleo). Pelo processo de refinamento obtêm-se dextrinas, óleos para fins alimentares e industriais, além de glicose líquida e sólida.

O óleo extraído constitui excelente fonte de ácidos graxos, representados pelos ácidos linoléico (59,8%), oléico (25,8%), palmítico (11%), esteárico (1,7%) e linolênico (1,1%). Os grãos do milho apresentam proteínas de baixo valor biológico devido à deficiência de lisina e triptofano, que são aminoácidos essenciais à dieta humana e de animais monogástricos (MORETTO; FETT, 1998; TOSELLO, 1999).

Segundo Paes (2006), a composição química dos grãos de milho é de 72% de carboidratos, sobretudo amido, 9,5% de proteínas, 9% de fibras e 4% de óleos (Tabela 1).

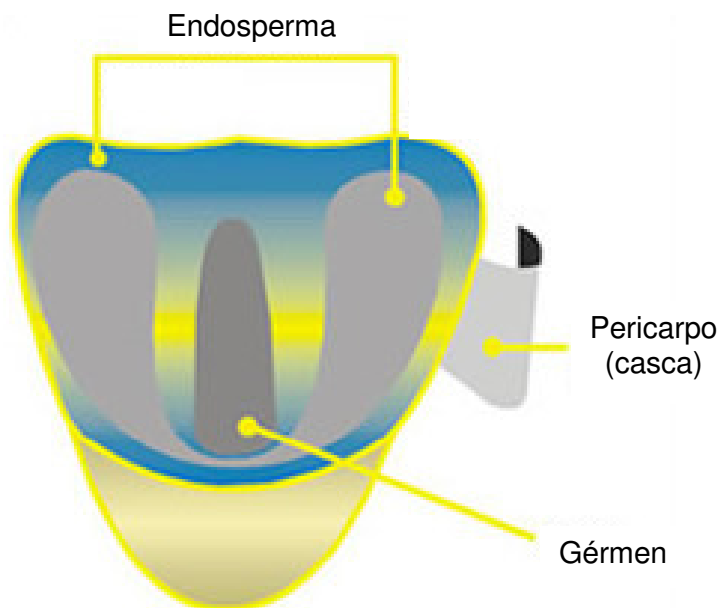
**Tabela 1** - Percentagem do constituinte total indicado nas estruturas físicas específicas do grão de milho.

Fração	% grão	Amido	Lipídios	Proteínas	Minerais	Açúcar
% da parte (base seca)						
Endosperma	82	98	15,4	74	17,9	28,9
Gérmen	11	1,3	82,6	22,5	78,4	69,3
Pericarpo	5	0,6	1,3	2,6	2,9	0,8
Ponta	2	0,1	0,7	0,9	0,8	1,0

Fonte: Adaptado a partir de Paes, 2006.

Conhecido botanicamente como uma cariopse, o grão de milho é formado por três principais estruturas físicas: endosperma, gérmen, pericarpo (casca) (Figura 1), as quais diferem em composição química e também na organização interna do grão.

**Figura 1** – Esquema com as principais estruturas físicas do grão de milho.



Fonte: ABIMILHO (2006).

A presença de micro-organismos nos grãos de milho, especialmente fungos toxigênicos, acarreta perdas econômicas e perigo à saúde humana e animal, uma vez que metabólitos tóxicos podem ser produzidos (SWEENEY; DOBSON, 1998). Considerando a ocorrência de elevados níveis de contaminação de milho por fungos toxigênicos e micotoxinas, se faz necessário à busca por alternativas que garantam a produtividade e qualidade do produto. Dentre estas alternativas, emprego de práticas agrícolas adequadas e constante monitoramento da cadeia produtiva do milho são fundamentais quando se busca minimizar o perigo à saúde humana e animal.

### 3.2 MICOTOXINAS EM MILHO

O crescimento da preocupação mundial em relação à qualidade dos alimentos tem aumentado o interesse na contaminação por fungos e subsequente produção de micotoxinas, principalmente no milho, que é um dos mais importantes alimentos na dieta básica em todo o mundo. No Brasil, o milho foi o *commodity* mais

investigado e fungos toxigênicos foram encontrados com alta frequência neste alimento (FANDOHAN et al., 2005; RODRIGUEZ-ALMAYA; SABINO, 2002).

As micotoxinas pertencem a uma família grande de compostos, sendo que muitos destes tem causado grandes implicações como agentes de efeitos tóxicos em humanos e animais. As micotoxinas são definidas como metabólitos secundários fúngicos de baixo peso molecular, sendo que uma ampla variedade destes metabólitos pode ser tanto micotóxicos (tóxico para animais) quanto fitotóxicos (tóxicos para plantas) (CAST, 2003; DESJARDINS; HOHN, 1997).

A produção de uma micotoxina em particular é geralmente limitada a um número relativamente pequeno de fungos, que pode ser de espécie ou mesmo estirpe específica. Estes abrangem as aflatoxinas (produzidas por *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*), deoxinivalenol e zearalenona (produzidas principalmente por *Fusarium graminearum*) e fumonisinas (produzidas sobretudo por *Fusarium verticillioides* e *F. proliferatum*). Micotoxinas que provavelmente são de significância para o Brasil e outros países tropicais em desenvolvimento são fumonisinas e aflatoxinas (D'MELLO; MACDONALD, 1997; MUNKVOLD, 2003a; MORENO et al., 2009). *Fusarium* é o principal gênero fúngico produtor de micotoxinas encontrado em milho antes ou imediatamente após a colheita; espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* são mais comumente encontradas como contaminantes de milho e seus derivados durante a secagem e posterior armazenamento (SWEENEY; DOBSON, 1998).

Os grãos de milho podem ser danificados por fungos em duas condições específicas, isto é, em pré-colheita (podridões fúngicas de espigas com a formação de grãos ardidos) e em pós-colheita durante o beneficiamento, o armazenamento e o transporte (grãos mofados ou embolorados). Fungos de campo, que invadem grãos no estágio de pré-colheita requerem alto teor de umidade (20-21%) e incluem gêneros *Alternaria*, *Cladosporium*, *Fusarium* e *Helminthosporium*. Por outro lado, fungos de armazenagem requerem teor de umidade na faixa de 16% para invasão micelial e compreendem espécies pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* (PINTO, 2005; WATSON; RAMSTAD, 1987).

É importante ressaltar que a presença do fungo toxigênico não implica necessariamente na produção de micotoxinas, as quais estão intimamente relacionadas à capacidade de biossíntese do fungo e condições ambientais predisponentes (PINTO, 2005).

A busca de meios de prevenção e controle da contaminação fúngica e produção de micotoxinas aumentaram notadamente, perfazendo 27% dos artigos publicados por pesquisadores brasileiros na área de micotoxinas, incluindo investigações sobre fatores influentes, tais como: resistência de genótipos, atividade de água, umidade relativa, temperatura, presença de metais, tipo de solo e infestação com insetos, além do potencial antagônico de outros micro-organismos contra fungos produtores de micotoxinas (RODRIGUES-ALMAYA; SABINO, 2002).

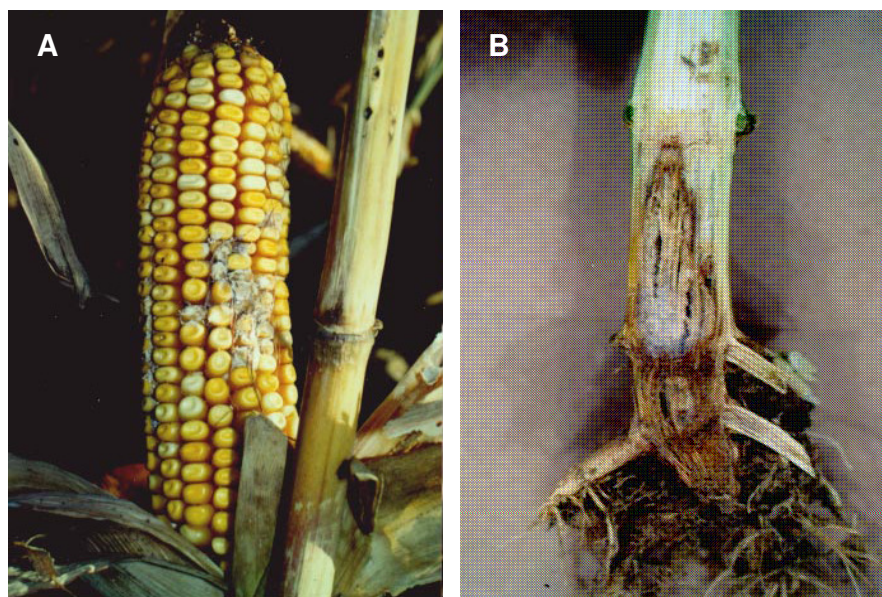
### 3.3 *FUSARIUM VERTICILLIOIDES*

O número de espécies do gênero *Fusarium* que existem em solo agrícola é bastante amplo e incluem saprófitas que decompõem resíduos de plantas no solo assim como patógenos que podem causar apodrecimento, murchamento e outras doenças em plantas. Vários fungos são associados ao milho durante o período de pré- e pós-colheita, sendo que o gênero *Fusarium* contém as mais importantes espécies toxigênicas (CAST, 2003; FANDOHAN et al., 2005).

A espécie produtora de fumonisinas mais comumente associada ao milho é *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg (= *Fusarium moniliforme* Sheldon, teleomorfo *Giberella moniliforme*, sinônimo *Giberella fujikuroi*). Este fungo não é apenas patógeno mais comum de milho, mas também está entre os fungos mais comuns encontrados colonizando a planta de milho de forma assintomática e, em muitos casos, sua presença é ignorada por não causar danos visíveis (SEIFERT et al., 2003; MUNKVOLD; DESJARDINS, 1997). O maior problema deste tipo de infecção é a produção de micotoxinas, principalmente fumonisinas, contaminando grãos de milho.

*Fusarium verticillioides* é responsável por fitopatologias em todos os estágios de desenvolvimento de milho, podendo causar podridão de colmo, raiz e espiga (Figura 2), além de deterioração de grãos armazenados, causando perdas econômicas para produtores (MUNKVOLD; DESJARDINS, 1997).

**Figura 2** – Fitopatologias do milho causadas por *F. verticillioides*. (A) podridão de espiga moderada e (B) podridão de raiz e colmo.



Fonte: Munkvold e Desjardins (1997).

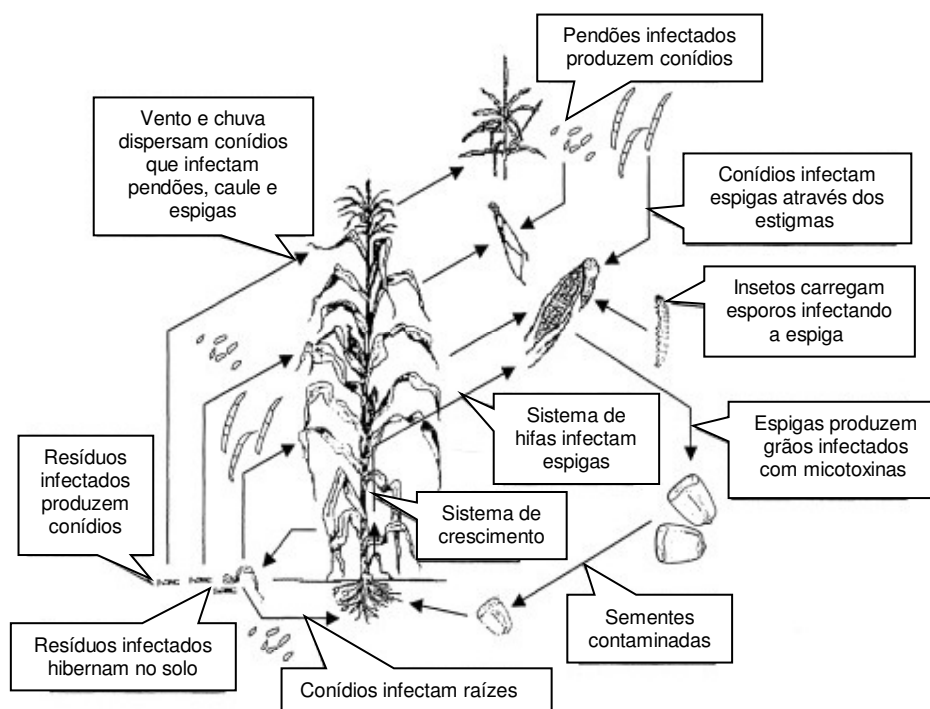
A faixa de temperatura ótima para crescimento de *F. verticillioides* situa-se entre 22,5 e 27,5 °C e atividade de água deve ser relativamente alta (aproximadamente 0,98) e teor de umidade acima de 22%. Espécies do gênero *Fusarium* dominam sobre outros fungos em atividade de água alta (acima de 0,95); em atividade de água abaixo de 0,80 (18% de umidade), espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* se tornam mais competitivos (MARÍN et al., 1998; REYNERI, 2006).

Em condições experimentais, um aumento da temperatura e/ou atividade de água fez aumentar também a taxa de crescimento de *F. verticillioides*. Contudo, toxinas são produzidas em temperaturas baixas, isso significa que *Fusarium* produz micotoxinas sob efeito de choque térmico, principalmente com alternância das temperaturas diurna e noturna (SAMAPUNTO et al., 2005; PINTO, 2005).

As principais fontes de inóculo de *F. verticillioides* no campo são resíduos de milho incorporados ou cobrindo o solo, sementes infectadas e o próprio solo (COTTON; MUNKVOLD, 1998; MILLER, 2001). Assim, a quantidade de inóculo num campo é muito variável e, por conseguinte, difícil de quantificar. *F. verticillioides* pode invadir o grão de milho por três vias (Figura 3): (i) sistema de crescimento por

meio da transmissão para semente, raízes, folhas ou colmos; (ii) infecção por macroconídios e microconídios que são produzidos sobre resíduos de colheita e espalhados pelo vento e/ou chuva e pendões contaminados que infectam espigas através dos estigmas ou em ferimentos causados por insetos; e (iii) insetos atuando como vetores de conídios (MAIORANO et al., 2009).

**Figura 3** - Ciclo de vida de *Fusarium verticillioides* em milho.



**Fonte:** Adaptado a partir de Battilani et al. (2003).

### 3.4 FUMONISINAS

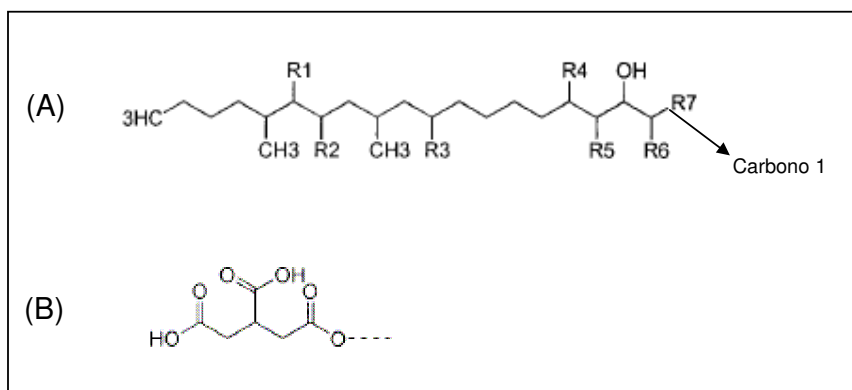
Fumonisin, um grupo de micotoxinas possivelmente carcinogênicas foram primeiramente isoladas a partir de culturas de *Fusarium moniliforme* MRC826 em Tygerberg, África do Sul. Micotoxinas solúveis em água, fumonisin são produzidas por várias espécies de *Fusarium*, principalmente *F. verticillioides* e *F. proliferatum*, sendo que a primeira prevalece em culturas de milho e sorgo (GELDERBLUM et al., 1988; KRSKA; WELZIG; BOUDRA, 2007; WANG et al., 2008). Ressalta-se que os fungos citados anteriormente não são únicos produtores de fumonisin, pois quinze outras espécies do gênero *Fusarium*, além de *Alternaria*

*alternata*, são também produtores de fumonisinas. Constatou-se que *Aspergillus niger* pode produzir fumonisina B<sub>2</sub> (FB<sub>2</sub>), acarretando sérios problemas para indústria biotecnológica que utiliza este fungo para produção de diversas enzimas (RHEEDER; MARASAS; VISMER, 2002; FRISVAD et al., 2007).

O isolamento e caracterização química de micotoxinas e carcinógenos produzidos por *F. verticillioides* tornaram-se matéria de suma importância. Mais de vinte e oito análogos de fumonisinas foram descobertos e podem, provavelmente, ser encontrados outros (MARASAS, 2001; RHEEDER; MARASAS; VISMER, 2002; HUMPF; VOSS, 2004). Os análogos de fumonisinas que foram caracterizados desde 1988, podem ser separados em quatro grupos principais, identificados como fumonisinas das séries A, B, C e P (Figura 4 e Tabela 2). Dentre todos estes análogos, alguns das séries A, B e C já foram encontrados contaminando naturalmente milho e produtos à base de milho (RHEEDER; MARASAS; VISMER, 2002; SEO; LEE, 1998).

Fumonisinás são moléculas estruturalmente relacionadas, caracterizadas por uma cadeia linear de 20 átomos de carbono, com grupos metil unidos aos carbonos 12, 16 e 20, um grupo hidroxila junto ao carbono 3. Na molécula encontram-se distribuídos sete radicais, sendo as fumonisinas classificadas de acordo com os radicais que formam o composto (SEO; LEE, 1998; RHEEDER; MARASAS; VISMER, 2002).

**Figura 4** - (A) Estrutura básica de fumonisina e (B) Ácido tricarbálico (TCA).



Fonte: Rheeder, Marasas e Vismer (2002).

**Tabela 2** - Análogos de fumonisinas.

Análogo	Cadeias laterais (radicais)						
	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7
FA <sub>1</sub>	TCA	TCA	OH	OH	H	NHCOCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
FA <sub>2</sub>	TCA	TCA	H	OH	H	NHCOCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
FA <sub>3</sub>	TCA	TCA	OH	H	H	NHCOCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
PHFA <sub>3</sub>	TCA	OH	OH	H	H	NHCOCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
PHFA <sub>3</sub>	OH	TCA	OH	H	H	NHCOCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
HFA <sub>3</sub>	OH	OH	OH	H	H	NHCOCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
FAK <sub>1</sub>	=O	TCA	OH	OH	H	NHCOCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
FBK <sub>1</sub>	=O	TCA	OH	OH	H	NH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>
FB <sub>1</sub>	TCA	TCA	OH	OH	H	NH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>
Iso-FB <sub>1</sub>	TCA	TCA	OH	H	OH	NH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>
PHFB <sub>1</sub> <sup>a</sup>	TCA	OH	OH	OH	H	NH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>
PHFB <sub>1</sub> <sup>b</sup>	OH	TCA	OH	OH	H	NH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>
HFB <sub>1</sub>	OH	OH	OH	OH	H	NH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>
FB <sub>2</sub>	TCA	TCA	H	OH	H	NH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>
FB <sub>3</sub>	TCA	TCA	OH	H	H	NH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>
FB <sub>4</sub>	TCA	TCA	H	H	H	NH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>
FB <sub>5</sub>							
FC <sub>1</sub>	TCA	TCA	OH	OH	H	NH <sub>2</sub>	H
N-acetil-FC <sub>1</sub>	TCA	TCA	OH	OH	H	NHCOCH <sub>3</sub>	H
Iso-FC <sub>1</sub>	TCA	TCA	OH	H	OH	NH <sub>2</sub>	H
N-acetil-iso- FC <sub>1</sub>	TCA	TCA	OH	H	OH	NHCOCH <sub>3</sub>	H
OH-FC <sub>1</sub>	TCA	TCA	OH	OH	OH	NH <sub>2</sub>	H
N-acetil-OH- FC <sub>1</sub>	TCA	TCA	OH	OH	OH	NHCOCH <sub>3</sub>	H
FC <sub>3</sub>	TCA	TCA	OH	H	H	NH <sub>2</sub>	H
FC <sub>4</sub>	TCA	TCA	H	H	H	NH <sub>2</sub>	H
FP <sub>1</sub>	TCA	TCA	OH	OH	H	3HP	CH <sub>3</sub>
FP <sub>2</sub>	TCA	TCA	H	OH	H	3HP	CH <sub>3</sub>
FP <sub>3</sub>	TCA	TCA	OH	H	H	3HP	CH <sub>3</sub>

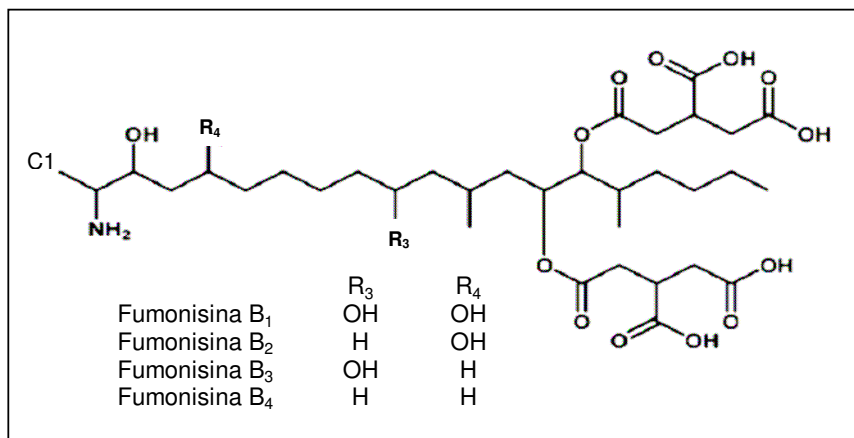
\* Estrutura química exata não elucidada até o momento.

Fonte: Rheeder, Marasas e Vismar (2002).

O análogo de fumonisina mais abundante encontrado em cereais é a fumonisina B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>), sendo um diéster de propano - 1, 2, 3 - tricarbálico de 2 - amino - 12, 16 - dimetil - 3, 5, 10, 14, 15 - pentahidróxicosano. A FB<sub>1</sub> normalmente constitui aproximadamente 70% do conteúdo de fumonisinas encontradas em cereais naturalmente contaminados, enquanto fumonisinas B<sub>2</sub> (FB<sub>2</sub>) e B<sub>3</sub> (FB<sub>3</sub>) constituem de 15 a 25% e 3 a 8% do total produzido, respectivamente. Outros análogos podem ocorrer naturalmente, porém em concentrações menores de 5% do total (DESJARDINS; PROCTOR, 2007; KRKA; WELZIG; BOUDRA, 2007; RHEEDER; MARASAS; VISMER, 2002).

Fumonisinas da série B apresentam 20 átomos de carbono, com um grupo amino unido ao carbono 2, dois ácidos tricarbálicos esterificados nos carbonos 14 e 15 e grupos OH em posição e número variável, de acordo com o análogo (SEO; LEE, 1998). A Figura 5 ilustra a estrutura química dos análogos da série B.

**Figura 5** – Estrutura química das fumonisinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub> e B<sub>4</sub>.



Fonte: Adaptado a partir de Proctor et al. (2006).

A toxicidade do milho contaminado por *F. verticillioides* tem sido documentada há mais de cem anos (DESJARDINS; HOHN, 1997). Fumonisinás são consideradas responsáveis por causar diversos surtos de doenças em animais como leucoencefalomalácia, uma lesão cerebral que pode ser fatal para equinos em poucos dias após consumo de ração contaminada, com surtos ocorridos no Brasil, e edema pulmonar em suínos. Experimentalmente, fumonisinás apresentaram efeito hepatocarcinogênico em roedores e cardiotoxíco em suínos (MARASAS et al., 1988; MALLMANN et al., 1999; HARRISON et al., 1990; GELDERBLOM et al., 2004; SMITH et al., 1996).

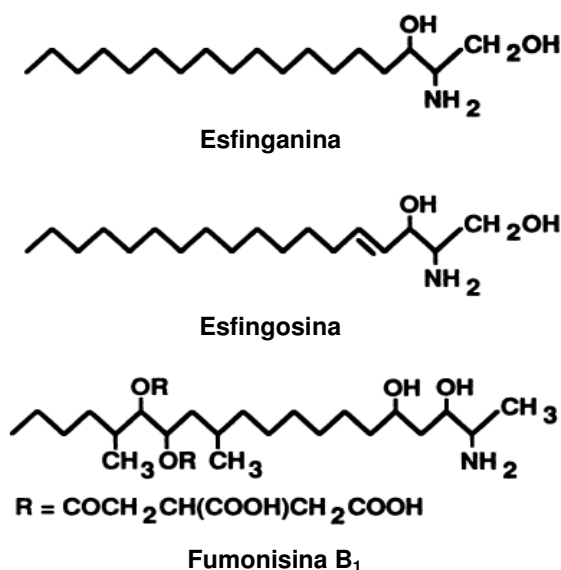
O interesse na toxicologia de micotoxinas de *Fusarium* para animais de produção contínua, não tanto para efeitos agudos, mas a associação de FB<sub>1</sub> com carcinogênese em seres humanos aumentou a preocupação sobre a possibilidade das micotoxinas produzidas por *Fusarium* possam ser transferidas para leite, ovos e carne (PLACINTA; D'MELLO; MACDONALD, 1999). Os efeitos das fumonisinás sobre a saúde humana ainda são incertos. Alto índice de contaminação por fumonisinás em alimentos, principalmente em milho, tem sido associado ao câncer esofágico em áreas de alto risco, como na Província de Linxian, na China e na região de Transkei, na África do Sul. Do mesmo modo, fumonisinás possivelmente atuam como promotora de câncer primário no fígado na região de Haimen, na China (VOSS; SMITH; HASCHEK, 2007; WANG et al., 2008; RHEEDER et al., 1992; UENO et al., 1997). Estudo realizado no México mostrou que a exposição de mulheres grávidas a fumonisinás aumenta o risco de defeito em tubo neural em fetos

(MISSMER et al., 2006). A Agência Internacional para Pesquisa sobre o Câncer (IARC) em Lyon, França, avaliou toxinas produzidas por *F. verticillioides* como cancerígenos do grupo 2B, isto é, possivelmente cancerígeno para seres humanos (IARC, 1993).

O mecanismo de ação pelo qual fumonisinas causam efeitos tóxicos ainda não foi totalmente esclarecido. Atualmente, o modelo mais aceito foi sugerido por Wang et al. (1991) e tem como base a semelhança estrutural entre fumonisinas e esfingolípídios precursores, esfingosina e esfinganina. A similaridade estrutural das fumonisinas com as bases esfinganina e esfingosina (Figura 6) é crítica para sua capacidade de interromper o metabolismo esfingolípídico (MERRILL JUNIOR et al., 2001; RILEY et al., 2001). Fumonisininas são inibidores específicos de esfinganina N-acetil transferase (ceramida sintetase), uma enzima chave na biossíntese de esfingolípídios. Por apresentar estrutura semelhante à esfinganina e esfingosina, fumonisinas competem pelo sítio da enzima ceramida sintetase, responsável por converter precursores esfingóides em *N*-acil derivados, posteriormente utilizados para biossíntese de esfingolípídios mais complexos. Como consequência, ocorre aumento na concentração desses precursores e diminuição da concentração de esfingolípídios mais complexos que seriam formados. Uma consequência imediata da inibição da ceramida sintetase é acumulação de bases esfingóides esfinganina (Sa) e, em menor grau, esfingosina (So) nos tecidos, soro e urina. (WANG et al., 2008; WANG et al., 1991; RILEY et al., 1993; WANG et al., 1992; VOSS; SMITH; HASCHEK, 2007).

Esfingolípídios são constituintes de membranas celulares e participam da regulação do ciclo e comunicação celular, além do controle de proteínas em membrana, dentre outras funções. São, deste modo, moléculas muito bioativas, e um bloqueio em sua via biossintética pode ocasionar disfunção de todo o metabolismo celular, o que explica a toxicidade observada nas células e tecidos contaminados com fumonisinas (MERRILL JUNIOR, 1991; WANG et al., 1991; RILEY et al., 1993). Acumulação de bases esfingóides e aumento da razão Sa:So nos tecidos, após exposição a fumonisinas, foram revelados com biomarcadores de exposição em situações experimentais. A utilização de Sa e razão Sa:So como biomarcadores de exposição em populações humanas ainda é limitada e sua utilidade para estudos epidemiológicos não foi estabelecida (RILEY et al., 1993; VAN DER WESTHUIZEN et al., 1999).

**Figura 6** – Semelhança estrutural entre fumonisina B<sub>1</sub>, esfingosina e esfinganina.



Fonte: Adaptado a partir de Wang et al. (1992).

Apesar das fumonisinas terem estrutura química relativamente simples, sua ação inibitória sobre metabolismo de esfingolipídios pode ter efeitos diversos e complexos em sistemas animais (MERRILL JUNIOR et al., 2001; RILEY et al., 2001). Tratamentos com fumonisinas induzem apoptose (morte programada da célula) em diversos tipos de culturas de células humanas e de animais de experimentação. A pesquisa com esfingolipídios e micotoxinas análogas de esfingolipídios é um campo em rápido desenvolvimento que devem descobrir novas percepções acerca das doenças causadas pelo consumo de fumonisinas (DESAI et al., 2002; DESJARDINS; HOHN, 1997).

A biossíntese de fumonisinas ocorre durante o metabolismo secundário de fungos produtores desta micotoxina, que se inicia no final da fase exponencial de crescimento. Fumonissinas são sintetizadas pela via das policetidas, que é iniciada com moléculas de acetil-CoA provenientes do catabolismo de macromoléculas essenciais. A rota metabólica da biossíntese das fumonisinas ainda não foi completamente elucidada. Sabe-se, todavia, que por apresentarem semelhança a esfinganina e esfingosina, fumonisinas são sintetizadas por uma rota metabólica semelhante a destes esfingolipídios (GRIFFIN, 1994; BRANHAM; PLATTNER, 1993).

A via biossintética das fumonisinas em espécies de *Fusarium* começa com a formação de uma policetida dimetilada linear e condensação da policetida com alanina por meio de redução carbonílica, oxigenação e esterificação com dois ácidos propano - 1, 2, 3 - tricarbálico (DESJARDINS; PROCTOR, 2007; D'MELLO; PLACINTA; MACDONALD, 1999).

A FB<sub>1</sub> é um contaminante de milho e de ração animal em muitos países tropicais, incluindo China, Tailândia e África do Sul, enquanto que num estudo realizado na Argentina, FB<sub>2</sub> foi a forma predominante das micotoxinas em milho. Muitos estudos para avaliar a ocorrência natural de *Fusarium* e fumonisinas em milho têm sido realizados em várias partes do mundo, principalmente na África do Sul, Estados Unidos, América do Sul e Europa (D'MELLO; PLACINTA; MACDONALD, 1999; FANDOHAN et al., 2005).

Levantamentos realizados no Brasil tem apontado uma frequência elevada de fumonisinas em milho. Ono et al. (2008) detectaram fumonisinas em 100% das amostras de milho recém-colhido (n = 870) na região norte do Estado do Paraná (safras de 2003 e 2004). Em estudo realizado em Santa Catarina, também foram encontrados fumonisinas em 100% das amostras analisadas (VAN DER WESTHUIZEN et al., 2003).

### 3.5 FATORES QUE INFLUENCIAM NA PRODUÇÃO DE FUMONISINAS

Fungos produzem grande variedade de metabólitos secundários, muitos dos quais são associados com ocorrência de efeitos adversos em animais e seres humanos (D'MELLO et al., 1997). A contaminação de grãos é inevitável, uma vez que muitas espécies toxigênicas de *Fusarium* são também fitopatógenos comuns, produzindo doenças em cereais que são difíceis de controlar (D'MELLO; PLACINTA; MACDONALD, 1999). Diversos fatores podem influenciar a produção de fumonisinas em milho na fase de pré-colheita, tais como: época de plantio e colheita; temperatura, umidade, híbridos resistentes, danos causados por insetos, manejo de culturas, etc.

A época de plantio influencia na contaminação posterior com fumonisinas. Por exemplo, em milho semeado com atraso na Europa foram encontrados níveis de fumonisinas quatro vezes maior do que em milho plantado na época recomendada. A época da colheita também é um fator importante na

produção de micotoxinas. Em híbridos de milho colhido com maturação atrasada, ocorreu um aumento na produção de fumonisinas e zearalenona, por diferentes espécies de *Fusarium* (BLANDINO et al., 2004; REYNERI, 2006).

Fatores climáticos durante o período de maturação do milho determina a presença de espécies de fungos nas espigas e, conseqüentemente, presença de micotoxinas nos grãos. A influência da temperatura na produção de fumonisinas é importante, pois fungos do gênero *Fusarium* necessitam de temperaturas em torno de 25 °C para crescer, mas para biossíntese de toxinas é necessário que temperaturas sejam amenas ou frias, geralmente entre 16 e 18 °C e teor de umidade mais elevado para se desenvolver (BLANDINO et al., 2008; PINTO, 2005).

As principais fontes de inóculo de *Fusarium* no campo são restos de cultura de milho, como colmos, espigas e sementes de milho contaminadas, restos de gramíneas de inverno (trigo, aveia e cevada) e também o solo. A realização do plantio do milho sobre a palhada, sem a devida rotação de culturas, permite a sobrevivência de agentes causais de doenças e, em função do tempo, acúmulo de seu inóculo, que pode contribuir para incidência de doenças em alta gravidade. A rotação de culturas é uma técnica essencial para o controle de doenças em milho que são causadas por agentes que sobrevivem em restos de cultura ou no solo (PINTO, 2005; PINTO; DE OLIVEIRA; FERNANDES, 2007; REIS et al., 2004).

A umidade de grãos de milho também é apontado como fator importante para controle da contaminação por fumonisinas. Milho úmido (25%) retido por sete dias após a colheita e antes da secagem resultou em aumento de 77% nos níveis de fumonisinas e grande acumulação de zearalenona. A colheita de milho é frequentemente realizada quando os grãos apresentam em torno de 20% de umidade e exige secagem para reduzir os recursos disponíveis de água para menos de 14%, índice seguro para armazenamento. Como se tem encontrado alta contaminação por fumonisinas em milho recém-colhido, a secagem adequada antes e durante a armazenagem é uma importante medida recomendada aos produtores para reduzir a contaminação com *Fusarium* spp. e conseqüente produção de fumonisinas (BLANDINO et al., 2004; MAGAN; ALDRED, 2007; FANDOHAN et al., 2005).

A seleção de genótipos de cereais resistentes a doenças causadas por *Fusarium* é uma opção que merece atenção com relação ao futuro do controle da

contaminação de grãos e rações por micotoxinas (PLACINTA; D'MELLO; MACDONALD, 1999).

Existe uma forte relação entre danos causados por insetos e contaminação da espiga por *F. verticillioides* com conseqüente produção de micotoxinas. Infecção do tecido lesado acontece frequentemente devido à disseminação do inóculo pela chuva e/ou vento, que chega subsequentemente para o local danificado pelo inseto, porém alguns insetos podem atuar como vetores. Um estudo de campo realizado na Áustria demonstrou que a incidência da broca de milho européia (*Ostrinia nubilalis*) aumentou a infecção por *F. verticillioides* e concentração de fumonisinas nos grãos (MUNKVOLD; DESJARDINS, 1997; LEW; ADLER; EDINGER, 1991).

Poucos trabalhos apresentaram correlação entre fertilização orgânica e níveis de contaminação de milho por micotoxinas. Em estudo realizado na Espanha, foi demonstrado que pequenas diferenças nas concentrações de fumonisinas em amostras de milho convencional e orgânico não foram estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ), indicando que sistemas agrícolas provavelmente não são de importância decisiva para contaminação final de produtos agrícolas com fumonisinas (ARIÑO et al., 2007). No entanto, Cirillo et al. (2003) analisaram produtos à base de milho no mercado italiano e relataram que a média mais elevada na concentração de FB<sub>1</sub> (345 ng g<sup>-1</sup>) ocorreu em alimentos à base de milho convencional, enquanto que em alimentos à base de milho orgânico, encontrou-se média mais elevada de FB<sub>2</sub> (210 ng g<sup>-1</sup>). O melhor entendimento das modificações nos atributos químicos do solo, decorrentes da reciclagem de resíduos orgânicos e uso de resíduos na fertilização, pode fornecer subsídios para produção em bases sustentáveis, sem comprometer o ambiente (SCHERER; BALDISSERA; NESI, 2007).

### 3.6 LEGISLAÇÃO SOBRE NÍVEIS DE FUMONISINAS EM ALIMENTOS

Nos Estados Unidos, a *United States Food and Drugs Administration* (USFDA, 2001) divulgou orientações para indústrias de alimentos recomendando níveis máximos de fumonisinas (FB<sub>1</sub> + FB<sub>2</sub> + FB<sub>3</sub>) em produtos à base de milho destinados à alimentação humana e produção de ração, dependendo da espécie animal. Os níveis máximos de fumonisinas totais em milho e produtos à base de milho, recomendados pela USFDA, estão resumidos na Tabela 3.

A União Européia também estabeleceu níveis máximos de fumonisinas em milho destinados à alimentação humana e animal. O nível recomendado para milho em grão, a ser utilizado como matéria-prima para alimentação animal é de  $60 \mu\text{g g}^{-1}$ . Para produção de alimentos complementares e alimentos completos para animais, os níveis recomendados mudam de acordo com a espécie, variando de  $5,0 \mu\text{g g}^{-1}$  para equinos, suínos, coelhos e animais de estimação, até  $50 \mu\text{g g}^{-1}$  para ruminantes adultos (COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS, 2006a). Os teores máximos de fumonisinas presentes em gêneros alimentícios à base de milho, destinados à alimentação humana, variam de  $2,0 \mu\text{g g}^{-1}$  para milho não transformado até  $0,20 \mu\text{g g}^{-1}$  para alimentos transformados e alimentos para bebês destinados a lactentes e crianças jovens (COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS, 2006b).

**Tabela 3** - Níveis de fumonisinas totais em milho recomendados pela USFDA para alimentação humana e ração animal.

Alimentos	Fumonisinas totais ( $\text{FB}_1 + \text{FB}_2 + \text{FB}_3$ )
Milho para consumo humano	
Farelo de milho	$2,0 \mu\text{g g}^{-1}$
Milho de pipoca	$3,0 \mu\text{g g}^{-1}$
Milho para produção de massas	$4,0 \mu\text{g g}^{-1}$
Milho e subprodutos para animais	
Equinos e coelhos	$5 \mu\text{g g}^{-1} < 20\%$ da dieta
Suínos e peixes	$20 \mu\text{g g}^{-1} < 50\%$ da dieta
Ruminantes, aves, gado leiteiro e galinha poedeira	$30 \mu\text{g g}^{-1} < 50\%$ da dieta
Ruminantes > 3 meses antes do abate	$60 \mu\text{g g}^{-1} < 50\%$ da dieta
Frango para abate	$100 \mu\text{g g}^{-1} < 50\%$ da dieta
Outras espécies de ruminantes e animais de estimação.	$10 \mu\text{g g}^{-1} < 50\%$ da dieta

Fonte: USFDA (2001).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, por meio da Resolução - RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011 (BRASIL, 2011), que dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos, determinou que a partir de janeiro de 2014, LMT para fumonisinas totais ( $\text{FB}_1 + \text{FB}_2$ ) em milho em grão para posterior processamento, será de  $5,0 \mu\text{g g}^{-1}$ . Para outros produtos à base de milho destinados à alimentação humana, os LMT para fumonisinas totais

foram estabelecidos e concedidos prazos para aplicação, tendo em vista a necessidade de adequação do setor produtivo (Tabela 4).

**Tabela 4** – Limites máximos tolerados de fumonisinas totais (FB<sub>1</sub> + FB<sub>2</sub>) em milho e alimentos a base de milho estabelecido pela ANVISA para alimentação humana.

Prazo para aplicação	Alimentos	LMT ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )
2011	Milho de pipoca	2,0
	Alimentos à base de milho para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância)	0,20
2012	Farinha de milho, creme de milho, fubá, flocos, canjica e canjiquinha	2,5
	Amido de milho e outros produtos à base de milho	2,0
2014	Milho em grão para posterior processamento	5,0
	Farinha de milho, creme de milho, fubá, flocos, canjica e canjiquinha	1,5
2016	Amido de milho e outros produtos à base de milho	1,0

Fonte: BRASIL (2011).

### 3.7 PRÁTICAS CULTURAIS: INFLUÊNCIA NA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E NA OCORRÊNCIA DE *FUSARIUM* SPP. E FUMONISINAS EM MILHO

#### 3.7.1 Fertilização com Lixiviado de Aterro Sanitário

O desenvolvimento humano causa sério impacto no ambiente, no qual o principal deles é a geração de grande quantidade de resíduos, sejam sólidos ou líquidos, que provocam poluição do solo, do ar e da água. Com intensificação do processo industrial, aliada ao crescimento populacional e conseqüente demanda por bens de consumo, têm-se produzido quantidades significativas de resíduos sólidos, que acabam sendo constituídos de uma mistura muito complexa e de natureza diversa, cujos principais constituintes são: material orgânico, papel, vidro, plástico e metais.

A Política Nacional de Resíduos Sólidos (BRASIL, 2010) proíbe a disposição de resíduos sólidos urbanos em lixões ou aterros controlados, os quais devem ser substituídos por aterros sanitários ou industriais, onde só poderão ser depositados resíduos sem qualquer possibilidade de reciclagem ou reaproveitamento, obrigando também a compostagem dos resíduos orgânicos. Entretanto, existe o problema da produção de lixiviado (chorume), que é gerado pelo

excesso de água pluvial que percola através das camadas de resíduos aterrados, que estão em decomposição, carreando material orgânico e íons para a solução.

O lixiviado de aterro sanitário é uma mistura com alta concentração de contaminantes orgânicos e inorgânicos, incluindo ácidos húmicos, nitrogênio amoniacal, metais pesados, sais inorgânicos e compostos xenobióticos que precisam ser removidos devido à sua toxicidade e efeito deletério sobre o meio ambiente (HAMADA, 1999; WISZNIOWSKI et al., 2006). Emissões de lixiviado de aterro sanitário é motivo de preocupação, principalmente devido ao seu impacto tóxico quando liberado sem controle no meio ambiente e do potencial dos aterros em gerar lixiviado por muitos anos, mesmo após seu encerramento (JONES; WILLIAMSON; OWEN, 2005).

Os aterros sanitários recebem lixo de origem doméstica, comercial, industrial e, em alguns casos, hospitalar. Portanto, sua composição é complexa e pode ser caracterizada como uma solução aquosa contendo quatro frações principais: matéria orgânica dissolvida (formada principalmente por metano, ácidos graxos voláteis, compostos húmicos e fúlvicos), macrocomponentes inorgânicos ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{HCO}_3^-$ ), metais pesados ( $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  e  $\text{Ni}^{2+}$ ) em concentrações variáveis, dependendo da origem dos resíduos e idade do aterro, além de compostos orgânicos xenobióticos (representados por hidrocarbonetos aromáticos, compostos fenólicos e organoclorados alifáticos), presentes em concentrações relativamente baixas (CHRISTENSEN et al., 1994).

A quantidade e qualidade do lixiviado produzido em aterro sanitário dependem de fatores como: condições meteorológicas locais, modos operacionais do aterro, idade e natureza dos resíduos sólidos, topografia, qualidade e quantidade de recicláveis e hábitos populacionais. A idade do aterro e sua fase de fermentação correspondente, são os principais determinantes da composição do lixiviado (OLIVEIRA; PASQUAL, 2004; EL-FADEL et al., 2002). Segundo Jucá et al. (1999) o lixiviado de aterro sanitário produzido por resíduos sólidos mais novos apresenta maior potencial de poluição que lixiviado produzido por resíduos mais antigos, principalmente, devido ao elevado teor de material orgânico, embora a concentração de N-amoniacal seja, em geral, mais elevada em aterros mais velhos.

A decomposição da fração orgânica dos resíduos sólidos em aterro ocorre em quatro fases: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese.

Durante essas fases, a suscetibilidade ao carreamento ou arraste de substâncias químicas pelo líquido que escoar se modifica drasticamente, ou seja, a composição do lixiviado se altera, dependendo da fase em que se encontra o processo (D'ALMEIDA; VILHENA, 2000).

Em aterros novos, o material orgânico é hidrolisado e convertido em compostos dissolvidos mais simples pela ação de enzimas extracelulares, esta fase do aterro é chamada de hidrólise. Em seguida, ocorre uma rápida fermentação anaeróbica, na qual são liberados ácidos graxos voláteis, álcoois, gás carbônico e hidrogênio no interior das células. Esta fase é chamada acidogênica e leva à liberação de grandes quantidades de ácidos graxos voláteis, até 95% do conteúdo orgânico (WELANDER; HENRYSSON; WELANDER, 1997). Quando o aterro amadurece, a fase metanogênica tem início e os ácidos graxos voláteis são convertidos em biogás, por micro-organismos estritamente anaeróbios, constituídos por arqueias metanogênicas. A fração orgânica do lixiviado torna-se recalcitrante, formada principalmente por substâncias húmicas (CHIANG; DEWALLE, 1976).

Em aterros mais velhos (com predomínio da fase metanogênica), em torno de 32% do carbono orgânico dissolvido consistem de compostos de elevado peso molecular e mais de 60% são compostos húmicos. Além disso, lixiviado de aterros na fase metanogênica pode conter altas concentrações de amônia que constitui sério problema ambiental devido seu potencial de eutrofização de corpos aquáticos e efeitos tóxicos (KLIMIUK; KULIKOWSKA, 2006; CASTILHOS JÚNIOR et al., 2003; WELANDER; HENRYSSON; WELANDER, 1997).

Apesar dos benefícios potenciais do uso de lixiviado de aterro sanitário como fonte alternativa de água e de nutrientes para produção agrícola, sua aplicação no solo também pode causar riscos ambientais. As mesmas características que tornam o lixiviado potencialmente poluidor são também aquelas que o tornam atrativo para utilização agrícola, como teores de N-amoniaco e material orgânico estabilizado. Aplicação de lixiviado de aterro sanitário em solo fornece uma opção para completar o ciclo do nitrogênio pelo retorno e biodisponibilidade de  $\text{NH}_x\text{-N}$  para o ecossistema, aliviando simultaneamente a carga das estações de tratamento pelo potencial de fitorremediação do sistema solo-planta (CHENG; CHU, 2011).

Embora o nitrogênio seja um nutriente vital para crescimento das plantas, quando sua aplicação excede a demanda do vegetal e a capacidade de

desnitrificação do solo, ele pode lixiviar na forma de nitrato e contaminar lençóis freáticos. Em alguns casos, o índice de salinidade do lixiviado de aterro sanitário pode ser elevado e isso pode conduzir mudanças nas propriedades químicas e físicas do solo, quando aplicado sucessivas vezes. O excesso de sódio pode causar limitações no desenvolvimento de plantas, dispersão de argilas e até da matéria orgânica (ALMASRI; KALUARACHCHI, 2004; LEAL et al., 2009).

Outra preocupação quanto à aplicação de lixiviado ao solo advém da possível contaminação por metais pesados. A presença de metais em lixiviados de indústrias e aterros sanitários é uma das principais causas da poluição do solo e da água (WANG et al., 2005). Sua acumulação ao longo do perfil vertical do solo pode propiciar fitotoxicidade às plantas, além de constituir risco à saúde humana, na medida em que esses metais podem ser introduzidos na cadeia alimentar. Lemos (2000), considera os elementos que apresentam maior risco à saúde pública, assim como os mais comumente encontrados em casos de contaminação de solos: alumínio, ferro, cromo, antimônio, arsênio, bário, cádmio, chumbo, cobalto, cobre, manganês, mercúrio, molibdênio, níquel, prata, selênio, vanádio e zinco.

A solubilidade dos metais em lixiviado de aterro sanitário depende do pH, do potencial redox e solubilidade das espécies de metais depositados, concentração de agentes complexantes (ácidos húmicos) e íons. O lixiviado produzido por resíduos acondicionados em aterros mais antigos, já na fase metanogênica, apresenta elevada alcalinidade, resultando em baixa concentração de metais no líquido efluente, pela sua precipitação em condições de pH elevado (KJELDSSEN et al., 2002; JUCÁ et al., 1999). Segundo Erses e Onay (2003), a solubilidade de metais em lixiviados tende a aumentar com decréscimo do pH. Dessa forma, a contaminação do lixiviado de aterro sanitário por metais pesados pode ser maior quando este é proveniente de aterros novos que ainda se encontram nas fases acidogênica, devido aos ácidos produzidos nessas fases que resultam em baixos valores de pH.

O uso de resíduos de aterro sanitário, sobretudo aqueles com altos teores de nitrogênio, como fonte alternativa de nutrientes para agricultura, vêm sendo estudado por diversos autores (MADRID et al., 2007; CHENG; CHU, 2007). Porém, essa prática só será viável se os riscos ambientais forem evitados ou minimizados e se os alimentos produzidos tiverem níveis toleráveis de contaminação

por poluentes, assim como eventuais efeitos negativos na produtividade e qualidade das culturas agrícolas.

### 3.7.2 Adubação Nitrogenada

Em relação à fertilização do solo, uma das variáveis determinantes da produção de milho é o fornecimento de nutrientes para cultura, dentre os quais se destaca o nitrogênio (N). O suprimento inadequado de N é fator de redução no rendimento de grãos de milho, pois o mesmo exerce importantes funções nos processos bioquímicos da planta. O milho é uma cultura que remove grandes quantidades de N e usualmente requer uso de fertilização nitrogenada em cobertura para complementar a quantidade suprida pelo solo, quando se deseja produtividades elevadas (COELHO, 2006). O N é um macronutriente que participa da composição de moléculas de proteínas, enzimas, coenzimas, ácidos nucléicos e citocromos. A exigência de N pelas plantas é consequência da sua função estrutural, pois faz parte da molécula de compostos orgânicos, como aminoácidos e proteínas, sendo ainda ativador de muitas enzimas. Por estes motivos, este é o nutriente absorvido em maior quantidade pela cultura do milho e também o mais limitante para seu desenvolvimento, sendo ainda responsável pelo aumento da produtividade e do teor de proteínas em grãos (BÜLL, 1993; RAIJ, 1991; YAMADA; ABDALLA, 2000; FERREIRA et al., 2001).

Segundo Raij (1991), o principal nutriente que pode causar problemas ambientais é o N, principalmente pelo risco de lixiviação de nitrato para lençóis freáticos. Embora em geral haja déficit de N para a maioria das culturas agrícolas no Brasil, existem culturas que recebem doses elevadas de fertilizantes nitrogenados, podendo resultar em perdas de N para águas superficiais por lixiviação ou para atmosfera por desnitrificação ou volatilização de amônia, resultando em graves danos ambientais (CANTARELLA et al., 2003; MARTINES et al., 2010).

O fornecimento de doses adequadas de nutrientes para cultura do milho é fundamental para o desenvolvimento da planta, uma vez que a deficiência ou excesso de nutrientes essenciais pode provocar a contaminação por fungos toxigênicos e, conseqüentemente, desencadear produção de micotoxinas. Quantidades insuficientes de N, não só prejudicam a produção de grãos, mas

também aumentam a susceptibilidade da planta à infecção por fungos toxigênicos (HASSEGAWA et al., 2008; BRUNS; ABBAS, 2005).

Blandino et al. (2008) relataram que milho sem fertilização nitrogenada apresentou valores significativamente mais elevados de infecção fúngica do que parcelas adubadas. Não obstante, o excesso de N também pode ser prejudicial, pois causa um aumento na massa foliar que influencia as condições microclimáticas no interior da cultura conduzindo a um menor fluxo de ar e maior umidade relativa, favorecendo a contaminação e sobrevivência de fungos. Hassegawa et al. (2008) relataram que o aumento de doses de fertilização nitrogenada, apesar de promover maiores produtividades, favoreceu condições para infestação fúngica em decorrência de um crescimento vegetativo mais prolongado, que aumenta a exposição das folhas a patógenos e maior expansão foliar, que torna as paredes celulares mais delgadas e, deste modo, mais vulnerável à penetração fúngica.

Além da dose, a fonte de nitrogênio também pode influenciar na produção de micotoxinas em milho. Em estudo realizado por Blandino; Reyneri e Vanara (2008), a utilização de uréia (200 kg ha<sup>-1</sup>) esteve relacionada a menor ocorrência de fumonisinas, enquanto que a utilização, na mesma concentração, de fertilizante de liberação lenta (ENTEC 26<sup>®</sup> com 26% de N amoniacal) e inibidor de nitrificação (3,4-dimetil fosfato pirazole), favoreceram a ocorrência de micotoxinas em todos os anos avaliados. Segundo os autores, esse fenômeno ocorreu porque o fertilizante de liberação lenta pode promover crescimento vegetativo prolongado nas plantas de milho, fornecendo melhores condições para desenvolvimento fúngico. Contudo, em trabalho conduzido na Argentina, Ramirez et al. (1997), avaliaram os efeitos da fertilização com duas fontes diferentes de N (ureia e fosfato dibásico de amonio) sobre diferentes áreas cultivadas e não encontraram nenhum efeito significativo sobre a contaminação dos grãos de milho por fumonisinas, quando cada área foi considerada separadamente.

Fertilização nitrogenada, em geral, mostra-se como fator de importância para contaminação por fumonisinas em grãos de milho, podendo ser utilizada para diminuir os riscos de contaminação. No entanto, não é apenas a fertilização nitrogenada que influencia na qualidade sanitária de grãos de milho, outros nutrientes também são fundamentais. Rheeder et al. (1994), analisaram fatores de fertilidade do solo em uma área com alta e outra com baixa incidência de câncer esofágico em seres humanos, na região de Transkei, África do Sul e relataram que

amostras de solo cultivado na região de baixa incidência apresentavam níveis de Ca, Mg, K, Zn e matéria orgânica significativamente baixos e níveis elevados de Fe, quando comparados com as amostras de solo da região de alta incidência de câncer esofágico.

### 3.7.3 Densidade de Plantas e Espaçamento entre Linhas

Em se tratando de práticas culturais, diversos fatores de manejo influenciam no rendimento de grãos de milho. A escolha adequada do arranjo de plantas na cultura é um dos principais fatores de definição deste rendimento, devido a sua importância na eficiência da interceptação da radiação solar e distribuição do sistema radicular no solo. O arranjo espacial das plantas de milho varia em função da fertilidade e tipo de solo, disponibilidade hídrica, luminosidade, genótipos, níveis de adubação adotados, espaçamento entre linhas e número de plantas na linha de semeadura (SANGOI, 2001; PEREIRA FILHO; OLIVEIRA; CRUZ, 1998).

Alta população de plantas e espaçamento reduzido entre linhas fazem parte do novo enfoque do arranjo de plantas na cultura do milho. A densidade de plantio, definida como número de plantas por unidade de área, tem papel importante no rendimento de uma lavoura de milho, pois pequenas variações na densidade têm grande influência no rendimento final da cultura (CRUZ et al., 2006). A combinação do espaçamento entre linhas de semeadura e o número de plantas por m<sup>2</sup>, com utilização adequada de água, luz e nutrientes, é uma forma de maximizar a produção de grãos.

As alterações no arranjo de plantas de milho na área devem-se às modificações de ordem genética, fisiológica, bioquímica e anatômica das plantas, por meio do melhoramento genético e novos híbridos de milho com arquitetura modificada, folhas menores e mais eretas, permitindo o aumento na densidade, resultando em maiores produtividades (SHIOGA; OLIVEIRA; GERAGE, 2004). Híbridos modernos têm mais tolerância a maior densidade de plantas do que híbridos convencionais. Com o ingresso destes novos híbridos no mercado agrícola, torna-se necessário o estudo da densidade ideal para explorar o máximo de rendimento, sem que haja problemas com a sanidade da planta e estresses por competição intraespecífica (TOLLENAAR; AGUILERA, 1992).

Alta densidade de plantas pode ser relevante para ocorrência de doenças em milho como podridão do colmo e da espiga, produzindo grãos ardidos e consequente produção de micotoxinas. O número de plantas por unidade de área pode afetar a percentagem de grãos infectados por *Fusarium* spp. e a gravidade do apodrecimento causado pelo fungo, aumentando o risco de contaminação por micotoxinas (DENTI; REIS, 2001; TRENTO; IRGANG; REIS, 2002; BLANDINO et al., 2007). Aumento na quantidade de plantas por m<sup>2</sup> pode levar à diminuição do fluxo de ar nos espaços entre as fileiras, aumentando a umidade relativa e promovendo a infecção fúngica e colonização das espigas. Além disso, impõem restrições à atividade fotossintética das folhas, sendo que esta limitação induz o colmo a redirecionar fotoassimilados em maior quantidade ao enchimento de grãos, fragilizando-o e facilitando a ocorrência de podridões (SANGOI et al., 2000).

Poucos estudos têm sido realizados sobre a influência da densidade de plantas em relação aos aspectos sanitários, como contaminação por micotoxinas e dados encontrados na literatura são controversos. Blandino et al. (2007) avaliaram o efeito da densidade de plantas sobre contaminação por micotoxinas em milho no norte da Itália de 2001 a 2007 e relataram que a ocorrência natural das micotoxinas encontradas em cada ano foi significativamente maior em cultivos com maior densidade de plantas. Rodriguez-del-Bosque (1996), em trabalho realizado no nordeste do México, relatou incremento na contaminação por aflatoxinas em grãos de milho com aumento na densidade de plantas de 55 mil para 75 mil plantas ha<sup>-1</sup>. Bilgrami e Choudhary (1998) relataram que a ocorrência natural de aflatoxina foi menor em áreas densamente cultivadas.

O aumento da população de plantas, apesar de produzir ganhos de produtividade, pode ocasionar também mudanças nas características químicas dos grãos de milho, podendo afetar sua qualidade nutricional. Um número maior de plantas ha<sup>-1</sup> afeta o balanço nutricional nos diferentes órgãos da planta devido a maior competição entre indivíduos por água, luz e nutrientes, reduzindo a disponibilidade de fotoassimilados para atender a demanda para enchimento do grão e manutenção das demais estruturas da planta, consequentemente, diminui a síntese e acúmulo de proteínas e absorção de minerais, podendo levar a aumento nos teores de amido nos grãos de milho. Este acúmulo de amido é uma resposta passiva à diminuição das taxas de crescimento e o resultante acúmulo de açúcares em plantas com falta de nutrientes (SANGOI; SALVADOR, 1997; STITT; KRAPP,

1999). A escolha correta da densidade de plantas, aliada à adubação nitrogenada em quantidades adequadas a cultura do milho, pode ser considerada uma opção econômica eficiente para minimizar os danos causados por fungos sem reduzir a produtividade, além da qualidade sanitária e nutricional de grãos de milho.

#### 3.7.4 Sistemas de Plantio

O manejo de cultura tem efeitos complexos sobre o ambiente físico, químico e biológico do solo. O impacto do sistema de manejo sobre o solo e a localização dos resíduos da colheita afeta a quantidade de água, aeração e temperatura do solo, assim como o grau de contato entre matéria orgânica e partículas minerais do solo (KLADIVKO, 2001).

O manejo de cultura afeta o equilíbrio existente entre solo e organismos que nele habitam. Populações, diversidade e atividade microbiana podem ser afetadas pelas mudanças no sistema de plantio. Uma compreensão da dinâmica populacional de fungos no agroecossistema de milho é fundamental para o desenvolvimento de práticas de manejo em favor da redução na contaminação por micotoxinas (PEREIRA et al., 2007; KLADIVKO, 2001; NESCI et al., 2006).

O sistema de plantio é caracterizado por dois tipos de manejo, plantio direto (SPD) e o plantio convencional (SPC). O SPD, definido como processo de semeadura em solo não revolvido, no qual a semente é depositada em sulcos ou covas, com largura e profundidade suficientes para adequada cobertura e contato das sementes com o solo. O SPC preconiza o intenso revolvimento do solo, tendo como objetivos principais controlar as plantas invasoras, incorporar restos culturais e obter um leito de semeadura “ideal” para germinação das sementes e desenvolvimento inicial da plantas (CRUZ et al., 2002; PACHECO, 2004).

O plantio direto é uma técnica de cultivo conservacionista no qual procura-se manter o solo sempre coberto por plantas em desenvolvimento e resíduos vegetais. Essa cobertura tem por finalidade protegê-lo do impacto das gotas de chuva, do escoamento superficial e das erosões hídrica e eólica. Em comparação ao plantio convencional (SPC), SPD aumenta a retenção de umidade no solo, reduz oscilação de temperatura e erosão do solo, melhora a estrutura do solo e, com o tempo, aumenta a matéria orgânica, muitas vezes resultando em maior rendimento (CRUZ et al., 2002; FRANCHINI et al., 2007).

A maior biomassa microbiana encontrada em solos cultivados em SPD, em comparação ao SPC, é devido, em parte, às condições úmidas, resfriamento do solo e menor flutuação de temperatura e umidade no SPD. Este sistema conservacionista tende a concentrar detritos vegetais e, conseqüentemente, a biomassa microbiana na superfície do solo (5 a 15 cm) promovendo a sobrevivência de agentes patogênicos (KLADIVKO, 2001; STURZ; CARTER; JOHNSTON, 1997).

Em estudo realizado por Rheeder e Marasas (1998), foram isolados 15 diferentes espécies de *Fusarium* em restos de plantas retirados de amostras de solos da região de Transkei, África do Sul. Este mesmo estudo apresentou que duas espécies de fungos micotoxigênicos, *F. verticillioides* e *F. subglutinans*, foram encontrados em quantidades significativamente maiores em solos cultivados do que em solos não perturbados. Em SPD o solo tende a ser dominado por fungos e, em SPC, o solo tende a ser dominado por bactérias, dependendo de como as medições forem feitas, se na superfície ou na parte mais profunda do perfil do solo (KLADIVKO, 2001).

Tecnologias de conservação do solo, como SPD, oferece novas possibilidades de reduzir custos de produção e problemas causados pela erosão. No entanto, este sistema causa considerável impacto sobre os parâmetros físicos, químicos e biológicos do solo, influenciando as populações de micro-organismos (NESCI et al., 2006).

### 3.7.5 Utilização de Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas

A cultura do milho é das mais exigentes em fertilizantes, principalmente os nitrogenados, pois o N é um dos nutrientes que apresenta efeitos mais relevantes no aumento da produção de grãos. No entanto, fertilizantes nitrogenados estão entre os insumos mais caros no custo de produção. Com a crescente busca por maior produtividade e qualidade do produto, sem deixar de lado a sustentabilidade nos sistemas agrícolas de produção, diversos autores têm apresentado a fixação biológica de nitrogênio, a qual pode suplementar ou, até mesmo, substituir a utilização de fertilizantes nitrogenados (CANTARELLA, 2007; CAVALLET et al., 2000; DOBBELAERE et al., 2001; NAIMAN; LATRÓNICO; DE SALAMONE, 2009).

A fixação biológica do N pelas plantas é um processo de transformação do N<sub>2</sub> na forma inorgânica combinada NH<sub>3</sub> e, a partir daí, em formas reativas

orgânicas e inorgânicas. A reação de redução do  $N_2$  a  $NH_3$  é realizada por bactérias que contêm a enzima dinitrogenase que é capaz de romper a tripla ligação do  $N_2$  e reduzi-lo a amônia. Essas bactérias, também denominadas como diazotróficas ou fixadoras de  $N_2$ , se associam a diversas espécies de plantas em diferentes graus de especificidade, levando à classificação como bactérias associativas, endofíticas ou simbióticas (HUNGRIA et al., 2011).

As bactérias fixadoras de  $N_2$  não só se beneficiam dos nutrientes secretados pelas raízes das plantas, como também favorecem a planta de forma direta ou indireta. Os efeitos diretos são dependentes da produção de reguladores de crescimento de plantas, tais como auxinas, giberelinas, citocininas e etileno, ou na melhoria da absorção de nutrientes pela planta (BLOEMBERG; LUGTENBERG, 2001; CASSÁN et al. 2001; TIEN; GASKINS; HUBBELL, 1979; THULER et al., 2003; CREUS; SUELDO; BARASSI, 2004). Os efeitos indiretos estão relacionados com a produção de metabólitos como antibióticos, sideróforos e ácido hidrocianico que diminuem o crescimento de fitopatógenos e outros micro-organismos nocivos à planta. Também há relatos de maior tolerância a agentes patogênicos de plantas devido ao maior crescimento radicular e melhor nutrição das plantas (MYOUNGSU et al., 2005; CORREA et al., 2008).

Atualmente, os meios de prevenção e controle da contaminação fúngica e produção de micotoxinas são, em muitos casos, realizada pela utilização intensiva de substâncias químicas que causam poluição ambiental, resistência do patógeno, aumento nos custos de produção e sérios riscos para o meio ambiente e a saúde humana. O uso massivo destes produtos promove a poluição da água, degradação do solo e aumento da resistência de insetos (TORTORA; DÍAZ-RICCI; PEDRAZA, 2011; PEREIRA et al., 2010). Uma possível alternativa de proteção das culturas contra patógenos é o controle biológico exercido por bactérias diazotróficas, como *Azospirillum brasilense*, por exemplo.

Embora *Azospirillum* não seja conhecido como um típico agente de controle biológico, tem sido relatado que algumas cepas são capazes de estimular o crescimento de plantas suprimindo indiretamente patógenos do solo e outros micro-organismos nocivos em vários sistemas. O mecanismo de redução de doenças pode envolver a atividade antagonista, ou seja, por competição mediada por meio de sideróforos, que reduz a disponibilidade de ferro para a sobrevivência de agentes patogênicos, que resulta na eliminação de fungos na rizosfera (MIETHKE;

MARAHIEL, 2007; CHAIHARN; CHUNHALEUCHANON; LUMYONG, 2009). Estudo realizado por Shah et al. (1992) mostraram que *Azospirillum lipoferum* M produziu sideróforos do tipo catecol em condições de estresse por falta de ferro e apresentaram atividade antimicrobiana *in vitro* contra vários isolados de bactérias e fungos, como *Aspergillus niger* e *Fusarium oxysporium*, por exemplo. Tortora; Díaz-Ricci e Pedraza (2011) relataram que *Azospirillum brasilense* exibiram atividade antifúngica *in vitro* contra *Colletotrichum acutatum*, fungo causador de antracnose em morangos, reduzindo também os sintomas da doença em testes com a planta.

Outros autores relataram que o uso de *Azospirillum* spp. induziu incrementos na absorção da água e minerais, maior tolerância a estresses como salinidade e seca, resultando em uma planta mais vigorosa e produtiva. O crescimento de plantas também pode ser influenciado pela ação de bactérias diazotróficas com aumento na disponibilidade de nutrientes, decorrente da solubilização de fosfato inorgânico e da mineralização de fosfato orgânico. Estudos realizados com *Bacillus megaterium* e *Pseudomonas fluorescens* mostraram que estas bactérias podem incrementar a disponibilidade de fósforo (BASHAN; HOLGUIN, 1997; DOBBELAERE et al., 2001; BASHAN; HOLGUIN; DE-BASHAN, 2004; KLOPPER; LIFSHITZ; SCHROTH, 1988).

A maior parte das pesquisas que avaliaram bactérias diazotróficas como agente de biocontrole contra fungos foram realizados *in vitro* ou em casas de vegetação, no qual, muitas variáveis como fertilidade natural do solo, presença de outras bactérias, doses de fertilizantes e condições climáticas foram controladas. Os resultados da interação bactérias diazotróficas e milho em termos de potencial agrônômico, fixação de nitrogênio ou promoção do crescimento, depende de muitos fatores bióticos e ambientais, tais como genótipo da planta, comunidade microbiológica do solo e disponibilidade de nitrogênio (ROESCH et al., 2006). Portanto, estudos em condições de campo, no qual muitas variáveis são difíceis de controlar, são requeridos para melhor avaliar as relações entre plantas, patógenos e bactérias promotoras de crescimento, a fim de avaliar a segurança e a eficácia da introdução de agentes de controle biológico.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL

#### 4.1.1 Infra-Estrutura

Análises micológicas, físico-químicas e quantificação de fumonisinas, foram realizadas nos laboratórios do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos (Centro de Ciências Agrárias) e do Departamento de Bioquímica (Centro de Ciências Exatas) da Universidade Estadual de Londrina (UEL). Análises de metais foram realizadas no Laboratório de Ecofisiologia Animal do Departamento de Ciências Fisiológicas (Centro de Ciências Biológicas) da UEL.

#### 4.1.2 Localização das Áreas Experimentais

O experimento referente à fertilização com lixiviado de aterro sanitário foi conduzido na estação experimental do Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), em Londrina – PR. A condução do experimento referente à densidade de plantas e doses de nitrogênio na cultura do milho foi realizada na Fazenda Panônia, situada em Mauá da Serra - PR. O experimento com inoculação de *Azospirillum brasilense* e doses de nitrogênio na cultura do milho foi realizado em dois locais de pesquisa da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Centro Nacional de Pesquisa em Soja (Embrapa soja). O primeiro local foi a fazenda experimental da sede Embrapa soja em Londrina - PR e o segundo local, a fazenda experimental do Escritório de Negócios da Embrapa Transferência de Tecnologia em Ponta Grossa - PR.

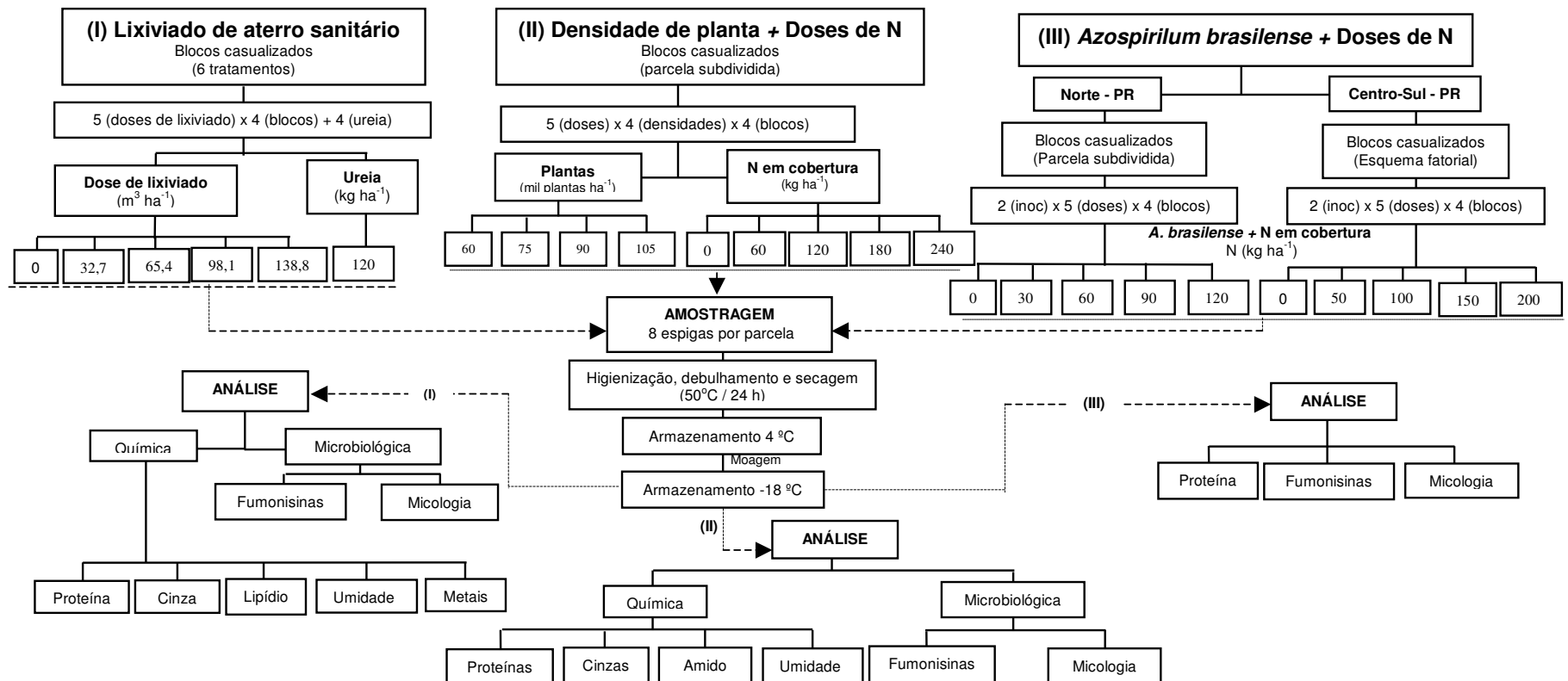
#### 4.1.3 Amostras de Milho

No experimento referente à fertilização com lixiviado de aterro sanitário foi utilizado o híbrido 2B710 da Dow AgroSciences®. O experimento referente à densidade de plantas e doses de nitrogênio na cultura do milho foi usado o híbrido transgênico DKB240YG da empresa Dekalb®. Na avaliação do efeito da inoculação de semente com *Azospirillum brasilense* e fertilização nitrogenada de cobertura na cultura do milho foi utilizado o híbrido transgênico DKB390YG da empresa Dekalb.

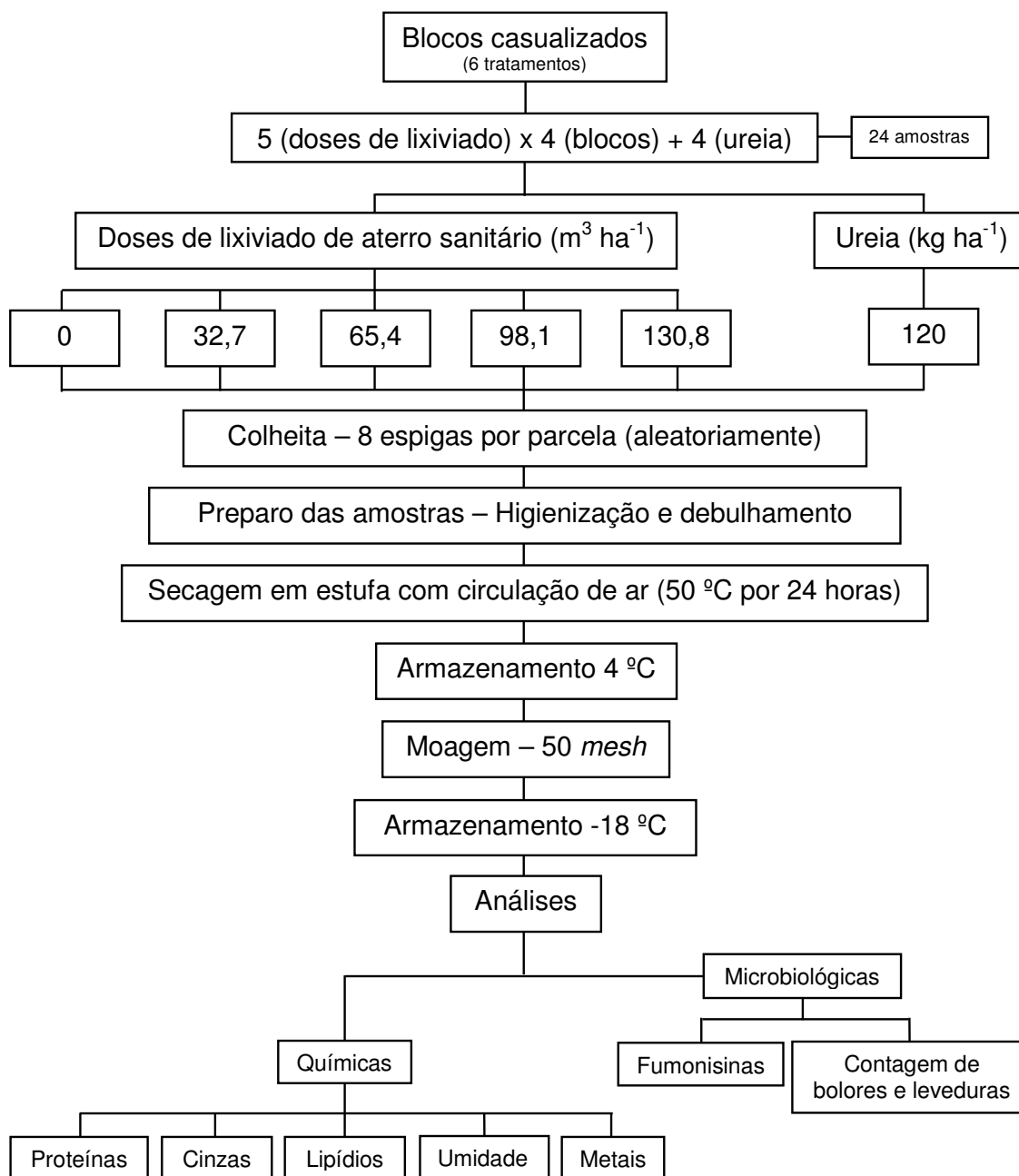
## 4.2 MÉTODOS

### 4.2.1 Delineamento Experimental

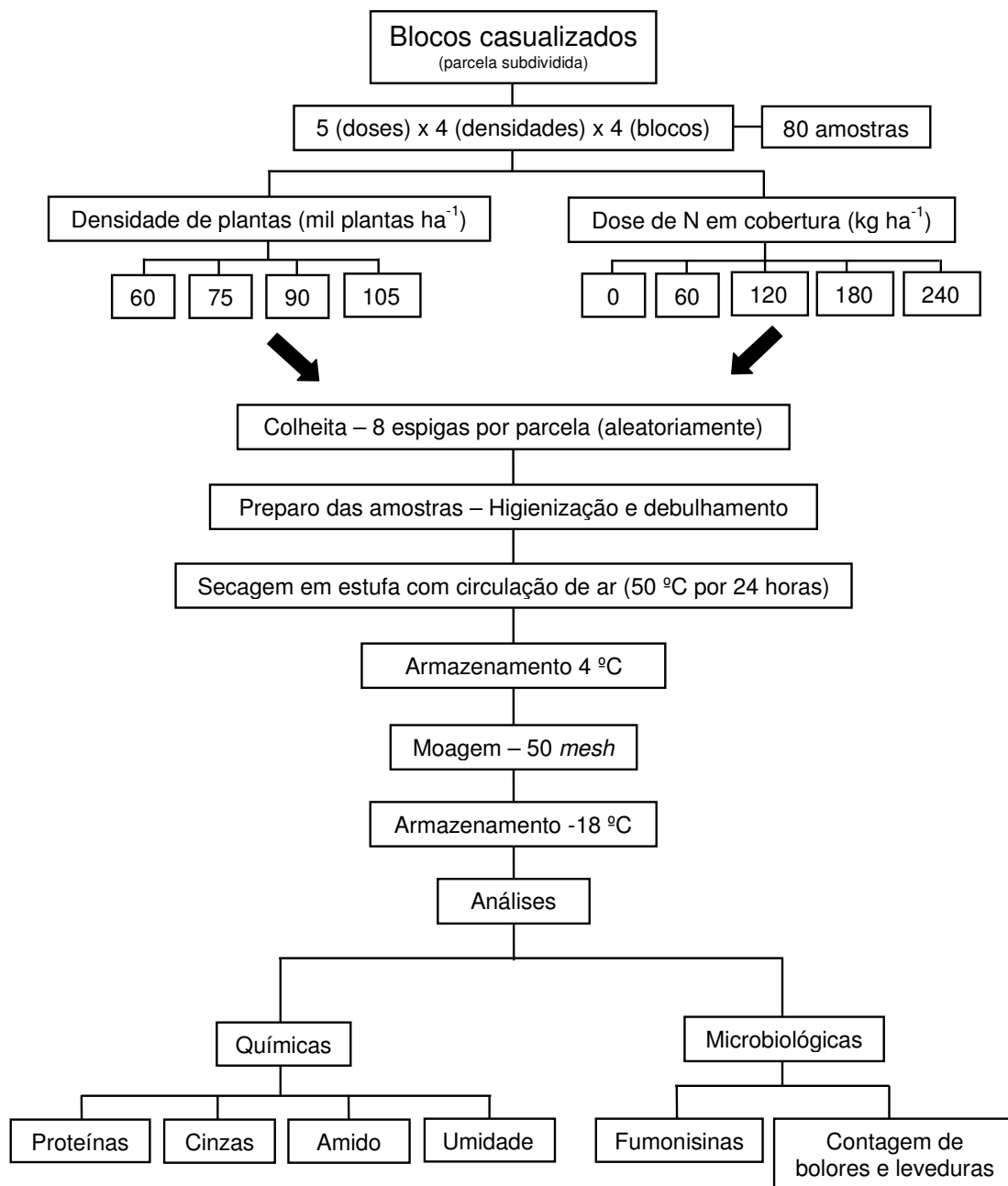
**Figura 7** – Efeito das doses de lixiviado; densidade de plantas e inoculação de *Azospirillum brasilense* vs doses de nitrogênio em grãos de milho produzido (perfil físico-químico, contaminação fúngica e produção de fumonisina).



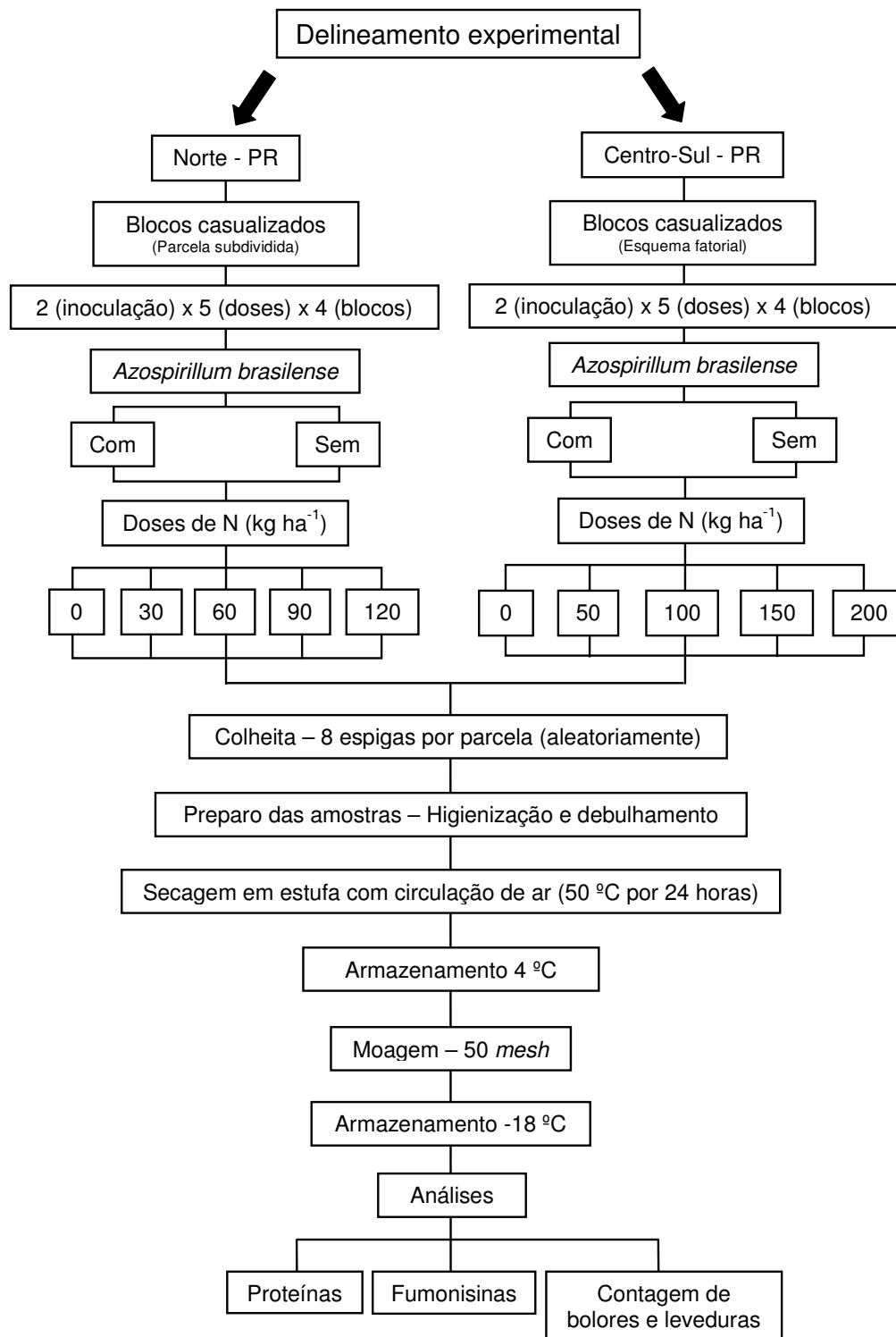
**Figura 8** - Procedimento operacional da avaliação de doses de lixiviado de aterro sanitário na cultura do milho na contaminação por fumonisinas, metais pesados e características físico-químicas dos grãos.



**Figura 9** - Procedimento operacional para avaliação da influência de densidade de plantas e doses de nitrogênio em cobertura na contaminação por fumonisinas e parâmetros físico-químicos em grãos de milho.



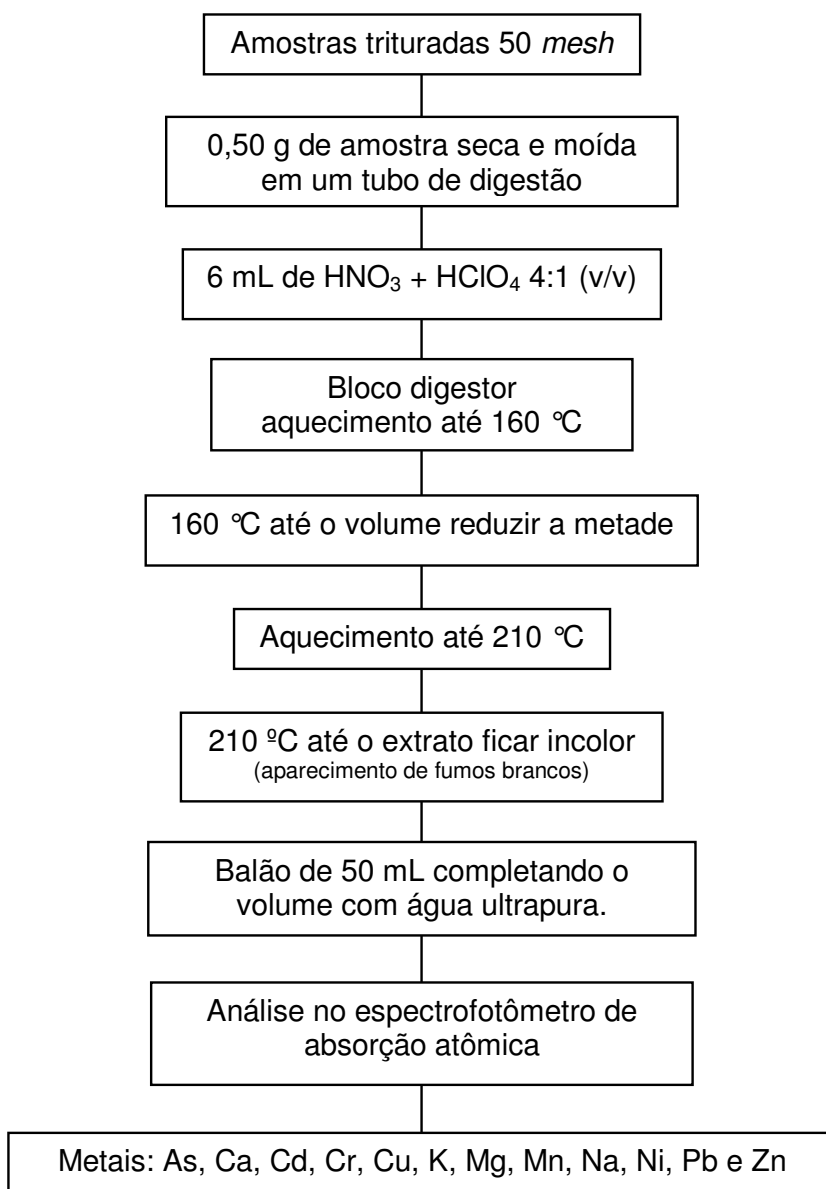
**Figura 10** - Procedimento operacional de inoculação de *Azospirillum brasilense* nas sementes de milho e doses de nitrogênio sobre os teores de proteínas, contaminação fúngica e fumonisinas em grãos de milho.



#### 4.2.2 Análise de Metais

A metodologia utilizada neste trabalho foi descrita por Malavolta et al. (1997) (Figura 11). Alíquotas de 0,50 g de amostra de milho triturada a 50 *mesh* (moinho de martelo, modelo MA-090, Marconi<sup>®</sup>, Piracicaba, Brasil) foram transferidas para tubos de digestão e volumes de 6 mL de uma mistura de HNO<sub>3</sub> e HClO<sub>4</sub> na proporção 4:1 (v/v) foram adicionados em cada tubo. Em seguida, os tubos foram levados ao bloco digestor (modelo TE-40/25, Tecnal<sup>®</sup>, Piracicaba, Brasil) no qual a temperatura foi aumentada gradativamente até atingir 210 °C e mantida até a formação de fumos brancos de HClO<sub>4</sub> e o extrato apresentar-se incolor. Após esfriar, os extratos foram transferidos para balões de 50 mL e o volume completado com água ultrapura. Após a oxidação do material vegetal pela digestão nítrico-perclórica, os elementos foram quantificados por espectrometria de absorção atômica (Espectrômetro de Absorção Atômica Modelo *AAAnalyst 700*, Perkin-Elmer<sup>®</sup>, Estados Unidos)

**Figura 11** - Procedimento para análise do teor de metais por digestão nítrico-perclórica e quantificação por espectroscopia por absorção atômica.

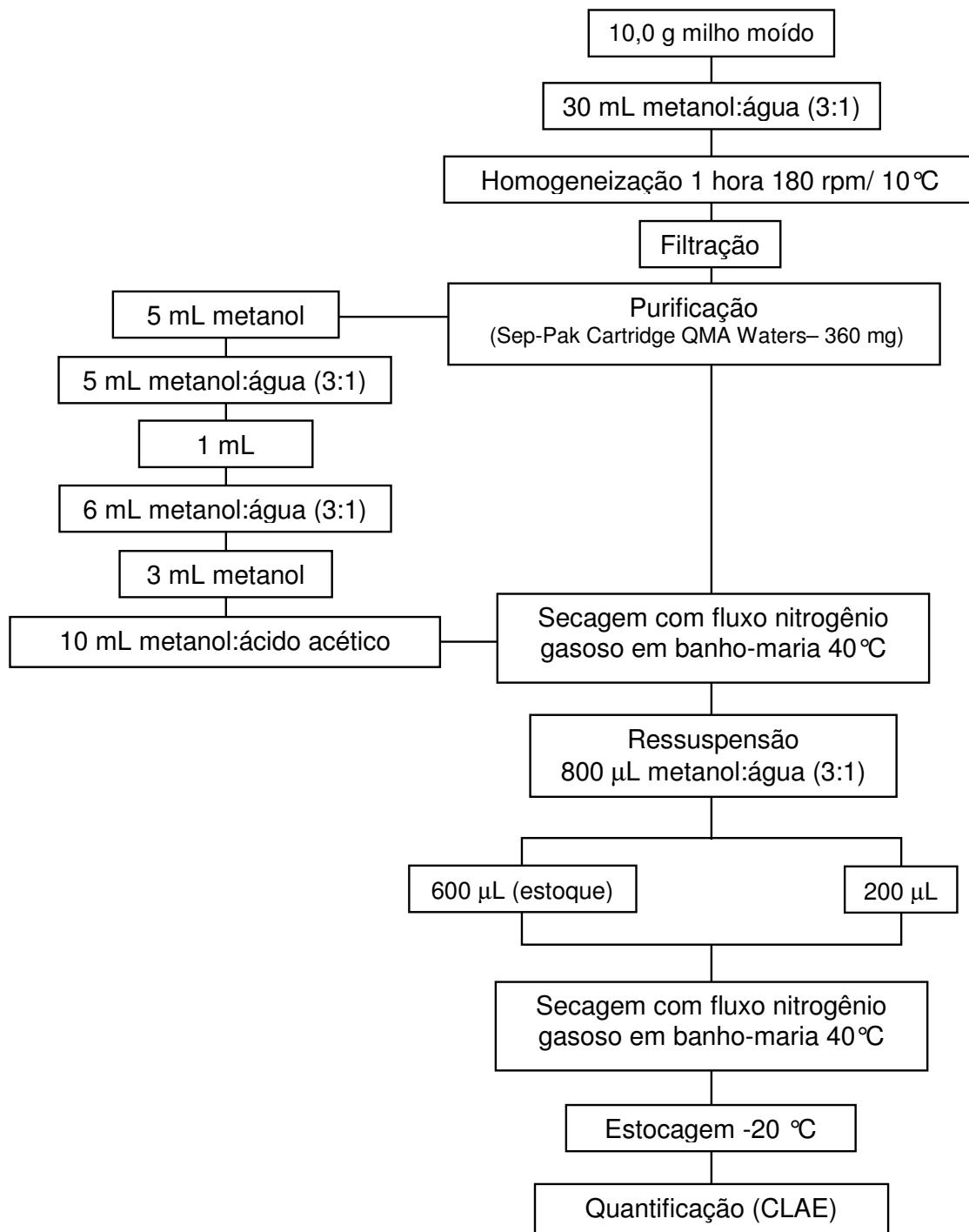


#### 4.2.3 Extração e Purificação de Fumonisinias

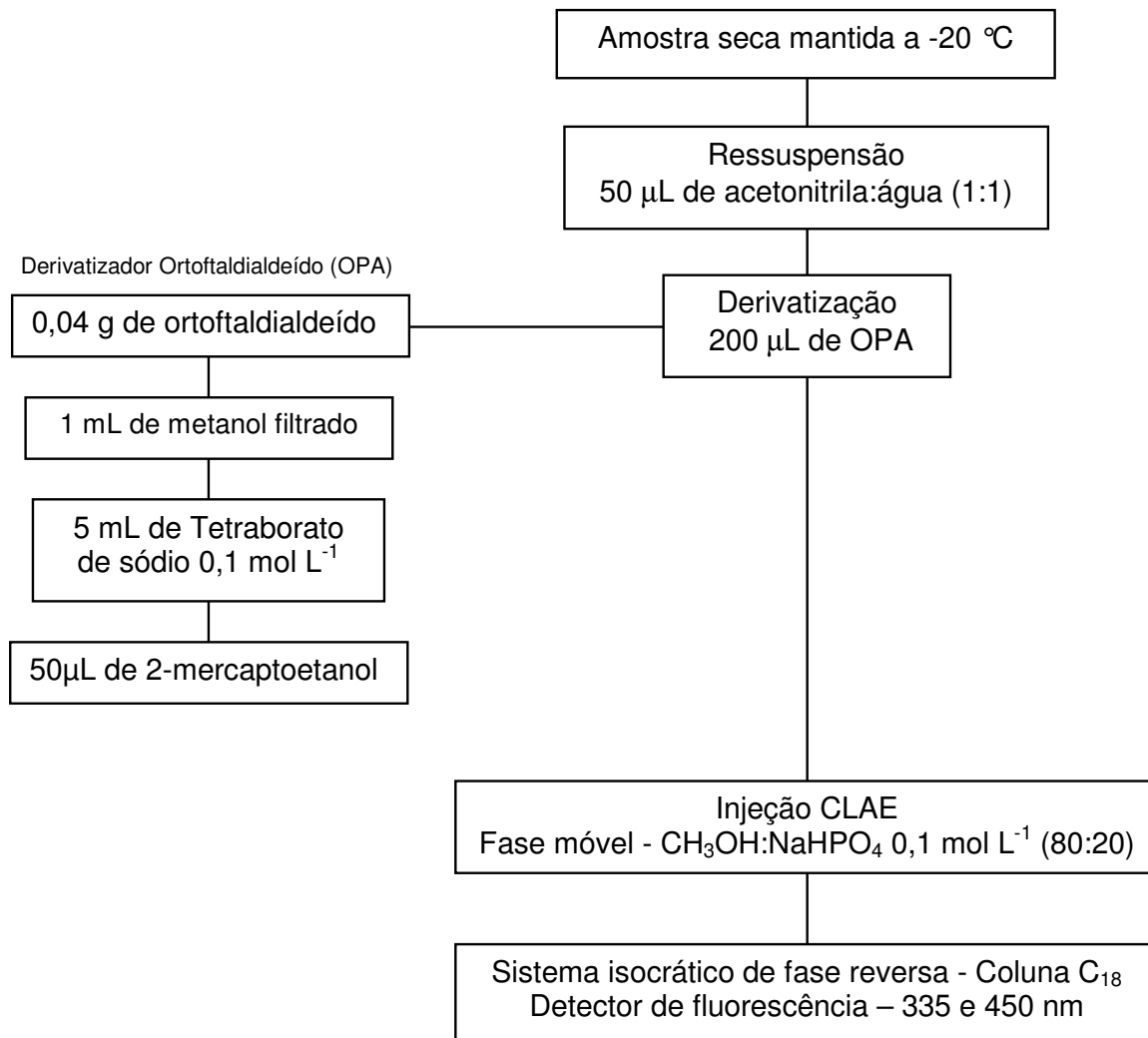
A determinação de fumonisinias foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) de acordo com a metodologia descrita por Shephard et al. (1990), modificada por Ueno et al. (1993). Para extração, um volume de 30 mL de metanol: água (3:1, v:v) foi adicionado a 10,0 g de amostra triturada (50 *mesh*), seguido de agitação a 150 rotações minuto<sup>-1</sup> por 1 hora a 10 °C. Após filtração, foi aplicado 1 mL do extrato bruto em coluna de troca aniônica Sep-Pak accell plus QMA (Waters Co., Ltda, Irlanda) previamente acondicionada com 5 mL de metanol, seguido de 5 mL de metanol:água (3:1, v:v). Posteriormente, foram aplicados 6 mL de metanol:água (3:1, v:v), seguidos de 3 mL de metanol. Fumonisinias foram eluídas com 10 mL de solução ácido acético 0,5% em metanol e o eluato seco a 40 °C. O resíduo foi ressuspensão em 2 mL de metanol:água (3:1, v:v), seco sob fluxo de gás N<sub>2</sub> a 40 °C e novamente ressuspensão em 800 µL de metanol:água (3:1, v:v) e dividida em 3 alíquotas, sendo duas de 200 µL e uma de 400 µL e secas sob fluxo de gás N<sub>2</sub> a 40 °C (Figura 12).

#### 4.2.4 Quantificação de Fumonisinias

A determinação de fumonisinias foi realizada por CLAE de acordo com a metodologia descrita por Shephard et al. (1990), modificada por Ueno et al. (1993) (Figura 13). Uma alíquota de 200 µL seca sob fluxo de gás N<sub>2</sub> a 40 °C foi ressuspensão em 50 µL de acetonitrila:água (1:1), derivatizada com 200 µL de orto-ftaldialdeído (OPA) (0,04 g de OPA, 1 mL de metanol, 5 mL de tetraborato de sódio 0,1 mol L<sup>-1</sup> e 50 µL de 2-mercaptoetanol) e as injeções foram feitas dentro de 1 min. Fumonisinias foram analisadas em sistema isocrático de fase reversa por CLAE (bomba LC-10 AD e detector de fluorescência RF 10 AXL, Shimadzu, Japão), usando coluna C<sub>18</sub> Luna 5 µ (4,6 x 250 mm; Phenomenex<sup>®</sup>, EUA). Foi utilizado comprimento de onda de 335 nm e 450 nm de excitação e emissão, respectivamente. A fase móvel consistiu de metanol: fosfato de sódio (CH<sub>3</sub>OH:Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) 0,1 mol L<sup>-1</sup> (80:20, v:v) ajustado com ácido ortofosfórico a pH 3,3, fluxo de 1 mL min<sup>-1</sup>. O limite de detecção de FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub> foi 27,5 e 35,3 ng g<sup>-1</sup>, respectivamente. As taxas de recuperação de FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub> foram de 95,6% e 96,9%, respectivamente.

**Figura 12 - Extração e purificação de fumonisinas**

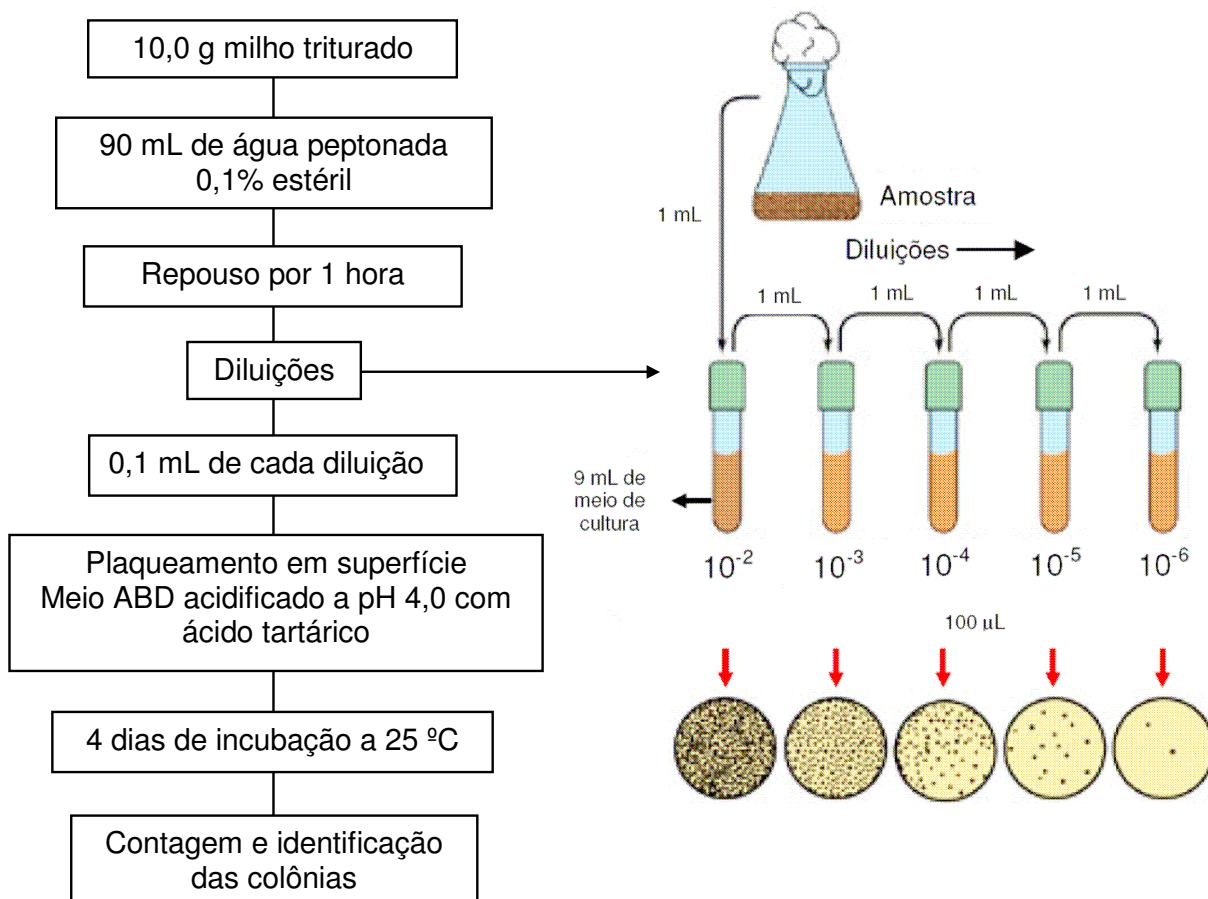
**Figura 13** - Quantificação de fumonisina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)



#### 4.2.5 Análise da Microbiota Fúngica em Milho

A contagem *Fusarium* spp., *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp. e leveduras foi efetuada segundo metodologia de plaqueamento em superfície (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 2001). Alíquota de 10,0 g de milho triturado (50 mesh) foi homogeneizada em 90 mL de água peptonada 0,1% estéril e deixado em repouso por 1 hora. Posteriormente foram realizadas diluições seriadas ( $10^{-1}$  a  $10^{-6}$ ) em tubos contendo o mesmo diluente. Uma alíquota de 0,1 mL de cada diluição foi plaqueada em meio Ágar Batata Dextrose (ABD), acidificado a pH 4,0 com ácido tartárico. As placas foram incubadas a 25 °C por cinco dias e após a contagem, os gêneros fúngicos foram identificados de acordo com Nelson; Toussoun; Marasas (1983) e Samson; Hoeskstra; Frisvad (1996).

**Figura 14** – Contagem de *Fusarium* spp., *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp. e leveduras



#### 4.2.6 Proteínas

O teor de proteína bruta foi determinado pelo método de Kjeldahl (AOAC, 1995). Em tubo de digestão foram adicionados 2,50 g de catalisador (95 g  $K_2SO_4$  + 5 g  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ , macerado), 0,20 g de milho triturado e 8 mL de ácido sulfúrico concentrado. O tubo permaneceu em bloco digestor (modelo TE-40/25, Tecnal<sup>®</sup>, Piracicaba, Brasil) a 400 °C até o líquido ficar azul transparente. Após esfriamento, 10 mL de água destilada foram adicionadas no tubo contendo a amostra digerida. No destilador de nitrogênio (modelo TE-036/1, Tecnal<sup>®</sup>, Piracicaba, Brasil), NaOH 50% foi adicionado no tubo com a amostra e um volume de 50 mL do destilado foi coletado em erlenmeyer contendo 10 mL de ácido bórico e 8 gotas de indicador misto. Em seguida, o destilado foi titulado com ácido sulfúrico 0,02 N e o teor total de nitrogênio foi convertido em proteínas pelo uso do fator 6,25. Para os cálculos, foi utilizado a Equação 1.

Equação 1:

$$\% P = \{(V \text{ gasto na titulação} - V \text{ do branco}) \times 0,02 \times 14,007 \times \text{fator de calibração} \times 100 \times 6,25\} / \text{amostra (g)}.$$

#### 4.2.7 Cinzas

Os teores de cinzas foram determinados mediante pesagem de resíduos de incineração (IAL, 1985). Um cadinho de porcelana foi previamente aquecido em mufla a 550 °C (modelo 318D24, Quimis<sup>®</sup>, Diadema, Brasil), resfriada em dessecador até a temperatura ambiente e pesada. Uma quantidade de 2,00 g de amostra foi colocada no cadinho e carbonizada com o auxílio de bico de Bunsen. Em seguida, o material carbonizado foi incinerado em mufla a 550 °C até ficarem brancos ou ligeiramente acinzentados. Os cadinhos com as amostras incineradas foram retirados da mufla e colocadas no dessecador até atingir a temperatura ambiente e pesadas. Este procedimento foi repetido até atingir peso constante. Posteriormente foi utilizada a Equação 2 para o cálculo de teor de cinzas (%).

Equação 2:

$$\% \text{ de cinzas} = 100 \times (\text{Peso cadinho com cinza} - \text{Peso cadinho vazio}) / \text{amostra (g)}.$$

#### 4.2.8 Amido Disponível

A extração de amido disponível foi realizada segundo AOAC (1995), modificado por Walter; Silva; Perdomo (2005). Em 0,30 g de grãos triturados (50 *mesh*) foi adicionado 0,2 mL de etanol 80%, 3 mL de tampão fosfato pH 6,8 (800 g de NaCl, 20 g de KCl, 144 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 24 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> em 8,0 L de água destilada) e 100 µL da solução α-amilase termoestável:água (30:70, v/v). Após agitação, o material foi aquecido em banho-maria a 95 °C por 5 minutos, sendo em seguida resfriado até atingir temperatura ambiente. Posteriormente, adicionou-se 4 mL de tampão acetato de sódio pH 4,5 e 100 µL da solução de amiloglucosidase:água (30:70, v/v), seguido de aquecimento em banho-maria a 50 °C por 30 minutos e resfriamento até temperatura ambiente. O material teve seu volume ajustado para 100 mL em balão volumétrico com água destilada. Após extração e hidrólise do amido, foi utilizada metodologia proposta por Nelson (1944) modificada por Somogyi (1945) para quantificação da glicose, sendo realizada a leitura em espectrofotômetro a 505 nm. Utilizou-se uma curva padrão de glicose 0,02%, fazendo-se diluições com concentrações de glicose de 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180 e 200 µg mL<sup>-1</sup> (Figura 8). A porcentagem de amido nas amostras foi calculada utilizando as Equações 3 e 4 propostas por Cereda et al. (2002).

Equação 3:

$$\% \text{ açúcares redutores} = (A\% \times D \times K \times 100) / 1.000.000$$

No qual:

A% = Absorbância da amostra;

D = Diluição;

K = Constante da curva padrão da glicose.

Equação 4:

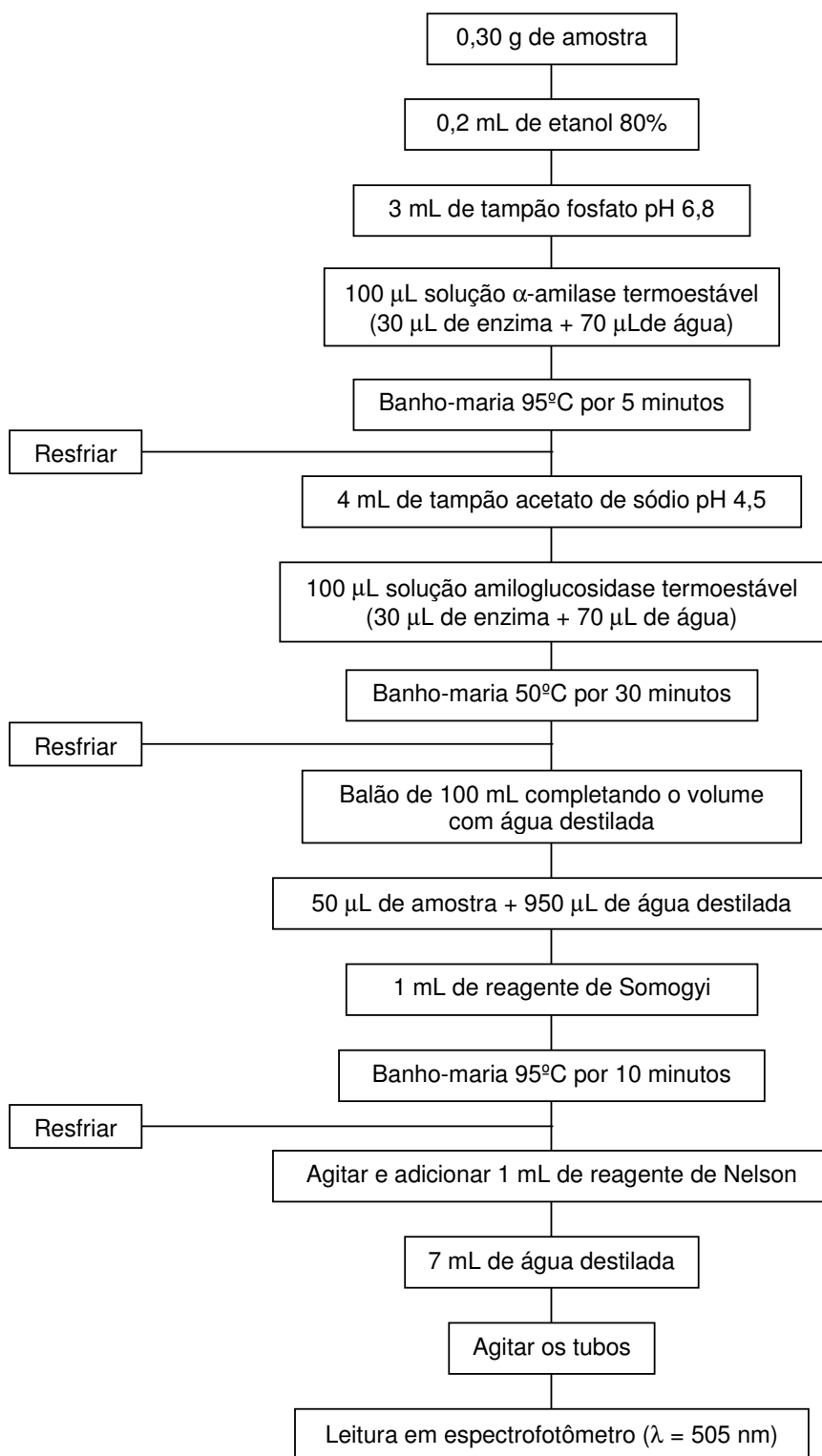
$$\% \text{ Amido base úmida} = (\% \text{ açúcares redutores} \times 0,9 \times 100) / P.$$

$$\% \text{ Amido base seca} = (\% \text{ amido base úmida} \times 100) / (100 - \% \text{ umidade}).$$

No qual:

P = Peso inicial da amostra;

% Umidade = % de umidade encontrada na amostra.

**Figura 15** – Extração e determinação do teor de amido em milho.

#### 4.2.9 Lipídios

O teor de lipídios foi determinado pelo método Soxhlet (AOAC, 1995). Um cartucho de papel filtro contendo 2,0 g de amostra de milho triturado (50 *mesh*) foi colocado em extrator de Soxhlet (modelo TE-188, Tecnal<sup>®</sup>, Piracicaba, Brasil). A extração ocorreu por refluxo de 150-200 mL de éter de petróleo e aquecimento. Após 6 horas de processo, o balão foi retirado do extrator, mantido em estufa a 125 °C por 45 minutos e, em seguida, pesado. Para cálculo de % de lipídios foi utilizada a Equação 5.

Equação 5:

$$\% \text{ lipídeo} = (100 \times \text{lipídeo extraído (g)}) / \text{amostra (g)}.$$

#### 4.2.10 Umidade

A determinação de umidade dos grãos de milho foi feita pelo método de secagem a 105 °C (IAL, 2008) Uma quantidade de 2,0 g de amostra foi colocada em cápsula de metal, previamente tarada. A cápsula com amostra úmida foi aquecida durante 3 horas em estufa a 105 °C e posteriormente resfriada em dessecador até temperatura ambiente. A operação de secagem e resfriamento foi feita até obtenção de peso constante, para então ser calculada a porcentagem de umidade, utilizando-se a Equação 6.

Equação 6:

$$\% \text{ Umidade} = (100 \times \text{n}^{\circ} \text{ de gramas de umidade}) / \text{n}^{\circ} \text{ de gramas da amostra}$$

#### 4.2.11 Atividade de Água

A determinação de atividade de água nas amostras foi realizada por meio de leitura em equipamento Aqualab<sup>®</sup> (modelo 4TE, Decagon Devices<sup>®</sup>, Pullman, Estados Unidos), seguindo as especificações do fabricante.

## 5 ARTIGO 1: INFLUÊNCIA DE FERTILIZAÇÃO COM LIXIVIADO DE ATERRO SANITÁRIO NA COMPOSIÇÃO QUÍMICA, PRODUTIVIDADE E QUALIDADE SANITÁRIA DE MILHO

### RESUMO

O lixiviado de aterro sanitário é um líquido escuro rico em nitrogênio amoniacal, resultante da decomposição anaeróbia da fração orgânica de resíduo sólido urbano. O trabalho teve por objetivo avaliar o efeito de fertilização com cinco doses crescentes de lixiviado de aterro sanitário (0; 32,7; 65,4; 98,1 e 130,8 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup>) e uma com ureia (120 kg ha<sup>-1</sup>) na composição físico-química, teor de metais, produtividade e qualidade sanitária de milho, nos anos agrícolas de 2009/2010 e 2011/2012. Além disso, foi avaliado o acúmulo de metais em aveia e trigo, que foram cultivadas no período de inverno no mesmo campo experimental. A produtividade e os teores de proteínas, cinzas e lipídios, em geral aumentaram com a aplicação de doses crescentes de lixiviado de aterro sanitário. Fumonisinas ocorreram em 100% das amostras de milho nos dois anos avaliados, com maiores concentrações detectadas no controle sem fertilização e nos tratamentos com lixiviado, no qual foram detectadas amostras contaminadas com níveis superiores ao limite máximo tolerado recomendado pela ANVISA (5,0 µg g<sup>-1</sup>). A concentração de cálcio, magnésio, sódio, potássio, zinco, cobre, níquel e chumbo em milho adubado com lixiviado de aterro sanitário não diferiram do controle sem fertilização (p > 0,05), exceto manganês, cuja concentração aumentou com aplicação de lixiviado. Contudo, observou-se tendência de aumento na concentração de chumbo no ano 2009/2010 e sódio em 2011/2012 com incremento nas doses de lixiviado. As concentrações de cobre, chumbo e manganês em tecido foliar de aveia aumentaram com incremento nas doses de lixiviado. Para trigo, somente manganês teve concentração aumentada com as doses de lixiviado aplicadas ao solo. Os resultados mostram a necessidade de maior investigação quanto ao uso seguro de lixiviado de aterro sanitário em solo agrícola.

**Palavras-chave:** Lixiviado de aterro sanitário. Disposição de efluentes líquidos. Reaproveitamento de nutrientes. Metais pesados. Fumonisinas.

## **INFLUENCE OF FERTILIZATION WITH LANDFILL LEACHATE ABOUT CHEMICAL COMPOSITION, PRODUCTIVITY AND QUALITY SANITARY OF CORN.**

### **ABSTRACT**

The landfill leachate is a rich dark liquid ammoniacal nitrogen resulting from the anaerobic decomposition of organic fraction of municipal solid waste. The study aimed to evaluate effect of fertilization with five increasing doses of landfill leachate (0, 32.7, 65.4, 98.1 and 130.8 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup>) and urea (120 kg ha<sup>-1</sup>) was evaluated in physico-chemical composition, metal content, productivity and health quality of maize in crop years 2009/2010 and 2011/2012. In addition evaluated accumulation of heavy metals in leaf tissue oat and wheat grains that were grown during winter in the same experimental field. Productivity, besides the content proteins, lipids and ashes in grains increased with the application of increasing doses of landfill leachate. Fumonisin occurred in 100% of the corn samples evaluated in two years, with highest concentrations detected in control without fertilization and treatments with leachate, where was detected samples contaminated with levels above the maximum tolerated recommended by Brazilian legislation (5.0 µg g<sup>-1</sup>). The concentration of calcium, magnesium, sodium, potassium, zinc, copper, nickel and lead in corn fertilized with landfill leachate did not differ from control without fertilization ( $p > 0.05$ ), except manganese, whose concentration increased with application of leachate. However, trend was observed in increase in the concentration of lead in year 2009/2010 and sodium in 2011/2012 with increased doses of leachate. Concentrations of copper, lead and manganese in leaf tissue oats increased with increased doses of leachate. For wheat, only manganese had their concentration increased with leachate applied to the soil. Results show the need for further investigation before safe use of landfill leachate in agricultural soil.

**Key words:** landfill leachate. Disposal of liquid waste. Reuse of nutrients. Heavy metals. Fumonisin.

## INTRODUÇÃO

A atividade humana gera grande quantidade de resíduos sólidos ou líquidos, os quais apresentam ampla variedade e complexidade e que, quando dispostos de forma incorreta, impactam o ambiente de diversas formas devido ao seu potencial como poluente. Em muitas regiões no Brasil, os resíduos sólidos urbanos são depositados em escavações ou depressões naturais do solo, sendo denominados como lixões ou aterros controlados. Nestes locais não existe controle da entrada de água pluvial ou saída da água de drenagem. A tecnologia de disposição tem evoluído e os resíduos têm sido depositados em aterros sanitários, os quais são construídos com planejamento no que diz respeito à separação dos resíduos, coleta e tratamento do lixiviado, além do controle do metano produzido (BARLAZ, 1996).

As principais emissões de poluentes associados a aterros sanitários são a geração de gases potencialmente explosivos e produção de lixiviados (SANG et al., 2010). O lixiviado de aterro sanitário é um resíduo líquido de elevada carga orgânica e coloração escura, produzida pela decomposição química e microbiológica de resíduos sólidos orgânicos. A formação e composição química do lixiviado são difíceis de serem definidas, pois dependem de várias condições ambientais no local do aterro, tais como: geologia, temperatura, teor de umidade interna, quantidade de chuvas, entre outras. Além disso, é influenciada pela natureza dos resíduos depositados, da forma de disposição, manejo e idade do aterro, (IM et al., 2001; EL FADEL et al., 2002).

Aterros sanitários recebem lixo de origem doméstica, comercial, industrial e, em alguns casos, hospitalar. Conseqüentemente, a composição do lixiviado é complexa e pode ser caracterizada como uma solução aquosa contendo quatro frações principais: matéria orgânica dissolvida (formada principalmente por metano, ácidos graxos voláteis, compostos húmicos e fúlvicos), macrocomponentes inorgânicos ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{HCO}_3^-$ ), metais pesados ( $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  e  $\text{Ni}^{2+}$ ) em concentrações variáveis, dependendo da origem dos resíduos e da idade do aterro e compostos orgânicos xenobióticos (representados por hidrocarbonetos aromáticos, compostos fenólicos e organoclorados alifáticos) presentes em concentrações relativamente baixas (CHRISTENSEN et al., 1994).

Existem poucos métodos com características técnicas e economicamente viáveis que possam ser efetivamente aplicadas no tratamento do lixiviado gerado (FLECK, 2005). A disposição do lixiviado no solo surge como alternativa, pois constitui o melhor e mais seguro meio para disposição de poluentes quando comparado à hidrosfera ou à atmosfera. Outro benefício da disposição desses resíduos no solo refere-se à possibilidade de serem usados na agricultura como fertilizantes. A aplicação de lixiviado de aterro sanitário em solo fornece uma opção para completar o ciclo do nitrogênio (N) pelo retorno e biodisponibilidade de  $\text{NH}_x\text{-N}$  para o ecossistema, aliviando simultaneamente a carga das estações de tratamento pelo potencial de fitorremediação do sistema solo-planta (CHENG; CHU, 2011). Além disso, a disposição de lixiviado de aterro sanitário em solos agrícolas pode contribuir para produção de alimentos, uma vez que os nutrientes são imobilizados pelas plantas e convertidos em biomassa.

Uma das preocupações quanto à aplicação de lixiviado de aterro sanitário ao solo advém da possível contaminação por metais pesados. A presença de metais em lixiviados de indústrias e aterros sanitários é uma das principais causas de poluição do solo e da água (WANG et al., 2005). Os metais pesados podem expressar seu potencial poluente diretamente em organismos do solo, pela disponibilidade às plantas em níveis fitotóxicos, além da possibilidade de transferência para cadeia alimentar por meio das próprias plantas ou pela contaminação das águas de superfície e subsuperfície (CHANG et al., 1987).

Os nutrientes imediatamente disponíveis às plantas são aqueles que se encontram em solução, oriundos da fase sólida do solo ou dos fertilizantes. Por sua vez, a disponibilização dos íons para as raízes depende de diversos fatores, tais como: pH, complexação iônica, conteúdo de água, precipitação e dissolução de sólidos, temperatura, profundidade no solo, capacidade de troca de cátions, potencial de oxirredução, atividade biológica e teor de matéria orgânica do solo (SPOSITO, 1989). A disponibilidade de minerais no solo influencia a composição nutricional das plantas e consequente susceptibilidade ao ataque de patógenos e pragas. Além disso, práticas de manejo agrícola exercem impacto direto na diversidade microbiana, principalmente em relação à sanidade do solo e cultura, influenciando na sustentabilidade (BUYER; KAUFMAN, 1996).

O milho está sujeito a ação de fungos fitopatogênicos, responsáveis por perdas da qualidade sanitária, física e nutricional de grãos. Além disso, muitas

destas espécies de fungos produzem metabólitos secundários tóxicos, conhecidos como micotoxinas, que contaminam os grãos causando risco potencial para saúde humana e animal, resultando em doenças e perdas econômicas (CAST, 2003). Fumonisinas são micotoxinas solúveis em água que são produzidas por várias espécies de *Fusarium*, principalmente *Fusarium verticillioides* e *F. proliferatum*, sendo um contaminante fúngico primário do milho e seus produtos derivados em todo o mundo (KRSKA; WELZIG; BOUDRA, 2007; WANG et al., 2008). A Agência Internacional para Pesquisa sobre o Câncer (IARC) em Lyon, França, avaliou as toxinas produzidas por *F. verticillioides* como cancerígenos do grupo 2B, isto é, possivelmente cancerígeno para seres humanos (IARC, 1993).

O uso de resíduos de aterro sanitário, sobretudo aqueles com altos teores de nitrogênio como fonte alternativa de nutrientes para agricultura, já vêm sendo estudado por outros autores (MADRID et al., 2007; CHENG; CHU, 2007). O melhor entendimento das modificações nos atributos químicos do solo, decorrentes da reciclagem de resíduos orgânicos e do uso de resíduos na fertilização, pode fornecer subsídios para produção em bases sustentáveis, sem comprometer o ambiente (SCHERER; BALDISSERA; NESI, 2007). No entanto, essa prática só será viável se os riscos ambientais forem evitados ou minimizados e os alimentos produzidos tiverem níveis toleráveis de contaminação por poluentes, assim como eventuais efeitos negativos na produtividade e qualidade das culturas agrícolas.

Diante do exposto, o trabalho teve objetivo de avaliar a produtividade, composição química (teores de nutrientes, proteínas, lipídios e cinzas) e a qualidade sanitária (concentrações de metais pesados, contaminação fúngica e fumonisinas) de grãos de milho (primeira safra) submetidos à fertilização com diferentes doses de lixiviado de aterro sanitário. Como complemento, foi avaliada a concentração de metais em tecido foliar de aveia preta e em grãos de trigo, cultivados no mesmo campo experimental como cobertura do solo no período do inverno e que também foram submetidos à fertilização com lixiviado de aterro sanitário

## **EXPERIMENTAL**

### *Localização e caracterização da área experimental*

O experimento foi conduzido na fazenda experimental do Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), em Londrina, região Norte do Estado do Paraná, o

qual se encontra a 22°22' latitude Sul, 51°9' longitude Oeste de Greenwich, em solo classificado como Latossolo Vermelho distroférico (LVdf) com textura argilosa (EMBRAPA, 2006). A Tabela 1 apresenta algumas características químicas do solo antes da instalação do experimento em 2008 (PANCHONI, 2011).

O clima da região, segundo classificação de Köppen, é Cfa, ou seja, clima subtropical com temperatura média no mês mais frio inferior a 18°C (mesotérmico) e temperatura média no mês mais quente acima de 22°C, com verões quentes, geadas pouco frequentes e tendência de concentração das chuvas nos meses de verão, contudo sem estação seca definida (IAPAR, 2012). A Figura 1 apresenta os dados de temperaturas máxima e mínima, além da precipitação pluviométrica mensal, durante o período de condução do experimento, nos anos agrícolas de (a) 2009/2010 e (b) 2011/2012.

#### *Delineamento experimental e aplicações do lixiviado de aterro sanitário*

O delineamento experimental foi em blocos casualizados, com quatro repetições. Foram instalados 6 tratamentos: um controle sem fertilização (D0), um tratamento com 120 kg N ha<sup>-1</sup> na forma de uréia (UR) e mais quatro doses de lixiviado (D1, D2, D3 e D4), sendo estas crescentes e calculadas em função do teor de nitrogênio total presente no lixiviado na primeira aplicação, com objetivo de fornecer 30, 60, 90 e 120 kg N ha<sup>-1</sup>, respectivamente, o que resultou em um volume de aplicação de 0; 32,7; 65,4; 98,1 e 130,8 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> de lixiviado, respectivamente. O lixiviado foi aplicado na área por nove vezes, nos seguintes períodos: julho/2008, agosto/2008, outubro/2008, maio/2009, setembro/2009, dezembro/2009, junho/2011, dezembro/2011 e junho/2012.

Devido à dificuldade de se obter lixiviado de aterro sanitário na região, foram utilizados lixiviados de três locais diferentes. Nas seis primeiras aplicações utilizou-se lixiviado do antigo depósito de resíduos sólidos do município de Londrina-PR. Nas duas aplicações seguintes foi utilizado lixiviado do aterro do município de Rolândia - PR e na última aplicação foi utilizado lixiviado do aterro do município de Araçongas - PR. Em cada aplicação, amostras do lixiviado foram coletadas para posterior análises de metais, sendo que o pH foi medido diretamente na amostra de lixiviado (Tabela 2).

O volume de lixiviado utilizado na primeira aplicação foi fixado para demais aplicações e posteriormente determinado os teores de N no lixiviado usado

em cada aplicação, sendo que em média as aplicações forneceram o correspondente a  $D0 = 0$ ;  $D1 = 29,2$ ;  $D2 = 57,5$ ;  $D3 = 85,8$  e  $D4 = 115,1$  kg ha<sup>-1</sup> de N. O tratamento com ureia (UR) recebeu 120 kg ha<sup>-1</sup> de N, metade aplicada no sulco de semeadura e a outra metade 40 dias após, em cobertura. As parcelas apresentaram a dimensão de 6 x 8 m, mantendo-se 1 m de bordadura ao seu redor, totalizando área útil de 35 m<sup>2</sup>. Entre as parcelas foram ainda mantidos corredores de 2 m de largura.

Em maio/2009 foi semeada aveia preta (*Avena strigosa*, variedade IAPAR 61) como cobertura de solo, sem uso de qualquer fertilizante. A semeadura do milho foi realizada em novembro/2009, utilizando híbrido 2B710 da Dow AgroSciences<sup>®</sup>, diretamente sobre a palhada de aveia e solo adubado com lixiviado do aterro sanitário de Londrina - PR, conforme os tratamentos. Em junho/2011 foi semeada novamente aveia preta (variedade IAPAR 61) como cobertura do solo antes do plantio de milho no verão, em solo fertilizado com lixiviado do aterro sanitário de Rolândia - PR, conforme tratamentos. Em novembro/2011 foi semeado milho diretamente sobre a palhada de aveia, em solo também submetido à aplicação de lixiviado do aterro sanitário de Rolândia - PR e, em junho/2012, foi semeado trigo no mesmo campo experimental como cobertura do solo (cultura de inverno), desta vez com aplicação de lixiviado proveniente do aterro de Arapongas - PR.

### *Amostras*

Quando os grãos apresentaram aproximadamente 20% de umidade, foram colhidas duas linhas centrais de cada parcela. As amostras foram secas em estufa a 50 °C por 24 horas e armazenadas a 4 °C até o momento do uso. Os grãos de milho e trigo, além do tecido foliar de aveia, foram triturados assepticamente até granulometria de 50 *mesh*, evitando contaminação das amostras para proceder-se às análises da composição química, contagem de bolores e leveduras e quantificação de fumonisinas.

### *Análise do teor de metais*

A metodologia utilizada neste trabalho foi descrita em Malavolta et al. (1997). Após a oxidação do material vegetal pela digestão nítrico-perclórica, os elementos foram quantificados por espectrometria de absorção atômica (item 4.2.1).

### *Determinação de fumonisinas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)*

A extração e quantificação de fumonisinas por CLAE foram realizadas de acordo com a metodologia descrita por Shephard et al. (1990), modificada por Ueno et al. (1993) (itens 4.2.2 e 4.2.3).

### *Avaliação da microbiota fúngica*

A metodologia utilizada está descrita no item 4.2.4. Os gêneros fúngicos foram identificados de acordo com Nelson; Toussoun e Marasas (1983) e Samson; Hoeskstra e Frisvad (1996).

### *Análises físico-químicas*

O teor de proteínas nos grãos de milho foi determinado pelo método Kjeldahl (AOAC, 1995) (item 4.2.5). O teor de cinzas foi determinado mediante pesagem de resíduos de incineração (IAL, 1985) (item 4.2.6). O teor de lipídios foi determinado pelo método Soxhlet (AOAC, 1995) (item 4.2.8). A determinação de umidade foi feita pelo método de secagem a 105 °C (IAL, 2008) (item 4.2.9).

### *Análise estatística*

Os níveis de fumonisinas e contagem de *Fusarium* spp., *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp. e leveduras foram estatisticamente avaliados por análise de variância seguida por teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). As análises da composição química e teores de metais foram avaliadas por análise de variância seguida por teste de Tukey ou Duncan ( $p < 0,05$ ). Toda análise estatística foi realizada pelo software *Statistica*, versão 7.0 (Stat Soft, Inc., Estados Unidos).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A Figura 2 apresenta a frequência relativa dos principais gêneros fúngicos em 48 amostras de milho do campo experimental nos anos agrícolas de 2009/2010 ( $n = 24$ ) e 2011/2012 ( $n = 24$ ). No ano 2009/2010, *Fusarium* spp. foi de maior ocorrência com 100% de detecção, seguido de *Penicillium* spp. e leveduras que foram detectados em 92% das amostras. A frequência de *Aspergillus* spp. foi menor, sendo detectado em 38,3% das amostras. No ano 2011/2012, *Penicillium* e

leveduras foram de maior ocorrência com 100% de detecção, seguido por *Fusarium* e *Aspergillus* com 66,6 e 46%, respectivamente.

Os resultados em 2009/2010 estão de acordo com os relatados por Ono et al. (2006) que detectaram *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp. em 100% e 91,6% das amostras de milho (n = 24) da região Norte do Estado do Paraná. Moreno et al. (2009) avaliaram amostras de milho recém-colhidas, nas safras de 2003 (n = 150) e 2004 (n = 90), da região Norte do Estado do Paraná e o gênero *Fusarium* spp. foi predominante com 100% de frequência para ambas as safras, seguido por *Penicillium* spp. com 97,3% (safra 2003) e 91,1% (safra 2004). Apesar de *Aspergillus* e *Penicillium* serem classificados como fungos de armazenamento, com base em estudos realizados em climas temperados, sob clima subtropical ou tropical quente e úmido, espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* podem infectar grãos no campo (CHRISTENSEN; SAUER, 1982; WILSON; ABRAMSON, 1992).

A Tabela 3 apresenta os resultados da contagem de *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. e leveduras em grãos de milho, em função das diferentes formas de fertilização (com e sem lixiviado) nos anos de 2009/2010 e 2011/2012. No ano 2009/2010, *Fusarium* spp. foi encontrado de  $3,0 \times 10^4$  a  $1,1 \times 10^6$  unidade formadora de colônia por grama de amostra (UFC g<sup>-1</sup>), *Penicillium* spp. foi detectado de  $3,4 \times 10^4$  a  $2,8 \times 10^6$  UFC g<sup>-1</sup>, *Aspergillus* spp. de  $2,5 \times 10^1$  a  $5,0 \times 10^5$  UFC g<sup>-1</sup> e leveduras de  $6,5 \times 10^3$  a  $6,1 \times 10^5$  UFC g<sup>-1</sup>. No ano 2011/2012, *Fusarium* spp. foi encontrado de  $4,4 \times 10^3$  a  $3,2 \times 10^5$  UFC g<sup>-1</sup>, *Penicillium* spp. de  $6,3 \times 10^6$  a  $1,6 \times 10^7$  UFC g<sup>-1</sup>, *Aspergillus* spp. de  $7,2 \times 10^4$  a  $3,0 \times 10^5$  UFC g<sup>-1</sup> e leveduras de  $2,4 \times 10^5$  a  $1,0 \times 10^6$  UFC g<sup>-1</sup>. A contagem de *Fusarium* e *Penicillium* estão de acordo com dados apresentados por Ono et al. (1999), nos quais obtiveram a contagem de  $1,0 \times 10^3$  a  $2,2 \times 10^6$  e  $5,5 \times 10^3$  a  $2,8 \times 10^6$  UFC g<sup>-1</sup>, respectivamente, em 37 amostras de milho da região Norte do Estado do Paraná. Moreno et al. (2009) detectaram *Aspergillus* na faixa de  $10^2$  a  $10^4$  UFC g<sup>-1</sup> em amostras (n = 90) coletadas na recepção de indústrias processadoras de milho na região Norte do Paraná.

A contaminação por *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium* e leveduras não apresentaram diferença significativa pelo teste de Tukey (p > 0,05) em relação aos diferentes formas de fertilização (com e sem lixiviado) em ambos os anos agrícolas avaliados (Tabela 3). Este resultado está de acordo com aqueles obtidos por Hassegawa et al. (2008) que avaliaram o efeito de diferentes doses de N (0, 50 e 100 kg ha<sup>-1</sup>), zinco (0, 0,5 e 1,0 kg ha<sup>-1</sup>) e boro (0 e 5,0 kg ha<sup>-1</sup>) na contaminação

fúngica e por fumonisinas em amostras de milho (safra 2000) e relataram que doses de N não exerceram efeito significativo sobre a contaminação por *Fusarium* spp, *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. Entretanto, Reid; Zhu e Ma (2001) relataram aumento significativo em sintomas de podridão em milho causado por *Fusarium graminearum* aumentando a dose de adubação química com  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  de 100 para 200  $\text{kg ha}^{-1}$ .

No ano 2009/2010 ocorreu maior frequência de *Fusarium* spp. em comparação a 2011/2012. Uma possível explicação para este resultado seria as diferentes condições climáticas entre os dois períodos. Em 2009/2010, no período de pré-colheita (mês de março) ocorreram cerca de 258 mm de precipitação, ao passo que, em 2011/2012, ocorreram 88 mm no mesmo período (Figuras 1a e 1b). A condição climática em 2009/2010 resultou em maior teor de umidade nos grãos (Tabela 3) que, aliada às altas temperaturas no período, estimularam o crescimento de *Fusarium* a níveis superiores aos encontrados em 2011/2012, no qual apresentou maior prevalência de *Penicillium* e *Aspergillus*. Fungos de campo, como *F. verticillioides*, invadem grãos no estágio de pré-colheita, ou espigas na pós-colheita antes do debulhamento, sendo que este grupo requer alto teor de umidade (20 a 22%). Por outro lado, fungos de armazenagem requerem teor de umidade na faixa de 16% para invasão micelial e compreendem espécies pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* (WATSON; RAMSTAD, 1987).

Fumonisinias totais ( $\text{FB}_1 + \text{FB}_2$ ) foram detectadas em 100% das amostras de milho em ambos os anos avaliados, independente do tratamento experimental (Tabela 4). Este resultado está de acordo com os relatados por Ono et al. (2008), nos quais detectaram fumonisinas em 100% das amostras de milho recém-colhido ( $n = 870$ ) na região Norte do Estado do Paraná (safras 2003 e 2004). Silva et al. (2008) analisaram 245 amostras de milho recém-colhido (safra 2004) de indústrias processadoras de milho da região Norte do Estado do Paraná e também detectaram fumonisinas em 100% das amostras.

Os níveis de fumonisinas encontrados, considerando todos os tratamentos, variaram de 0,08 a 13,70 (média de  $4,01 \mu\text{g g}^{-1}$ ) em 2009/2010 e de 0,08 a 12,49 (média de  $3,06 \mu\text{g g}^{-1}$ ) em 2011/2012 (Tabela 4). Os valores médios ficaram abaixo dos obtidos por Ono et al. (2006), que analisaram 24 amostras de milho (safra 1995) coletadas de cooperativas do Estado do Paraná e encontraram concentrações de fumonisinas na faixa de 0,57 a  $20,38 \mu\text{g g}^{-1}$  (média de  $6,33 \mu\text{g g}^{-1}$ ).

Moreno et al. (2009) avaliaram 150 amostras de milho recém-colhido (safra 2003) de indústrias processadoras de milho da região Norte do Estado do Paraná e encontraram níveis que variaram de 0,08 a 15,32  $\mu\text{g g}^{-1}$  (média de 2,54  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) em amostras da recepção e de 0,11 a 18,78  $\mu\text{g g}^{-1}$  (média de 3,12  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) em amostras da pré-secagem.

Os níveis médios de fumonisinas encontrados nos dois anos ficaram abaixo do limite máximo tolerado (LMT) recomendado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2011), no qual determinou que a partir de janeiro de 2014, o LMT de fumonisinas totais ( $\text{FB}_1 + \text{FB}_2$ ) em milho em grão para posterior processamento será de 5,0  $\mu\text{g g}^{-1}$ .

No ano 2009/2010, níveis médios mais elevados de fumonisinas foram detectadas nos tratamentos D0 (8,43  $\mu\text{g g}^{-1}$ ), que não recebeu nenhum fertilizante e D4 (6,19  $\mu\text{g g}^{-1}$ ), que recebeu maior dose de lixiviado (130,83  $\text{m}^3 \text{ha}^{-1}$ ). Embora as concentrações médias de fumonisinas tenham sido maiores nestes dois tratamentos, observou-se diferença significativa somente entre os tratamentos D0 e D2 pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) (Tabela 4). Por outro lado, no ano 2011/2012, maiores concentrações de fumonisinas foram detectadas nos tratamentos D1 (5,31  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) e D3 (5,61  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) e menores em D4 (1,15  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) e UR (1,21  $\mu\text{g g}^{-1}$ ). Entretanto, não foi observada diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).

Nos dois anos de avaliação, em milho adubado com lixiviado, 68,75% das amostras apresentaram concentrações de fumonisinas  $< 5,0 \mu\text{g g}^{-1}$  e 31,25%  $> 5,0 \mu\text{g g}^{-1}$ , ou seja, acima do LMT estabelecido pela legislação. No tratamento sem fertilização (D0), 50% das amostras apresentaram contaminação  $< 5,0 \mu\text{g g}^{-1}$  e 50%  $> 5,0 \mu\text{g g}^{-1}$  e no milho adubado com uréia (UR), 100% das amostras ficaram  $< 5,0 \mu\text{g g}^{-1}$  (Figura 3).

Estes resultados mostram que a ausência e/ou deficiência na fertilização pode causar aumento na contaminação por fumonisinas, em vista das concentrações encontradas nos tratamentos D0 e D1. Do mesmo modo, o tratamento que recebeu dose mais alta de lixiviado (D4) também apresentou nível elevado de fumonisinas em 2009/2010, enquanto que menores níveis foram encontrados no milho adubado com uréia na dose de 120  $\text{kg ha}^{-1}$ . A deficiência de N no solo resulta em prejuízos na qualidade e na produtividade agrônômica, mas

também pode provocar o enfraquecimento da planta, aumentando a suscetibilidade a doenças. Por outro lado, a adubação nitrogenada em excesso pode aumentar o aparecimento de lesões nas plantas e facilitar a infecção por patógenos. Blandino; Reyneri e Vanara (2008) avaliaram a influência de doses crescentes de N (0, 200 e 300 kg ha<sup>-1</sup>) sobre a incidência de podridão fúngica em espiga de milho e observaram que tanto tratamentos sem adubação (0 kg ha<sup>-1</sup>), quanto os que receberam maior dose (300 kg ha<sup>-1</sup>) apresentaram maior incidência de podridão de espiga causada por fungos. Segundo os autores, o excesso de N causa alta massa foliar que, provavelmente, influenciou nas condições microclimáticas no interior da cultura conduzindo a um menor fluxo de ar e maior umidade relativa, favorecendo a contaminação e sobrevivência de fungos.

A Tabela 5 apresenta os resultados referentes à produtividade média e à análise química de amostras de grãos de milho submetidos à fertilização com doses crescentes de lixiviado nos anos agrícolas de 2009/2010 e 2011/2012. Observou-se variabilidade entre níveis máximos e mínimos para as análises físico-químicas, sendo estas influenciadas significativamente ( $p < 0,05$ ) pelas doses de lixiviado. Segundo Paes (2006), a composição química dos grãos de milho é de 72% de carboidratos, principalmente amido, 9,5% de proteínas, 9% de fibras e 4% de lipídios.

Aplicações de lixiviado de aterro sanitário no solo, em quantidade baseada na necessidade de N da cultura, proporcionou aumentos significativos nos teores de proteínas nos grãos de milho. Este efeito foi possível porque o lixiviado de aterro sanitário apresenta elevada carga de N-amoniaco e de material orgânico estabilizado. O teor de proteínas nos grãos aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) com o incremento das doses de lixiviado nos dois anos (Tabela 5). Proteínas em grãos de milho que foram colhidos de plantas que receberam maior dose de lixiviado (D4), diferiu significativamente dos demais tratamentos com lixiviado, sendo que o teor médio obtido em D4 não apresentou diferença significativa do tratamento com fertilização mineral com ureia (UR) em ambos os anos avaliados. Em trabalho realizado por Fernández-Luqueño et al. (2010), no qual compararam o efeito da aplicação de águas residuárias e ureia, ambos em quantidades que forneceram 120 kg de N ha<sup>-1</sup> para cultura do milho, as características da planta, inclusive teor de N foliar, não foram afetadas pelo tipo de fertilização, indicando que a fonte não interferiu na absorção final do N e no crescimento das plantas.

A produtividade de grãos foi responsiva à adição de lixiviado já na primeira dose, com tratamentos com lixiviado diferindo significativamente ( $p < 0,05$ ) do controle sem fertilização (D0), em ambos os anos avaliados (Tabela 5). O acréscimo no teor de nutrientes contribuiu para um melhor desenvolvimento da cultura do milho que acabou por resultar em aumento da produtividade de grãos em resposta à adição do lixiviado, assim como no tratamento que recebeu nitrogênio mineral na forma de ureia. Dessa forma, tanto N fornecido via lixiviado, quanto fornecido via ureia, foi eficiente em praticamente dobrar a produção de grãos em relação ao controle sem fertilização. Aumentos de produtividade também foram obtidos por Prabhari et al. (2009) em milho cultivado em solos tratados com composto sólido de aterro sanitário na Tailândia, no qual obteve rendimentos até 85% superiores ao tratamento controle.

Os resultados obtidos para teor de lipídios em grãos mostram que tratamentos que receberam fertilização via lixiviado apresentaram teores significativamente maiores ( $p < 0,05$ ) em comparação ao controle sem fertilização no ano 2009/2010 (Tabela 5). Em 2011/2012, este efeito foi menos pronunciado, no qual todos os tratamentos que receberam lixiviado apresentaram teores de lipídios superiores ao tratamento sem fertilização (D0), mas somente o tratamento com ureia apresentou teor de lipídios significativamente maior ( $p < 0,05$ ) em comparação ao tratamento controle. Marsaro Júnior et al. (2007), relataram que três das cinco cultivares de milho, cultivadas em diferentes sistemas de fertilização (orgânica, mineral, orgânica e mineral combinadas), apresentaram menores médias para porcentagem de lipídios na ausência de fertilização, indicando que a disponibilidade de minerais no solo pode modificar a concentração de lipídios em grãos de milho.

Os resultados para teores de cinzas em grãos mostraram algumas diferenças entre os tratamentos, contudo, observou-se ampla variabilidade nos resultados (Tabela 5). Maiores teores de cinzas foram obtidos nos tratamentos adubados com lixiviado, em comparação à fertilização com ureia, principalmente no ano 2009/2010. Isso pode estar relacionado com maior teor de nutrientes presentes no lixiviado, além da qualidade e quantidade da matéria orgânica. O lixiviado pode apresentar maiores teores de metais totais e compostos orgânicos dissolvidos, bem como nutrientes de composição desequilibrada para o crescimento das plantas (SANG et al., 2010).

A Tabela 6 apresenta os resultados obtidos para análise dos nutrientes Magnésio (Mg), Zinco (Zn), Cálcio (Ca), Sódio (Na), Manganês (Mn) e Potássio (K) em grãos de milho nos anos agrícolas de 2009/2010 e 2011/2012. Os resultados mostram que aplicação de doses crescentes de lixiviado de aterro sanitário no solo não causou efeito quanto aos teores de metais, embora tenha ocorrido efeito significativo em alguns tratamentos. No ano 2009/2010, no qual os tratamentos receberam lixiviado do antigo aterro sanitário de Londrina - PR, as concentrações de Ca, Mg, Na e Zn nas amostras adubadas com lixiviado não diferiram ( $p > 0,05$ ) do controle sem fertilização. Ocorreram diferenças significativas entre alguns tratamentos, no entanto, não houve correlação entre a aplicação de doses crescentes de lixiviado e acúmulo de metais nos grãos.

Em 2009/2010, a concentração de Mn nos tratamentos que receberam fertilização com lixiviado diferiram do tratamento controle (D0), entretanto, não se observou diferença significativa entre tratamentos com lixiviado. Considera-se que Mn é facilmente absorvido pelas plantas quando ocorre na forma solúvel no solo, existindo uma relação direta entre teor solúvel do elemento no solo e concentração na planta (DECHEN; NACHTIGALL, 2006). Por outro lado, existe uma correlação negativa entre concentração de Mn nas plantas e aumento do pH do solo, e uma correlação positiva com teor de matéria orgânica no solo (MARSCHNER, 1995). O aumento na concentração de Mn nos grãos de milho pode estar relacionada à incorporação deste metal via lixiviado ou por alterações nas propriedades físico-químicas do solo, desencadeada pela aplicação de lixiviado ou ureia, que aumentaram a fitodisponibilidade do Mn. No ano 2009/2010, observou-se que maiores concentrações de Mn, Ca e Na foram encontrados nos tratamentos que receberam ureia (UR), indicando que a fertilização mineral teve efeito importante na absorção destes metais (Tabela 6).

No ano 2011/2012, no qual os tratamentos receberam lixiviado do aterro sanitário de Rolândia – PR, as concentrações de Ca, Mg, Zn e K em amostras adubadas com lixiviado não diferiram ( $p > 0,05$ ) do controle sem fertilização, ou seja, a aplicação de lixiviado não influenciou na fitodisponibilidade e acúmulo destes metais (Tabela 6). Contudo, maiores concentrações de Mn foram observadas nos tratamentos com lixiviado e com ureia (UR), em comparação ao tratamento controle, mostrando que a fertilização com N tem efeito positivo sobre a absorção deste nutriente. Concentrações de Na em grãos de milho no ano 2011/2012 aumentaram

com o acréscimo nas doses de lixiviado ( $p < 0,05$ ). Isto pode ser um indicativo que sódio adicionado via lixiviado contribuiu para aumentar a concentração deste elemento nos grãos.

A Tabela 7 apresenta as concentrações de Chumbo (Pb), Cobre (Cu) e Níquel (Ni) em grãos de milho nos anos agrícolas de 2009/2010 e 2011/2012. Concentrações de Cromo (Cr), Cádmio (Cd) e Arsênio (As) ficaram abaixo do limite de detecção do método utilizado. No Brasil, o limite máximo de tolerância (LMT) para metais em alimentos está regulamentado desde 1965 (BRASIL, 1965). Esses limites foram atualizados e alguns mantidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 1998). O LMT para Pb, Cu, Ni, Cd, As e Cr em alimentos são, respectivamente, 0,5; 10,0; 5,0; 1,0; 1,0 e 0,1 mg kg<sup>-1</sup>.

Aplicações de doses crescentes de lixiviado ao solo não causou efeito significativo ( $p > 0,05$ ) na acumulação de cobre nos grãos de milho nos anos agrícolas avaliados. Anjos e Mattiazzo (2000) relataram aumento linear na concentração de Cu na cultura do milho quando foram aplicadas diferentes doses de biossólidos provenientes de Estação de Tratamento de Esgotos (ETE), no qual o teor de cobre nos grãos variou de 1 a 3 mg kg<sup>-1</sup>, enquanto nas folhas variou de 13 a 22 mg kg<sup>-1</sup>. Contudo, os resultados obtidos no presente trabalho mostraram que a translocação do cobre dos tecidos das plantas para os grãos foi pequena e que a aplicação de lixiviado não produziu acúmulo deste metal nos grãos. As concentrações médias de Cu nos grãos de milho em todos os tratamentos ficaram abaixo do LMT (10 mg kg<sup>-1</sup>) para alimentos destinados ao consumo humano.

Em relação ao níquel, houve redução na concentração deste metal nos grãos com aplicação de doses crescentes de lixiviado proveniente do aterro sanitário de Londrina – PR, no qual os tratamentos D3 e D4 (ambos com 0,20 mg kg<sup>-1</sup>) apresentaram concentrações menores de Ni em comparação ao controle D0 (0,40 mg kg<sup>-1</sup>). Esse efeito também foi observado por Prabpai et al. (2009), no qual observaram que a concentração de Ni em grãos de milho cultivados em solos tratados com composto sólido de aterro sanitário apresentou concentrações significativamente menores que o controle. No ano 2011/2012, no qual o lixiviado aplicado foi proveniente do aterro de Rolândia – PR, as concentrações de Ni nos tratamentos que receberam lixiviado não diferiram significativamente do tratamento controle. Contudo, apresentaram médias superiores ao tratamento com ureia (UR).

As concentrações médias de Ni nos grãos de milho em todos os tratamentos ficaram abaixo do LMT ( $5 \text{ mg kg}^{-1}$ ).

No ano 2009/2010, aplicação de doses crescentes de lixiviado proveniente do aterro sanitário de Londrina - PR apresentou efeito significativo na concentração de chumbo nos grãos de milho ( $p < 0,05$ ). Houve tendência de aumento nas concentrações com incremento nas doses de lixiviado, sendo que o tratamento D4 ( $0,76 \text{ mg kg}^{-1}$ ) apresentou maior teor de chumbo em comparação aos demais tratamentos. Silva et al. (2003) avaliaram a disponibilidade de metais pesados em diferentes solos submetidos à fertilização com doses crescentes de composto de lixo urbano e relataram que, entre os metais avaliados, o Pb foi o elemento que mostrou incremento mais acentuado com aumento da dose de composto. Os LMT para Pb em cereais *in natura* é de  $0,50 \text{ mg kg}^{-1}$ . As amostras D1, D3 e D4 ficaram acima deste limite, sugerindo que a adição de lixiviado ao solo pode ter aumentado a concentração de Pb nos grãos, atingindo níveis preocupantes.

No ano 2011/2012, no qual o lixiviado aplicado foi proveniente do aterro de Rolândia - PR, somente o tratamento D2 ( $0,026 \text{ mg kg}^{-1}$ ) apresentou maior concentração de chumbo em comparação ao tratamento controle D0 ( $0,006 \text{ mg kg}^{-1}$ ) ( $p < 0,05$ ). No ano 2011/2012, o teor médio de Pb nas amostras de milho ficou abaixo dos LMT. Observou-se que a concentração de Pb medido em 2011/2012 foi muito menor do que observado em 2009/2010. Essa diferença pode ser atribuída a diversos fatores, tais como: pH e textura do solo, concentração e tipo de argilomineral, percentual de matéria orgânica, concentrações e tipos de cátions e ânions presentes e drenagem; que podem afetar sensivelmente a mobilidade do Pb na superfície do solo e a disponibilidade para as plantas (ZIMDAHL; SKOGERBOE, 1977).

A Tabela 8 apresenta as concentrações de Pb, Cu, Cr, Na, K, Ni e Mn do tecido foliar de aveia preta (variedade IAPAR 61), que foram cultivadas no período do inverno como cobertura do solo, antes do plantio do milho. A aveia preta também foi submetida à fertilização com doses crescentes de lixiviado, nas mesmas doses aplicadas no experimento com milho, sendo o lixiviado proveniente do aterro sanitário de Rolândia – PR.

As concentrações de Cd e As ficaram abaixo do limite de detecção do método utilizado. Houve aumento na concentração de Na nos tecidos foliares com aplicação de doses crescentes de lixiviado ( $p > 0,05$ ), principalmente da aplicação

realizada em junho/2009, uma vez que um possível efeito residual das aplicações do ano anterior é pouco esperado devido à remoção deste íon do perfil do solo por lixiviação causada por precipitações pluviais. O lixiviado aplicado no plantio de aveia apresentou alta concentração de sódio ( $2350 \text{ mg L}^{-1}$ ) em comparação ao aplicado anteriormente ( $456 \text{ mg L}^{-1}$ ) (Tabela 2), refletindo, possivelmente, na alta acumulação de Na nos tecidos foliares da aveia. O lixiviado carrega consigo alta carga orgânica e minerais dissolvidos, como N-amoniaco, K e Na, no qual, em altas concentrações no solo, podem proporcionar impactos negativos ao ambiente. A aplicação contínua de lixiviado durante um período longo de tempo pode levar a salinização do solo devido à acumulação de Na. O excesso de Na pode causar limitações no desenvolvimento das plantas, dispersão de argilas e até dispersão da matéria orgânica (LEAL et al., 2009).

Houve tendência de aumento nas concentrações de Cu e Pb com incremento nas doses de lixiviado. Maiores concentrações de Cu foram encontradas nos tratamentos D2 ( $59,67 \text{ mg kg}^{-1}$ ) e D4 ( $55,54 \text{ mg kg}^{-1}$ ) e menores nos tratamentos D1 ( $30,42 \text{ mg kg}^{-1}$ ) e no controle D0 ( $37,82 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Em relação ao Pb, maiores concentrações foram encontradas nos tratamentos D3 ( $10,03 \text{ mg kg}^{-1}$ ) e D4 ( $12,75 \text{ mg kg}^{-1}$ ), que receberam maiores doses de lixiviado e menores concentrações nos tratamentos controle D0 ( $9,66 \text{ mg kg}^{-1}$ ) e UR ( $9,63 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Para Mn, maiores concentrações foram encontradas nos tratamentos que receberam lixiviado ( $p < 0,05$ ), sendo que D3 ( $300,90 \text{ mg kg}^{-1}$ ) e D4 ( $291,45 \text{ mg kg}^{-1}$ ) apresentaram maiores médias.

A Tabela 9 apresenta as concentrações de Pb, Cu, Cr, Na, K, Ni e Mn em grãos de trigo, que foram cultivado no período do inverno como cobertura do solo, antes do plantio do milho. O trigo também foi submetido à fertilização com doses crescentes de lixiviado, nas mesmas doses que foram aplicadas no cultivo de milho, sendo que o lixiviado utilizado foi proveniente do aterro sanitário de Arapongas – PR.

As concentrações de Cd e As nos grãos de trigo ficaram abaixo do limite de detecção do método utilizado. As concentrações de metais nos tratamentos que receberam lixiviado não diferiram do controle sem fertilização ( $p > 0,05$ ). A maior concentração de Cu foi encontrada no tratamento UR ( $8,77 \text{ mg kg}^{-1}$ ), diferindo significativamente dos demais tratamentos ( $p < 0,05$ ). Esse resultado mostra que fertilização mineral na forma de ureia influenciou na absorção de Cu, que é um

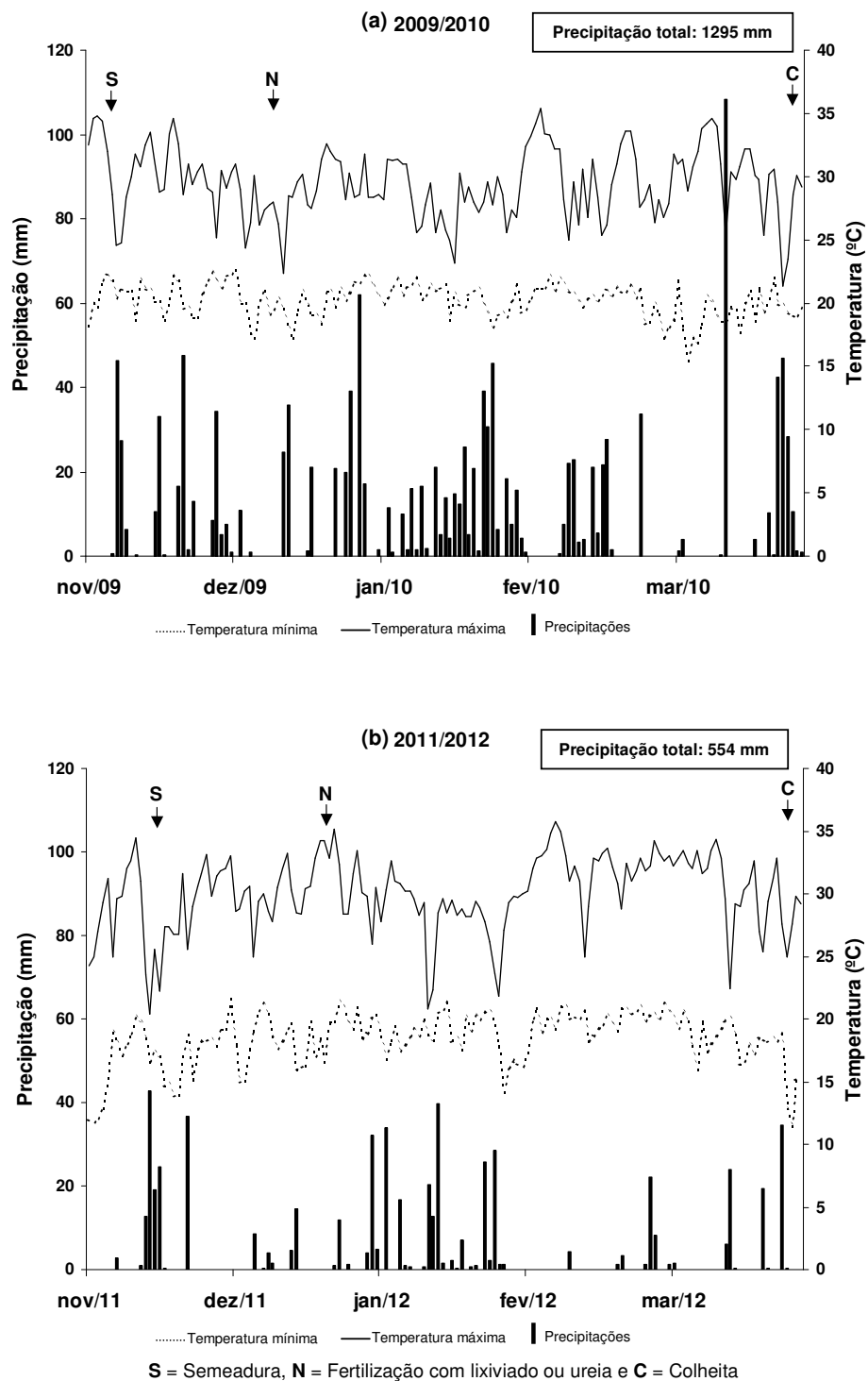
micronutriente essencial para o crescimento e desenvolvimento da planta. Isso foi possível devido à melhora nutricional da planta em relação à aplicação de nitrogênio. Para Mn, maiores concentrações foram encontradas nos tratamentos que receberam lixiviado, no qual D1 (61,60 mg kg<sup>-1</sup>) e D4 (58,54 mg kg<sup>-1</sup>) atingiram maiores médias e a menor foi observada no tratamento D0 (52,47 mg kg<sup>-1</sup>) indicando que a fertilização via lixiviado teve efeito positivo sobre a absorção deste nutriente e acumulação nos grãos de trigo.

## **CONCLUSÃO**

A aplicação de lixiviado de aterro sanitário na cultura do milho não causou efeito quanto à contaminação fúngica quando comparado à fertilização mineral e ao controle. No entanto, fumonisinas ocorreram em 100% das amostras de milho nos dois anos avaliados, com maiores concentrações detectadas no controle sem fertilização e nos tratamentos com lixiviado, no qual apresentou amostras contaminadas com níveis superiores ao limite máximo tolerado.

Os efeitos positivos da aplicação de lixiviado em relação ao teor de proteínas, lipídios e cinzas em milho, além da produtividade de grãos, sugerem seu potencial como fonte de nutrientes, sobretudo N. A aplicação de doses crescentes de lixiviado de aterro sanitário não apresentou efeito quanto à acumulação de metais em grãos de milho, exceto manganês chumbo e sódio, cujas concentrações aumentaram com aplicação de lixiviado.

**Figura 1** - Dados de temperatura e precipitação durante o período de cultivo do milho nos anos agrícolas de 2009/2010 e 2011/2012 em Londrina – PR



**Tabela 1** - Características químicas do solo (0-20 cm) antes da instalação do experimento (2008)

Atributos químicos do solo	Valores
Saturação por bases (%)	73,02
P disponível (Mehlich 1) ( $\text{mg dm}^{-3}$ )	20,4
Al ( $\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ )	0,0
H + Al ( $\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ )	3,42
Ca ( $\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ )	4,32
Mg ( $\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ )	3,29
K ( $\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ )	1,65
Soma de bases (Ca + Mg + K) ( $\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ )	9,26
Capacidade de Troca de Cátions ( $\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ )	12,68
Carbono total ( $\text{g kg}^{-1}$ )	16,2
Matéria orgânica ( $\text{g kg}^{-1}$ )	33,2
pH ( $0,01 \text{ mol L}^{-1} \text{ CaCl}_2$ )	6,0

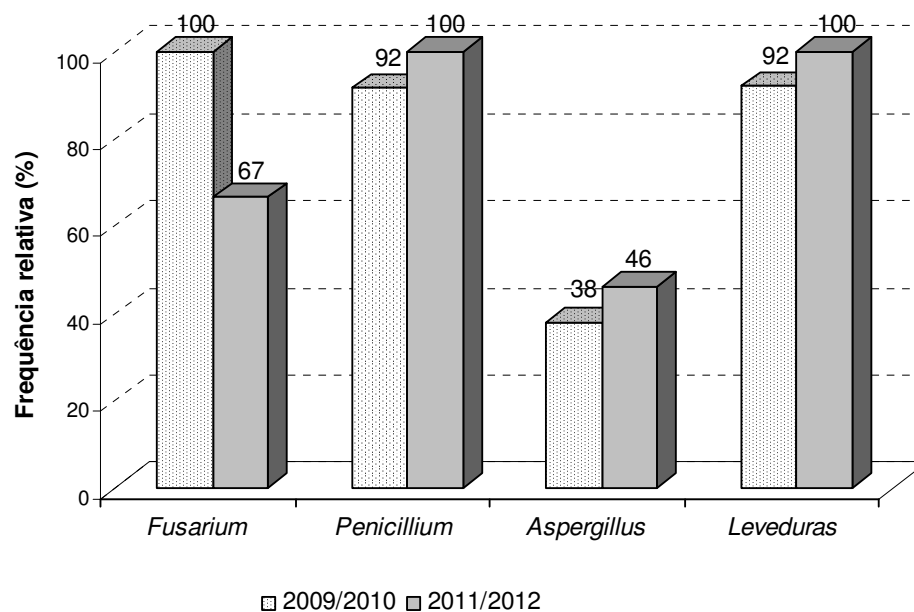
Fonte: Panchoni (2011).

**Tabela 2** – Concentração de metais e pH do lixiviado proveniente dos aterros de Londrina - PR e Rolândia - PR

Procedência do lixiviado	Londrina - PR	Rolândia - PR	Rolândia - PR
Variável/ Aplicações	6 <sup>a</sup> (dezembro/2009)	7 <sup>a</sup> (junho/2011)	8 <sup>a</sup> (dezembro/2011)
pH	7,94	8,03	7,40
Na (mg L <sup>-1</sup> )	456	2350	425
K (mg L <sup>-1</sup> )	472	1110	157
Zn (mg L <sup>-1</sup> )	1,34	1,85	0,62
Cu (µg L <sup>-1</sup> )	537	2337	290
Pb (µg L <sup>-1</sup> )	181	13,9	1,09
Cr (µg L <sup>-1</sup> )	155	766	75,5
Cd (µg L <sup>-1</sup> )	ND	0,41	0,025
Mn (µg L <sup>-1</sup> )	17,6	729	66,2

ND = não detectado

**Figura 2** - Frequência relativa dos principais gêneros fúngicos em amostras de milho (n = 48) cultivadas em solo que recebeu doses crescentes de lixiviado de aterro sanitário, uréia e controle sem fertilização, nos anos agrícolas de 2009/2010 (n = 24) e 2011/2012 (n = 24)



**Tabela 3** - Contagem de bolores e leveduras em amostras de milho cultivadas em solo que recebeu doses crescentes de lixiviado de aterro sanitário, uréia e controle sem fertilização, nos anos agrícolas de 2009/2010 (n = 24) e 2011/2012 (n = 24)

Ano	Tratamentos	Umidade (%)	<i>Aspergillus</i> spp. (UFC g <sup>-1</sup> )		<i>Fusarium</i> spp. (UFC g <sup>-1</sup> )		<i>Penicillium</i> spp. (UFC g <sup>-1</sup> )		Leveduras (UFC g <sup>-1</sup> )	
			Média	Variação	Média	Variação	Média	Variação	Média	Variação
2009/2010	D0	11,2 ± 0,76 <sup>a,A</sup>	2,5 × 10 <sup>5</sup> <sup>a,A</sup>	-	1,1 × 10 <sup>6</sup> <sup>a,B</sup>	5,6 × 10 <sup>4</sup> - 3,5 × 10 <sup>6</sup>	9,6 × 10 <sup>5</sup> <sup>a,A</sup>	1,0 × 10 <sup>4</sup> - 3,7 × 10 <sup>6</sup>	2,6 × 10 <sup>5</sup> <sup>a,A</sup>	1,0 × 10 <sup>3</sup> - 1,0 × 10 <sup>6</sup>
	D1	11,3 ± 0,50 <sup>a,A</sup>	6,1 × 10 <sup>4</sup> <sup>a,A</sup>	3,0 × 10 <sup>2</sup> - 3,0 × 10 <sup>5</sup>	7,2 × 10 <sup>5</sup> <sup>a,A</sup>	8,0 × 10 <sup>4</sup> - 1,4 × 10 <sup>6</sup>	3,1 × 10 <sup>5</sup> <sup>a,A</sup>	1,2 × 10 <sup>3</sup> - 1,2 × 10 <sup>6</sup>	3,6 × 10 <sup>4</sup> <sup>a,B</sup>	3,0 × 10 <sup>2</sup> - 1,3 × 10 <sup>5</sup>
	D2	11,3 ± 0,38 <sup>a,A</sup>	2,5 × 10 <sup>2</sup> <sup>a,B</sup>	-	3,0 × 10 <sup>4</sup> <sup>a,A</sup>	6,9 × 10 <sup>3</sup> - 6,1 × 10 <sup>4</sup>	3,4 × 10 <sup>4</sup> <sup>a,B</sup>	3,2 × 10 <sup>4</sup> - 1,5 × 10 <sup>5</sup>	3,7 × 10 <sup>4</sup> <sup>a,A</sup>	1,0 × 10 <sup>2</sup> - 1,1 × 10 <sup>5</sup>
	D3	11,3 ± 0,54 <sup>a,A</sup>	5,0 × 10 <sup>5</sup> <sup>a,A</sup>	1,3 × 10 <sup>3</sup> - 2,0 × 10 <sup>6</sup>	4,6 × 10 <sup>5</sup> <sup>a,B</sup>	7,6 × 10 <sup>3</sup> - 1,2 × 10 <sup>6</sup>	1,5 × 10 <sup>6</sup> <sup>a,A</sup>	4,0 × 10 <sup>3</sup> - 5,9 × 10 <sup>6</sup>	6,1 × 10 <sup>5</sup> <sup>a,A</sup>	2,0 × 10 <sup>2</sup> - 1,9 × 10 <sup>6</sup>
	D4	10,1 ± 0,13 <sup>a,A</sup>	2,5 × 10 <sup>1</sup> <sup>a,B</sup>	-	1,8 × 10 <sup>5</sup> <sup>a,A</sup>	7,9 × 10 <sup>4</sup> - 3,0 × 10 <sup>5</sup>	9,7 × 10 <sup>4</sup> <sup>a,B</sup>	2,0 × 10 <sup>2</sup> - 2,2 × 10 <sup>5</sup>	2,5 × 10 <sup>5</sup> <sup>a,A</sup>	6,0 × 10 <sup>2</sup> - 1,0 × 10 <sup>6</sup>
	UR	11,5 ± 0,60 <sup>a,A</sup>	4,2 × 10 <sup>4</sup> <sup>a,A</sup>	1,1 × 10 <sup>4</sup> - 1,6 × 10 <sup>5</sup>	1,1 × 10 <sup>5</sup> <sup>a,A</sup>	1,1 × 10 <sup>4</sup> - 3,5 × 10 <sup>5</sup>	2,8 × 10 <sup>6</sup> <sup>a,A</sup>	3,2 × 10 <sup>4</sup> - 9,1 × 10 <sup>6</sup>	6,5 × 10 <sup>3</sup> <sup>a,B</sup>	2,0 × 10 <sup>2</sup> - 2,4 × 10 <sup>4</sup>
	Média	11,3 ± 0,51 <sup>a,A</sup>	4,3 × 10 <sup>5</sup> <sup>A</sup>	ND - 2,0 × 10 <sup>6</sup>	9,6 × 10 <sup>5</sup> <sup>A</sup>	6,9 × 10 <sup>3</sup> - 3,5 × 10 <sup>6</sup>	2,0 × 10 <sup>5</sup> <sup>B</sup>	2,0 × 10 <sup>2</sup> - 9,1 × 10 <sup>6</sup>	6,6 × 10 <sup>4</sup> <sup>B</sup>	1,0 × 10 <sup>2</sup> - 1,9 × 10 <sup>6</sup>
2011/2012	D0	8,1 ± 0,10 <sup>a,B</sup>	1,7 × 10 <sup>4</sup> <sup>a,A</sup>	4,0 × 10 <sup>2</sup> - 5,4 × 10 <sup>4</sup>	4,4 × 10 <sup>3</sup> <sup>a,A</sup>	4,0 × 10 <sup>3</sup> - 1,4 × 10 <sup>4</sup>	3,6 × 10 <sup>6</sup> <sup>a,A</sup>	1,2 × 10 <sup>6</sup> - 6,7 × 10 <sup>6</sup>	2,4 × 10 <sup>5</sup> <sup>a,A</sup>	6,2 × 10 <sup>4</sup> - 4,2 × 10 <sup>5</sup>
	D1	8,1 ± 0,13 <sup>a,B</sup>	4,8 × 10 <sup>4</sup> <sup>a,A</sup>	-	2,2 × 10 <sup>4</sup> <sup>a,A</sup>	2,0 × 10 <sup>3</sup> - 6,8 × 10 <sup>4</sup>	5,2 × 10 <sup>6</sup> <sup>a,A</sup>	5,3 × 10 <sup>4</sup> - 1,1 × 10 <sup>7</sup>	6,1 × 10 <sup>5</sup> <sup>a,A</sup>	1,7 × 10 <sup>5</sup> - 1,0 × 10 <sup>6</sup>
	D2	8,0 ± 0,07 <sup>a,B</sup>	1,5 × 10 <sup>5</sup> <sup>a,A</sup>	5,0 × 10 <sup>2</sup> - 2,1 × 10 <sup>5</sup>	3,2 × 10 <sup>5</sup> <sup>a,A</sup>	6,4 × 10 <sup>4</sup> - 1,1 × 10 <sup>6</sup>	1,5 × 10 <sup>6</sup> <sup>a,A</sup>	4,3 × 10 <sup>5</sup> - 3,1 × 10 <sup>6</sup>	4,0 × 10 <sup>5</sup> <sup>a,B</sup>	5,3 × 10 <sup>4</sup> - 9,5 × 10 <sup>5</sup>
	D3	8,1 ± 0,06 <sup>a,B</sup>	3,0 × 10 <sup>5</sup> <sup>a,A</sup>	5,0 × 10 <sup>3</sup> - 1,1 × 10 <sup>6</sup>	1,0 × 10 <sup>4</sup> <sup>a,A</sup>	3,0 × 10 <sup>2</sup> - 2,2 × 10 <sup>5</sup>	3,6 × 10 <sup>6</sup> <sup>a,A</sup>	4,8 × 10 <sup>4</sup> - 1,2 × 10 <sup>7</sup>	4,6 × 10 <sup>5</sup> <sup>a,A</sup>	3,0 × 10 <sup>4</sup> - 9,3 × 10 <sup>5</sup>
	D4	8,5 ± 0,12 <sup>a,B</sup>	7,2 × 10 <sup>4</sup> <sup>a,A</sup>	6,0 × 10 <sup>2</sup> - 1,0 × 10 <sup>6</sup>	5,9 × 10 <sup>4</sup> <sup>a,A</sup>	4,0 × 10 <sup>3</sup> - 1,4 × 10 <sup>4</sup>	1,6 × 10 <sup>7</sup> <sup>a,A</sup>	2,9 × 10 <sup>4</sup> - 6,0 × 10 <sup>7</sup>	1,0 × 10 <sup>6</sup> <sup>a,A</sup>	4,0 × 10 <sup>4</sup> - 3,4 × 10 <sup>6</sup>
	UR	8,2 ± 0,14 <sup>a,B</sup>	1,2 × 10 <sup>5</sup> <sup>a,A</sup>	-	7,2 × 10 <sup>4</sup> <sup>a,A</sup>	1,8 × 10 <sup>3</sup> - 2,6 × 10 <sup>5</sup>	6,3 × 10 <sup>6</sup> <sup>a,A</sup>	1,1 × 10 <sup>6</sup> - 1,1 × 10 <sup>7</sup>	9,7 × 10 <sup>5</sup> <sup>a,A</sup>	1,1 × 10 <sup>4</sup> - 3,5 × 10 <sup>6</sup>
	Média	8,2 ± 0,97 <sup>a,B</sup>	1,2 × 10 <sup>5</sup> <sup>B</sup>	ND - 1,1 × 10 <sup>6</sup>	8,1 × 10 <sup>4</sup> <sup>B</sup>	3,0 × 10 <sup>2</sup> - 1,1 × 10 <sup>6</sup>	6,3 × 10 <sup>6</sup> <sup>A</sup>	2,9 × 10 <sup>4</sup> - 6,0 × 10 <sup>7</sup>	6,3 × 10 <sup>5</sup> <sup>A</sup>	1,1 × 10 <sup>4</sup> - 3,5 × 10 <sup>6</sup>

Média seguida pela mesma letra minúscula na vertical, dentro de cada ano para comparação entre as doses de N, não apresenta diferença estatística pelo teste de Tukey 5%.

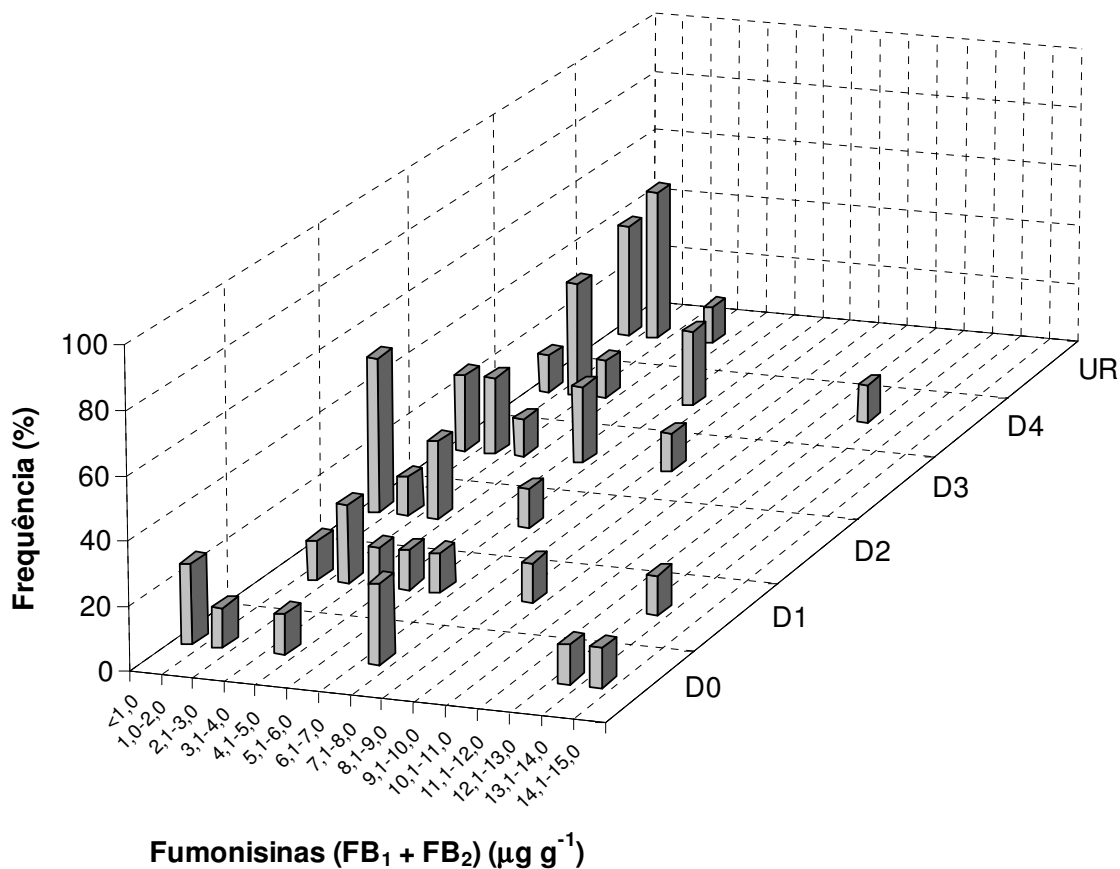
Média seguida pela mesma letra maiúscula na vertical, para comparação entre os anos, não apresenta diferença estatística pelo teste de Tukey 5%.  
D0 = controle sem lixiviado; D1 = 32,71 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup>; D2 = 65,42 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup>; D3 = 98,13 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup>; D4 = 130,83 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup>; UR = 120 kg ha<sup>-1</sup> de N na forma de ureia.

**Tabela 4** - Contaminação por fumonisinas em grãos de milho cultivado em solo que recebeu doses crescentes de lixiviado de aterro sanitário, uréia e controle sem fertilização, nos anos agrícolas de 2009/2010 (n = 24) e 2011/2012 (n = 24)

Ano agrícola	Tratamentos	Fumonisinas (FB <sub>1</sub> + FB <sub>2</sub> ) (µg g <sup>-1</sup> )	Faixa
2009/2010	D0	8,43 <sup>a</sup>	1,09 – 12,59
	D1	5,06 <sup>a,b</sup>	2,93 – 8,55
	D2	0,82 <sup>b</sup>	0,34 – 2,27
	D3	1,98 <sup>a,b</sup>	0,08 – 4,36
	D4	6,19 <sup>a,b</sup>	2,19 – 11,65
	UR	1,62 <sup>a,b</sup>	0,86 – 3,93
	Média	4,02	0,08 – 13,07
2011/2012	D0	2,71 <sup>a</sup>	0,09 – 13,70
	D1	5,31 <sup>a</sup>	2,47 – 12,49
	D2	2,38 <sup>a</sup>	1,03 – 5,47
	D3	5,61 <sup>a</sup>	1,56 – 9,12
	D4	1,15 <sup>a</sup>	0,17 – 1,71
	UR	1,21 <sup>a</sup>	0,08 – 1,76
	Média	3,06	0,08 – 13,70

Média seguida pela mesma letra minúscula na vertical não apresenta diferença estatística pelo teste de Tukey 5%. D0 = controle sem lixiviado; D1 = 32,71 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup>; D2 = 65,42 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup>; D3 = 98,13 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup>; D4 = 130,83 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup>; UR = 120 kg ha<sup>-1</sup> de N na forma de ureia.

**Figura 3** – Distribuição dos níveis de fumonisinas totais ( $FB_1 + FB_2$ ) em grãos de milho ( $n = 48$ ) cultivados em solo que recebeu doses crescentes de lixiviado de aterro sanitário, uréia e controle sem fertilização, nos anos agrícolas de 2009/2010 e 2011/2012



D0 = controle sem lixiviado; D1 = 32,71 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup>; D2 = 65,42 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup>; D3 = 98,13 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup>; D4 = 130,83 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup>; UR = 120 kg ha<sup>-1</sup> de N na forma de ureia.

**Tabela 5** - Composição físico-química e produtividade em grãos de milho cultivadas em solo que recebeu doses crescentes de lixiviado de aterro sanitário, uréia e controle sem fertilização, nos anos agrícolas de 2009/2010 (n = 24) e 2011/2012 (n = 24)

Ano agrícola	Tratamentos	Cinzas* (%)	Proteínas* (%)	Lipídios* (%)	Grãos (kg ha <sup>-1</sup> )
2009/2010	D0	1,41 ± 0,06 <sup>ab</sup>	6,38 ± 0,64 <sup>d</sup>	4,91 ± 0,53 <sup>a</sup>	4703,1 <sup>b</sup>
	D1	1,49 ± 0,17 <sup>ab</sup>	7,06 ± 0,63 <sup>b</sup>	7,71 ± 2,25 <sup>b</sup>	7179,7 <sup>a</sup>
	D2	1,63 ± 0,11 <sup>a</sup>	7,14 ± 0,30 <sup>ac</sup>	6,09 ± 0,48 <sup>b</sup>	8281,3 <sup>a</sup>
	D3	1,45 ± 0,02 <sup>ab</sup>	7,32 ± 0,30 <sup>bc</sup>	6,02 ± 1,27 <sup>b</sup>	7994,8 <sup>a</sup>
	D4	1,50 ± 0,10 <sup>ab</sup>	8,05 ± 0,31 <sup>a</sup>	7,09 ± 1,22 <sup>b</sup>	8807,3 <sup>a</sup>
	UR	1,33 ± 0,10 <sup>b</sup>	8,21 ± 0,35 <sup>a</sup>	7,01 ± 2,68 <sup>b</sup>	8726,6 <sup>a</sup>
2011/2012	D0	1,43 ± 0,08 <sup>a</sup>	7,21 ± 0,27 <sup>b</sup>	5,88 ± 0,62 <sup>b</sup>	3340,0 <sup>b</sup>
	D1	1,38 ± 0,06 <sup>ab</sup>	7,35 ± 0,28 <sup>b</sup>	6,50 ± 0,28 <sup>ab</sup>	5169,6 <sup>ab</sup>
	D2	1,23 ± 0,12 <sup>c</sup>	7,33 ± 0,41 <sup>b</sup>	6,28 ± 0,71 <sup>b</sup>	6871,3 <sup>ab</sup>
	D3	1,24 ± 0,06 <sup>bc</sup>	7,47 ± 0,27 <sup>b</sup>	6,65 ± 0,93 <sup>ab</sup>	7637,7 <sup>a</sup>
	D4	1,20 ± 0,08 <sup>c</sup>	7,97 ± 0,31 <sup>a</sup>	7,52 ± 1,67 <sup>ab</sup>	8936,7 <sup>a</sup>
	UR	1,17 ± 0,12 <sup>c</sup>	8,22 ± 0,25 <sup>a</sup>	8,58 ± 2,34 <sup>a</sup>	8362,5 <sup>a</sup>

Média seguida pela mesma letra minúscula na vertical, dentro de cada ano, não apresenta diferença estatística pelo teste de Tukey 5%. D0 = controle sem lixiviado; D1 = 32,71 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup>; D2 = 65,42 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup>; D3 = 98,13 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup>; D4 = 130,83 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup>; UR = 120 kg ha<sup>-1</sup> de N na forma de ureia.

\*Expresso em porcentagem na matéria seca.

**Tabela 6** - Concentrações de metais em grãos de milho cultivadas em solo que recebeu doses crescentes de lixiviado de aterro sanitário, uréia e controle sem fertilização, nos anos agrícolas de 2009/2010 (n = 24) e 2011/2012 (n = 24)

Ano agrícola	Tratamentos	Médias por tratamentos (mg kg <sup>-1</sup> )					
		Mg	Zn	Ca	Na	Mn	K
2009/2010	D0	171,66 ± 66,19 <sup>a</sup>	32,57 ± 1,69 <sup>a,b</sup>	35,71 ± 4,49 <sup>b</sup>	135,00 ± 25,14 <sup>b</sup>	6,04 ± 0,48 <sup>c</sup>	5403,1 ± 515,4 <sup>a,b</sup>
	D1	106,18 ± 20,88 <sup>a</sup>	32,88 ± 4,60 <sup>a,b</sup>	37,73 ± 3,41 <sup>a,b</sup>	144,69 ± 14,33 <sup>b</sup>	9,08 ± 0,85 <sup>b</sup>	4421,4 ± 460,6 <sup>c</sup>
	D2	119,03 ± 71,69 <sup>a</sup>	34,06 ± 2,37 <sup>a</sup>	33,48 ± 3,10 <sup>b</sup>	153,18 ± 22,50 <sup>a,b</sup>	9,03 ± 2,13 <sup>b</sup>	6029,6 ± 467,4 <sup>a</sup>
	D3	114,89 ± 59,18 <sup>a</sup>	30,54 ± 3,82 <sup>a,b</sup>	35,96 ± 5,33 <sup>b</sup>	133,68 ± 17,82 <sup>b</sup>	8,05 ± 1,03 <sup>b</sup>	4133,0 ± 185,7 <sup>c</sup>
	D4	109,33 ± 26,40 <sup>a</sup>	31,40 ± 3,83 <sup>a,b</sup>	33,96 ± 1,63 <sup>b</sup>	126,44 ± 16,69 <sup>b</sup>	9,16 ± 0,38 <sup>b</sup>	4523,5 ± 163,6 <sup>c</sup>
	UR	123,66 ± 48,28 <sup>a</sup>	28,31 ± 1,05 <sup>b</sup>	42,72 ± 4,33 <sup>a</sup>	182,94 ± 23,89 <sup>a</sup>	10,90 ± 1,68 <sup>a</sup>	5301,5 ± 648,4 <sup>b</sup>
2011/2012	D0	98,10 ± 4,83 <sup>a</sup>	17,27 ± 2,47 <sup>a,b</sup>	23,73 ± 9,07 <sup>a</sup>	139,86 ± 9,78 <sup>a,b</sup>	7,72 ± 0,64 <sup>b</sup>	4041,9 ± 273,2 <sup>a</sup>
	D1	99,28 ± 11,06 <sup>a</sup>	22,00 ± 1,75 <sup>a</sup>	38,07 ± 16,73 <sup>a</sup>	99,03 ± 14,66 <sup>c</sup>	8,19 ± 0,72 <sup>a,b</sup>	3361,2 ± 261,5 <sup>a</sup>
	D2	92,35 ± 3,00 <sup>a</sup>	20,22 ± 1,74 <sup>a,b</sup>	32,44 ± 3,92 <sup>a</sup>	106,35 ± 20,80 <sup>c</sup>	8,24 ± 0,71 <sup>a,b</sup>	3224,8 ± 494,8 <sup>a</sup>
	D3	90,09 ± 3,51 <sup>a</sup>	20,28 ± 2,68 <sup>a,b</sup>	31,52 ± 11,90 <sup>a</sup>	117,82 ± 19,67 <sup>b,c</sup>	8,30 ± 0,77 <sup>a,b</sup>	3582,5 ± 774,8 <sup>a</sup>
	D4	92,20 ± 2,09 <sup>a</sup>	17,77 ± 1,28 <sup>b</sup>	30,05 ± 8,72 <sup>a</sup>	143,83 ± 12,51 <sup>a</sup>	8,44 ± 0,53 <sup>a,b</sup>	3598,1 ± 260,1 <sup>a</sup>
	UR	93,14 ± 3,64 <sup>a</sup>	13,31 ± 3,05 <sup>c</sup>	26,20 ± 10,57 <sup>a</sup>	145,56 ± 6,18 <sup>a</sup>	8,81 ± 1,06 <sup>a</sup>	2823,1 ± 331,8 <sup>a</sup>

Média seguida pela mesma letra minúscula na vertical, dentro de cada ano, não apresenta diferença estatística pelo teste de Duncan 5%. D0 = controle sem lixiviado; D1 = 32,71 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup>; D2 = 65,42 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup>; D3 = 98,13 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup>; D4 = 130,83 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup>; UR = 120 kg ha<sup>-1</sup> de N na forma de ureia.

**Tabela 7** - Concentrações de metais pesados em grãos de milho cultivadas em solo que recebeu doses crescentes de lixiviado de aterro sanitário, uréia e controle sem fertilização, nos anos agrícolas de 2009/2010 (n = 24) e 2011/2012 (n = 24)

Ano agrícola	Tratamentos	Metais pesados (mg kg <sup>-1</sup> )		
		Cu	Ni	Pb
2009/2010	D0	2,34 ± 0,65 <sup>a</sup>	0,41 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,47 ± 0,20 <sup>b</sup>
	D1	1,83 ± 0,30 <sup>a</sup>	0,29 ± 0,11 <sup>a,b</sup>	0,49 ± 0,23 <sup>b</sup>
	D2	1,97 ± 0,23 <sup>a</sup>	0,31 ± 0,13 <sup>a,b</sup>	0,47 ± 0,15 <sup>b</sup>
	D3	2,10 ± 0,55 <sup>a</sup>	0,20 ± 0,04 <sup>b</sup>	0,62 ± 0,17 <sup>a,b</sup>
	D4	1,81 ± 0,24 <sup>a</sup>	0,20 ± 0,04 <sup>b</sup>	0,76 ± 0,28 <sup>a</sup>
	UR	2,25 ± 0,66 <sup>a</sup>	0,40 ± 0,16 <sup>a</sup>	0,48 ± 0,25 <sup>b</sup>
2011/2012	D0	3,28 ± 0,41 <sup>a</sup>	0,41 ± 0,06 <sup>a,b</sup>	0,006 ± 0,007 <sup>b</sup>
	D1	3,30 ± 0,36 <sup>a</sup>	0,43 ± 0,11 <sup>a</sup>	0,014 ± 0,007 <sup>a,b</sup>
	D2	3,72 ± 0,36 <sup>a</sup>	0,40 ± 0,13 <sup>a,b,c</sup>	0,026 ± 0,025 <sup>a</sup>
	D3	3,71 ± 0,52 <sup>a</sup>	0,38 ± 0,04 <sup>a,b,c</sup>	0,006 ± 0,004 <sup>b</sup>
	D4	3,69 ± 0,68 <sup>a</sup>	0,36 ± 0,04 <sup>b,c</sup>	0,016 ± 0,008 <sup>a,b</sup>
	UR	3,85 ± 0,67 <sup>a</sup>	0,34 ± 0,16 <sup>c</sup>	0,005 ± 0,006 <sup>b</sup>

Média seguida pela mesma letra minúscula na vertical, dentro de cada ano, não apresenta diferença estatística pelo teste de Duncan 5%. D0 = controle sem lixiviado; D1 = 32,71 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup>; D2 = 65,42 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup>; D3 = 98,13 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup>; D4 = 130,83 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup>; UR = 120 kg ha<sup>-1</sup> de N na forma de ureia.

**Tabela 8** - Concentrações de metais no tecido foliar de plantas de aveia (n = 24) cultivadas em solo que recebeu doses crescentes de lixiviado de aterro sanitário, uréia e controle sem fertilização (2011)

Tratamentos	Médias por tratamento (mg kg <sup>-1</sup> )						
	Cu	Ni	Pb	Na	K	Cr	Mn
D0	37,82 ± 22,90 <sup>a,b</sup>	3,63 ± 0,29 <sup>a,b</sup>	9,66 ± 2,81 <sup>a</sup>	141,77 ± 33,2 <sup>a</sup>	10236,8 ± 1601,2 <sup>a</sup>	3,73 ± 0,09 <sup>a,b</sup>	233,76 ± 22,52 <sup>a,b</sup>
D1	30,42 ± 5,01 <sup>b</sup>	4,29 ± 0,58 <sup>a</sup>	9,37 ± 0,87 <sup>a</sup>	1228,8 ± 265,8 <sup>b</sup>	9194,6 ± 1347,2 <sup>a</sup>	3,38 ± 0,44 <sup>a,b</sup>	247,82 ± 36,71 <sup>a,b</sup>
D2	59,67 ± 11,30 <sup>a</sup>	3,48 ± 0,87 <sup>a,b</sup>	9,80 ± 1,56 <sup>a</sup>	1549,7 ± 357,5 <sup>b</sup>	9488,3 ± 1720,4 <sup>a</sup>	3,76 ± 0,30 <sup>a,b</sup>	247,38 ± 54,31 <sup>a,b</sup>
D3	42,85 ± 13,13 <sup>a,b</sup>	3,31 ± 0,76 <sup>a,b</sup>	10,03 ± 2,10 <sup>a</sup>	1136,2 ± 370,6 <sup>b</sup>	10206,1 ± 1621,0 <sup>a</sup>	3,05 ± 0,79 <sup>b</sup>	300,90 ± 69,60 <sup>a</sup>
D4	55,54 ± 17,62 <sup>a</sup>	2,82 ± 0,72 <sup>b</sup>	12,75 ± 2,75 <sup>a</sup>	1361,8 ± 295,3 <sup>b</sup>	7523,4 ± 409,8 <sup>a</sup>	2,88 ± 0,95 <sup>b</sup>	291,45 ± 69,15 <sup>a,b</sup>
UR	37,92 ± 4,09 <sup>a,b</sup>	3,46 ± 0,28 <sup>a,b</sup>	9,63 ± 1,66 <sup>a</sup>	149,40 ± 21,8 <sup>a</sup>	10562,9 ± 3092,3 <sup>a</sup>	4,19 ± 0,31 <sup>a</sup>	210,12 ± 29,24 <sup>b</sup>

Média seguida pela mesma letra minúscula na vertical não apresenta diferença estatística pelo teste de Duncan 5%. D0 = controle sem lixiviado; D1 = 32,71 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup>; D2 = 65,42 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup>; D3 = 98,13 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup>; D4 = 130,83 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup>; UR = 120 kg ha<sup>-1</sup> de N na forma de ureia.

**Tabela 9** - Concentrações de metais em grãos de trigo (n = 24) cultivado em solo que recebeu doses crescentes de lixiviado de aterro sanitário, uréia e controle sem fertilização (2012)

Tratamentos	Médias por tratamento (mg kg <sup>-1</sup> )						
	Cu	Ni	Pb	Na	K	Cr	Mn
D0	6,54 ± 0,48 <sup>b</sup>	0,33 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,01 ± 0,02 <sup>a</sup>	59,87 ± 0,06 <sup>a</sup>	4627,5 ± 182,7 <sup>a</sup>	0,95 ± 0,55 <sup>a</sup>	52,47 ± 5,95 <sup>b</sup>
D1	7,55 ± 0,22 <sup>b</sup>	0,28 ± 0,10 <sup>a</sup>	0,06 ± 0,10 <sup>a</sup>	71,95 ± 18,8 <sup>a</sup>	5195,8 ± 319,7 <sup>a</sup>	0,88 ± 0,23 <sup>a</sup>	61,60 ± 2,74 <sup>a</sup>
D2	6,94 ± 0,41 <sup>b</sup>	0,24 ± 0,16 <sup>a</sup>	0,13 ± 0,16 <sup>a</sup>	57,18 ± 4,90 <sup>a</sup>	5087,2 ± 89,5 <sup>a</sup>	0,55 ± 0,11 <sup>a</sup>	54,21 ± 6,33 <sup>a,b</sup>
D3	7,54 ± 0,90 <sup>b</sup>	0,33 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,05 ± 0,06 <sup>a</sup>	69,81 ± 21,5 <sup>a</sup>	5157,4 ± 315,2 <sup>a</sup>	0,73 ± 0,31 <sup>a</sup>	55,21 ± 1,55 <sup>a,b</sup>
D4	7,38 ± 0,72 <sup>b</sup>	0,32 ± 0,10 <sup>a</sup>	0,05 ± 0,10 <sup>a</sup>	72,27 ± 15,1 <sup>a</sup>	5443,3 ± 240,5 <sup>a</sup>	0,97 ± 0,97 <sup>a</sup>	58,54 ± 3,58 <sup>a,b</sup>
UR	8,77 ± 0,43 <sup>a</sup>	0,30 ± 0,14 <sup>a</sup>	0,09 ± 0,14 <sup>a</sup>	57,08 ± 5,11 <sup>a</sup>	5320,1 ± 175,8 <sup>a</sup>	1,29 ± 0,53 <sup>a</sup>	52,68 ± 4,04 <sup>b</sup>

Média seguida pela mesma letra minúscula na vertical não apresenta diferença estatística pelo teste de Duncan 5%. D0 = controle sem lixiviado; D1 = 32,71 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup>; D2 = 65,42 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup>; D3 = 98,13 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup>; D4 = 130,83 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup>; UR = 120 kg ha<sup>-1</sup> de N na forma de ureia.

## 6 ARTIGO 2: EFEITO DE DOSES DE NITROGÊNIO EM COBERTURA E DENSIDADE DE PLANTAS EM ESPAÇAMENTO REDUZIDO NA CONTAMINAÇÃO POR FUMONISINA E PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DE GRÃOS DE MILHO

### RESUMO

A alta produtividade de milho tem sido um dos principais objetivos dos países produtores de alimentos no mundo globalizado, no qual a manutenção da qualidade de matérias-primas, bem como a segurança deve ser o tópico em preocupação. Os efeitos do manejo de campo orientados para densidade de plantas e adubação nitrogenada foram avaliados em relação à composição físico-química e qualidade sanitária em grãos de milho de primeira safra sob espaçamento reduzido. O experimento foi instalado no município de Mauá da Serra – PR, em dois anos agrícolas (2009/2010 e 2010/2011). Foram avaliadas quatro populações de plantas (60, 75, 90 e 105 mil plantas ha<sup>-1</sup>) e cinco doses de nitrogênio (0, 60, 120, 180 e 240 kg ha<sup>-1</sup>). O delineamento experimental foi em blocos com parcelas subdivididas com quatro repetições, o fator população foi alocado na parcela principal e a adubação nitrogenada de cobertura na subparcela. Amostras de milho foram frequentemente contaminadas com fungos potencialmente micotoxigênicos, no qual *Fusarium* spp. foi detectado em 97,5% (2009/2010) e 93,5% (2010/2011) das amostras e *Penicillium* spp. em 93,7% (2009/2010) e 100% (2010/2011). O gênero *Aspergillus* spp. obteve menor frequência, sendo detectado em 2,5% (2009/2010) e 7,8% (2010/2011). As diferentes doses de N em cobertura e densidade de plantas não exerceram efeito significativo ( $p > 0,05$ ) na contaminação fúngica. Fumonisinas totais (FB<sub>1</sub> + FB<sub>2</sub>) foram detectadas em milho com níveis variando de não detectado a 7,80 µg g<sup>-1</sup> (média de 1,50 µg g<sup>-1</sup>) no ano 2009/2010 e de não detectado a 23,36 µg g<sup>-1</sup> (média de 1,72 µg g<sup>-1</sup>) em 2010/2011. Observou-se tendência de aumento na contaminação por fumonisinas com incremento na densidade de plantas, no qual detectou-se amostras contaminadas com níveis superiores ao limite máximo tolerado recomendado pela ANVISA (5,0 µg g<sup>-1</sup>). Fumonisinas não teve correlação significativa ( $p > 0,05$ ) com teor de proteínas, amido e cinzas em grãos. Os teores de proteínas e cinzas aumentaram com incremento de doses de N em cobertura, com respostas diferenciadas em função do ano de avaliação e, diminuíram pelo incremento de densidade de plantas em todas as doses de N em cobertura. O teor de amido em grãos aumentou com incremento de densidade de plantas e diminuiu pelo incremento de doses de N em cobertura.

**Palavras-chave:** milho, densidade de plantas, doses de nitrogênio, fumonisinas.

## EFFECT DOSES OF NITROGEN AND PLANT DENSITY UNDER REDUCED SPACING ABOUT FUMONISIN CONTAMINATION AND PHYSICO-CHEMICAL PARAMETERS ON GRAIN CORN

### ABSTRACT

The high productivity of corn has been one of the main goals intended for food producing country in the globalized world, where the maintenance of raw material quality, as well as the safety should be the topic in concern. Effect of field-oriented management of plant density and nitrogen fertilization were evaluated for physico-chemical composition and sanitary quality grain corn first crop under reduced spacing. The experiment was installed in Northern region, Paraná State, Brasil, in two growing seasons (2009/2010 and 2010/2011). We evaluated four plant populations (60, 75, 90 and 105 thousand plants ha<sup>-1</sup>) and five levels of nitrogen (0, 60, 120, 180 and 240 kg ha<sup>-1</sup>). Experimental design was split plot in blocks with four replications, the population factor was allocated in the main plots and nitrogen applied as subplots. The corn samples were frequently contaminated with fungi potentially mycotoxigenic, where *Fusarium* spp. was detected in 97.5% (2009/2010) and 93.5% (2010/2011) of samples and *Penicillium* spp. in 93.7% (2009/2010) and 100% (2010/2011). *Aspergillus* spp. obtained less frequently, being detected in 2.5% (2009/2010) and 7.8% (2010/2011). Different rates of nitrogen topdressing and plant density did not have significant effect ( $p > 0.05$ ) in fungal contamination in corn grain. Total fumonisins (FB<sub>1</sub> + FB<sub>2</sub>) were detected in corn with levels ranging from undetected to 7.80 µg g<sup>-1</sup> (mean of 1.50 µg g<sup>-1</sup>) in year 2009/2010 and undetected to 23.36 µg g<sup>-1</sup> (mean of 1.72 µg g<sup>-1</sup>) in 2010/2011. Observed upward trend in fumonisin contamination with increasing plant density, whereupon was detected samples contaminated with levels above the maximum tolerated by Brazilian legislation (5.0 µg g<sup>-1</sup>). Fumonisin had no significant correlation ( $p > 0.05$ ) with content protein, starch and ash. Content protein and ash increased with increasing doses of N topdressing with different responses depending on the year of assessment and decreased by increasing plant density in all rates of N topdressing. Starch content in grain increased with increasing plant density and decreased by the increase of N topdressing.

**Keywords:** maize, plant densities, doses of nitrogen, fumonisins.

## INTRODUÇÃO

Para expressar todo seu potencial produtivo, a cultura do milho necessita que suas exigências nutricionais sejam plenamente atendidas, porquanto remove grandes quantidades de nitrogênio do solo e usualmente requer uso de adubação nitrogenada em cobertura para complementar a quantidade suprida pelo solo. O nitrogênio (N) destaca-se como importante macronutriente atuando na composição de moléculas de proteínas, enzimas, coenzimas, ácidos nucleicos e citocromos. Além disso, N é um dos nutrientes mais relevantes para aumento de produtividade e qualidade do produto, influenciando no teor de proteínas em grãos de milho (COELHO, 2006; BÜLL, 1993; FERREIRA et al., 2001).

O fornecimento de doses adequadas de nutrientes para cultura do milho é fundamental para o desenvolvimento da planta, uma vez que a deficiência ou excesso de nutrientes pode provocar a contaminação por fungos toxigênicos e, conseqüentemente, desencadear a produção de micotoxinas. O excesso de N provoca o crescimento vegetativo prolongado da planta, tornando as folhas mais expostas a agentes patogênicos, com parede celular mais fina e vulnerável à penetração fúngica. Por outro lado, plantas de milho expostas a estresse de fertilidade também são mais suscetíveis à infecção por fungos toxigênicos (HASSEGAWA et al., 2008; REID; ZHU; MA, 2001; BLANDINO; REYNERI; VANARA, 2008).

Entre os fungos micotoxigênicos da cadeia produtiva de milho, *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg (= *Fusarium moniliforme* Sheldon, teleomorfo *Giberella moniliforme*, sinônimo *Giberella fujikuroi*) destaca-se na pós-colheita e nas imediações da fase de pré-secagem, pela produção de fumonisinas, metabólitos secundários promotores de câncer em seres humanos e responsável pelo desencadeamento de intoxicação aguda em animais (SEIFERT et al., 2003; BEZUIDENHOUT et al., 1988). Diversos fatores podem influenciar a produção de fumonisinas em milho na fase de pré-colheita, tais como: época de plantio e colheita; temperatura, umidade, híbridos resistentes, danos causados por insetos, manejo de culturas, etc. A contaminação ocorre principalmente no campo durante a última parte do período de crescimento e é favorecida por temperaturas amenas e alta umidade do ar, sob tais condições climáticas *F. verticillioides* é capaz de infectar grãos de milho em 100% (DOOHAN; BRENNAN; COOKE, 2003; LOGRIECO et al., 2002).

A densidade de plantio, definida como o número de plantas por unidade de área, tem papel importante no rendimento de uma lavoura de milho, uma vez que pequenas variações na densidade têm grande influência no rendimento final da cultura. A adequada combinação entre a escolha da população de plantas e do híbrido é um dos fatores que contribuem para o aumento da produtividade do milho (CRUZ et al., 2006). O uso de altas populações aumenta a competição intraespecífica por luz, água e nutrientes. Isto pode ser prejudicial ao rendimento final porque reduz a expansão da área foliar e o aparecimento de folhas na planta, ao mesmo tempo, diminui o número de espigas por planta e grãos estabelecidos por espiga. Dessa forma, o fornecimento de nutrientes, principalmente nitrogênio, também deve ser incrementado, com vistas à manutenção de produtividade e qualidade dos grãos (BOS; VOS; STRUIK, 2000; SANGOI; SALVADOR, 1997). Alta população de plantas pode ser um fator relevante para ocorrência de doenças em milho como podridão do colmo e da espiga, produzindo grãos ardidos e consequente produção de micotoxinas. Maior número de plantas impõem restrições à atividade fotossintética das folhas, isto induz o colmo a redirecionar fotoassimilados em maior quantidade ao enchimento de grãos, fragilizando-os e predispondo a ocorrência de podridões. Além disso, população de plantas em demasia pode aumentar a umidade, além de causar estresse por falta de nutrientes em plantas individuais de milho, aumentando a suscetibilidade para fungos produtores de micotoxinas (DENTI et al., 2001; TRENTO; IRGANG; REIS, 2002; SANGOI et al., 2000; BRUNS, 2003).

Poucos estudos têm sido realizados sobre a influência da densidade de plantas sobre a contaminação de grãos de milho por micotoxinas. Blandino; Reyneri e Vanara (2007) relataram que a ocorrência natural de fumonisinas em milho foi maior em áreas densamente cultivadas na Itália. Rodriguez-del-Bosque (1996), em trabalho realizado no nordeste do México, relatou incremento na contaminação por aflatoxinas em grãos de milho com aumento na densidade de plantas de 55 mil para 75 mil plantas  $ha^{-1}$ .

Diante disso, no presente trabalho foi avaliado o efeito da densidade de plantas sob espaçamento reduzido e diferentes níveis de adubação nitrogenada em cobertura sobre a contaminação fúngica, produção de fumonisina e qualidade de grãos de milho, com ênfase no teor de proteínas, amido e cinzas.

## EXPERIMENTAL

### *Localização e caracterização da área experimental*

O experimento foi conduzido na mesma área em dois anos agrícolas, 2009/2010 e 2010/2011, na Fazenda Panônia, situada no município de Mauá da Serra, Estado do Paraná, o qual se encontra a 23°58' latitude Sul, 51°19' longitude Oeste de Greenwich, com altitude de 950 m (Figura 1). O solo do local é caracterizado como Latossolo Vermelho distroférico (LVdf) (EMBRAPA, 2006). O clima da região, segundo a classificação de Köppen, é Cfb, ou seja, clima temperado propriamente dito, temperatura média no mês mais frio abaixo de 18 °C (mesotérmico), com verões frescos, temperatura média no mês mais quente abaixo de 22 °C e sem estação seca definida (IAPAR, 2012).

Os dados meteorológicos de precipitação nos anos agrícolas de 2009/2010 e 2010/2011 foram coletados no Instituto de Águas do Paraná em Marilândia do Sul – PR, localizada a 15 Km da área experimental e os dados de temperatura pelas médias históricas (1979 a 1992) da estação do Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR) em Mauá da Serra - PR (Figuras 2a e 2b).

### *Delineamento experimental*

Foram testadas quatro populações de plantas, 60, 75, 90 e 105 mil plantas ha<sup>-1</sup> com cinco doses de nitrogênio em cobertura, 0, 60, 120, 180 e 240 kg ha<sup>-1</sup>, com espaçamento reduzido entre linhas. O delineamento experimental foi em blocos com parcelas subdivididas com quatro repetições, sendo o fator população alocado na parcela e a adubação nitrogenada de cobertura na subparcela. A subparcela experimental foi constituída por seis linhas de cinco metros de comprimento, com espaçamento entre linhas fixo de 0,70 m. A área útil de cada parcela experimental foram as duas linhas centrais, totalizando 7 m<sup>2</sup>.

### *Amostras*

Foram utilizados grãos de milho do híbrido DKB240YG, um híbrido transgênico com tecnologia Yieldgard® para controle de lagarta do cartucho (*Spodoptera frugiperda*), lagarta da espiga (*Helicoverpa zea*) e Broca do colmo (*Diatraea saccharalis*). Possui ciclo precoce com altura e inserção de espiga baixa, folhas semi-eretas, resistente ao acamamento e ótima qualidade de colmo,

recomendado para 70-75 mil plantas ha<sup>-1</sup>. Segundo o fornecedor, o híbrido produz espigas com excelente empalhamento e tolerância a grãos ardidos (DEKALB, 2011).

#### *Procedimento operacional*

A área experimental foi manejada no sistema de plantio direto. No ano agrícola de 2009/2010, o experimento foi instalado após a cultura do trigo, precedido da cultura do soja no verão anterior e, no ano agrícola de 2010/2011, foi instalado após a cultura do trigo, precedido de milho no verão anterior. Antes da instalação do experimento, foram coletadas amostras de solo da área experimental nas camadas de 0 a 0,2 m, no qual as características químicas estão apresentadas na Tabela 1. A adubação com nitrogênio, fósforo e potássio (NPK) na semeadura foi realizada com 22 kg de N ha<sup>-1</sup>, 104,4 kg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> ha<sup>-1</sup> e 62 kg K<sub>2</sub>O ha<sup>-1</sup>, na forma de sulfato de amônio, superfosfato simples e cloreto de potássio.

Anteriormente à semeadura, as sementes foram tratadas com fungicida Maxim<sup>®</sup> (Fludioxonil + Metalaxyl-m), na dose 0,0375 g + 0,015 g do ingrediente ativo por kg de semente e com inseticida imidacloprido + thiodicarbe, na dose de 52,5 g + 157,5 g do ingrediente ativo para 60 mil sementes. Foi realizada semeadura direta, com uma semeadora adubadora, dispondo-se duas sementes por cova. No estágio V2 com duas folhas expandidas, conforme escala proposta por Ritchie e Hanway (1993), foi feito desbaste, deixando-se apenas uma planta por cova e obtendo-se a população igual à pré-estabelecida nos tratamentos. A adubação nitrogenada de cobertura foi realizada no estágio V3 a V4, ou seja, com plantas apresentando de três a quatro folhas expandidas. A fonte utilizada foi nitrato de amônio (32% de N), aplicado em cobertura na superfície do solo nas quatro linhas centrais da subparcela.

Quando os grãos apresentaram aproximadamente 20% de umidade foram colhidas oito espigas de cada parcela, de maneira aleatória e estas foram higienizadas externamente com etanol 70%. Posteriormente, procedeu-se retirada da palha e debulhamento. As amostras foram secas em estufa a 50 °C por 24 horas e armazenadas a 4 °C até o momento do uso. Os grãos foram triturados por assepticamente até granulometria de 50 *mesh*, evitando contaminação das amostras. Os grãos triturados foram acondicionados em sacos plásticos a -18 °C até o momento das análises.

### *Avaliação da microbiota fúngica*

A metodologia utilizada está descrita no item 4.2.3. Os gêneros fúngicos foram identificados de acordo com Nelson, Toussoun e Marasas (1983) e Samson, Hoeskstra e Frisvad (1996).

### *Determinação de fumonisinas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)*

A extração e quantificação de fumonisinas por CLAE foram realizadas de acordo com a metodologia descrita por Shephard et al. (1990), modificada por Ueno et al. (1993) (itens 4.2.2 e 4.2.3).

### *Análises físico-químicas*

O teor de proteínas em grãos de milho foi determinado pelo método de Kjeldahl (AOAC, 1995) (item 4.2.5). O teor de cinzas foi determinado mediante pesagem de resíduos de incineração (IAL, 1985) (item 4.2.6). A extração de amido disponível foi realizada segundo AOAC (1995), modificado por Walter; Silva; Perdomo (2005). Após a extração e hidrólise do amido, foi utilizada a metodologia proposta por Nelson (1944) modificado por Somogyi (1945) para quantificação da glicose, sendo realizada a leitura em espectrofotômetro a 505 nm (item 4.2.7). A determinação de umidade dos grãos de milho foi feita pelo método de secagem a 105 °C (IAL, 2008) (item 4.2.9). A determinação de atividade de água em grãos de milho foi realizada por meio de leitura em equipamento Aqualab® (item 4.2.10).

### *Análise estatística*

Os resultados obtidos foram avaliados por análise de variância seguida por teste de comparação múltipla de Tukey a 95% de confiança. A correlação de Pearson foi aplicada para as variáveis dependentes e independentes e analisada pelo teste-t. As análises estatísticas foram realizadas no programa *Statistica*, versão 7.0 (Stat Soft, Inc., Estados Unidos) e por SISVAR (FERREIRA, 2011).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A Figura 3 mostra a frequência relativa dos principais gêneros fúngicos em amostras de milho do campo experimental, nos anos agrícolas de 2009/2010 (n

= 80) e 2010/2011 (n = 80) submetidos a quatro populações de plantas e cinco doses de N. *Fusarium* spp. foi detectado em 97,5% (2009/2010) e 93,5% (2010/2011) das amostras, *Penicillium* spp. em 93,7% (2009/2010) e 100% (2010/2011) e leveduras em 97,5% (2009/2010) e 81,8% (2010/2011). O gênero *Aspergillus* spp. obteve menor frequência, sendo detectado em 2,5% (2009/2010) e 7,8% (2010/2011). Estes resultados estão de acordo com obtidos por Ono et al. (2006) que detectaram *Fusarium* spp. (100%) e *Penicillium* spp. (91,6%) em milho recém-colhido (n = 24) na região Norte do Estado do Paraná. Moreno et al. (2009) avaliaram 150 amostras de milho recém-colhido (safra 2003) da mesma região e *Fusarium* foi predominante com 100% de detecção, seguido por *Penicillium* com 97,3%. Apesar de *Aspergillus* e *Penicillium* serem classificados como fungos de armazenamento, com base em estudos realizados em climas temperados, sob clima subtropical ou tropical quente e úmido, estas espécies podem infectar grãos ainda no campo (CHRISTENSEN; SAUER, 1982; WILSON; ABRAMSON, 1992).

A Tabela 2 apresenta os resultados obtidos na contagem de *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. e leveduras em grãos de milho, em função das diferentes doses de N em cobertura e densidade de plantas nos anos 2009/2010 e 2010/2011. *Fusarium* spp. foi detectado na média de  $10^5$  unidade formadora de colônia por grama de amostra (UFC g<sup>-1</sup>) em todos os tratamentos no ano 2009/2010. No ano 2010/2011, *Fusarium* spp. foi detectado na média de  $10^4$  a  $10^5$ , sendo que a incidência deste fungo foi menor do que observado no ano 2009/2010. *Aspergillus* spp. foi detectado somente em duas amostras no ano 2009/2010, obtendo menores níveis de contaminação em comparação com 2010/2011. Marín et al. (1998) sugeriram a existência de uma correlação negativa entre *Fusarium* spp. e *Aspergillus* spp. quando são co-contaminantes em milho. Isso pode explicar o fato de *Aspergillus* ter alcançado uma frequência maior (7,8%) no ano 2010/2011, quando a ocorrência de *Fusarium* foi menor (93,5%) (Figura 3). *Penicillium* spp. foi encontrado na média de  $10^5$  a  $10^6$  UFC g<sup>-1</sup> nos dois anos avaliados. Leveduras foram detectadas com médias de  $10^5$  UFC g<sup>-1</sup> em todas as doses de N no ano 2009/2010 e observou-se uma redução no ano 2010/2011 sendo detectado com médias de  $10^3$  e  $10^5$  UFC g<sup>-1</sup>. Os resultados estão de acordo com dados apresentados por Ono et al. (1999), no qual obtiveram contagem de *Fusarium* de  $10^3$  a  $10^6$  e *Penicillium* de  $10^3$  a  $10^6$  UFC g<sup>-1</sup> em amostras de milho (n = 37) da região Norte do Estado do Paraná.

As diferentes doses de N em cobertura não exerceram efeito significativo ( $p > 0,05$ ) quanto à contaminação natural dos grãos de milho por fungos. Este resultado está de acordo com obtidos por Hassegawa et al. (2008) que avaliaram o efeito de diferentes doses de N (0, 50 e 100 kg ha<sup>-1</sup>), zinco (0, 0,5 e 1,0 kg ha<sup>-1</sup>) e boro (0 e 5,0 kg ha<sup>-1</sup>) na contaminação fúngica e fumonisinas em amostras de milho no ano 2000 e relataram que doses de N não exerceram efeito significativo quanto à contaminação por *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. Plantas expostas ao estresse por falta de nutrientes podem ficar suscetíveis ao desenvolvimento de doenças, por outro lado, o excesso de adubação pode levar a um crescimento vegetativo prolongado, deixando a planta mais exposta ao ataque de patógenos. Blandino, Reyneri e Vanara (2008) avaliaram a influência de doses crescentes de N (0, 200 e 300 kg ha<sup>-1</sup>) sobre a incidência de podridão fúngica em espiga de milho e observaram que tanto tratamentos sem adubação (0 kg ha<sup>-1</sup>), quanto os que receberam maior dose (300 kg ha<sup>-1</sup>) apresentaram maior incidência de podridão de espiga causada por fungos.

O aumento da população de plantas por ha<sup>-1</sup> não causou efeito significativo quanto à contaminação natural dos grãos de milho por fungos. Este resultado difere dos obtidos por Trento, Irgang e Reis (2002) que avaliaram o efeito da densidade em milho cultivado em sistema de rotação de cultura e monocultura em Passo Fundo, Estado do Rio Grande do Sul, e relataram que a incidência de grãos ardidos foi maior à medida que se aumentou a densidade de plantas para os dois sistemas. Similarmente, Sangoi et al. (2000) avaliaram milho produzido em Lages, Santa Catarina (safra 1998) e relataram que o aumento da densidade de plantas elevou a incidência de doenças no colmo causadas por *F. verticillioides*, *Colletotrichum graminicola* e *Diplodia maydis*.

Na Tabela 3 são apresentados os dados de correlação entre as variáveis independentes (dose de N e densidade de plantas) e as respostas obtidas nas diferentes características avaliadas (contaminação fúngica, fumonisinas, umidade, atividade de água (Aa), amido, cinzas e proteínas em grãos de milho) nos anos 2009/2010 e 2010/2011. A contaminação por *Fusarium* spp. apresentou correlação significativa positiva com umidade dos grãos, enquanto que *Penicillium* spp. apresentou correlação negativa ( $p < 0,05$ ). Fungos de campo, como *F. verticillioides*, invadem grãos no estágio de pré-colheita ou espigas na pós-colheita, antes do debulhamento. Este grupo requer alto teor de umidade (20 a 22%). Por

outro lado, fungos de armazenagem, requerem teor de umidade na faixa de 16% para invasão micelial e compreendem espécies pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* (WATSON; RAMSTAD, 1987). *Fusarium* spp. apresentou correlação significativa positiva com atividade de água ( $p < 0,05$ ). De acordo com Samapundo et al. (2005), em condições experimentais, um aumento na atividade de água e/ou temperatura aumenta a taxa de crescimento de *F. verticillioides*. Espécies do gênero *Fusarium* dominam sobre outros fungos em atividade de água alta (0,95), enquanto que em atividade de água mais baixa (0,80) espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* se tornam mais competitivos (REYNERI, 2006).

A contaminação por fumonisinas não apresentou correlação significativa ( $p > 0,05$ ) com dose de N em cobertura. Este resultado difere dos obtidos por Blandino; Reyneri; Vanara (2008), no qual observaram uma diminuição das concentrações de FB<sub>1</sub> em grãos de milho com uso de doses crescentes de N (0, 200 e 300 kg ha<sup>-1</sup>). A relação entre a aplicação de diferentes doses de adubação nitrogenada e o risco de contaminação por fumonisinas é difícil de definir devido ao fato que diversos outros fatores podem influenciar, tais como sistema de manejo do solo, tempo de plantio, condições climáticas e tipo de híbrido.

Não houve correlação significativa entre níveis de fumonisinas e teores de proteínas e amido em grãos ( $p > 0,05$ ). Ono et al. (2006) avaliaram a contaminação por fumonisinas em 109 amostras de milho recém-colhido do Estado do Paraná e não encontraram correlação entre fumonisinas e teores de proteínas em grãos. Shelby et al. (1994) analisaram níveis de contaminação por fumonisinas em 15 híbridos comerciais de milho em 17 locais nos Estados Unidos e verificaram que características como proteínas, lipídios, amido e fibras totais dos grãos não foram correlacionados com a contaminação por fumonisinas.

A Tabela 4 apresenta os valores médios de contaminação por fumonisinas totais (FB<sub>1</sub> + FB<sub>2</sub>) em grãos de milho em função de doses de N em cobertura e densidade de plantas, com comparação entre os anos agrícolas. Não houve diferença significativa entre os tratamentos, nos dois anos de avaliação ( $p > 0,05$ ). Contudo, observou-se tendência de aumento na contaminação com incremento na densidade de plantas. Os resultados mostram que a contaminação por fumonisinas apresentou comportamento quadrático com aumento nas concentrações em função do incremento da densidade de plantas até o valor máximo de 86 mil plantas ha<sup>-1</sup> no ano 2009/2010 e 90 mil plantas ha<sup>-1</sup> em 2010/2011

(Figura 4). Blandino; Reyneri; Vanara (2007) analisaram o efeito da densidade de plantas sobre a contaminação de milho por FB<sub>1</sub> de 2001 a 2004 na Itália e relataram que, com exceção de 2003, a ocorrência de FB<sub>1</sub> foi significativamente maior em grãos produzidos em áreas densamente cultivadas.

A Figura 5 apresenta a distribuição dos níveis de fumonisinas em milho considerando os dois anos de avaliação. Na densidade de 60 mil plantas ha<sup>-1</sup>, 100% das amostras apresentaram níveis de fumonisinas < 5,0 µg g<sup>-1</sup>. Na densidade de 90 mil plantas ha<sup>-1</sup>, 13% apresentaram concentrações > 5,0 µg g<sup>-1</sup> e, em 75 e 105 mil plantas ha<sup>-1</sup>, 8% ficaram > 5,0 µg g<sup>-1</sup>. Estes resultados mostram que com o aumento na densidade de plantas ha<sup>-1</sup>, ocorreu uma elevação na frequência de amostras com concentrações de fumonisinas acima do limite máximo tolerado, estabelecido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária para milho em grão, que é de 5,0 µg g<sup>-1</sup> (BRASIL, 2011).

Fumonisinás foram detectadas em 97,5% (2009/2010) e 93,4% (2010/2011) das amostras. No ano 2009/2010, fumonisinas variaram de não detectado a 7,80 µg g<sup>-1</sup> (média de 1,48 µg g<sup>-1</sup>) e, em 2010/2011, variaram de não detectado a 23,36 µg g<sup>-1</sup> (média de 1,74 µg g<sup>-1</sup>). Os resultados estão de acordo com Moreno et al. (2009), que analisaram a contaminação natural de 90 amostras de milho coletadas na etapa de recepção de indústrias processadoras de grãos da região Norte do Estado do Paraná (safra 2004) e detectaram fumonisinas em 98,9% das amostras, com níveis variando de 0,07 a 18,16 µg g<sup>-1</sup> (média de 1,31 µg g<sup>-1</sup>).

As concentrações relativamente baixas de fumonisinas podem estar relacionadas ao híbrido transgênico utilizado (DKB240YG) que possui características diferentes dos híbridos comumente utilizados, no qual apresentam menor número de folhas, folhas mais eretas e menor área foliar. Isso permite o plantio adensado, ou seja, o espaçamento reduzido entrelinhas, explorando as interações ambientais e agronômicas, que possibilita também o aumento da densidade de plantas (SEMENTES AGROCERES, 2012). A arquitetura dos híbridos modernos interfere na quantidade de luz que penetra no dossel, minimizando a competição entre as plantas, que contribui para maior tolerância às condições de alta densidade de plantas (SANGOI et al., 2001). Híbridos com maior capacidade fotossintética são mais resistentes a doenças, uma vez que, a eficiência no uso da radiação interceptada na fotossíntese converte o carbono orgânico em fotoassimilados, propiciando melhor distribuição nas diferentes demandas, refletindo não só na

produtividade, mas também na suscetibilidade a doenças de colmo, com consequente contaminação das espigas e grãos (SANGOI et al., 2002). Além disso, a baixa contaminação por fumonisina detectada nas amostras pode estar associada a outras características do híbrido utilizado, tais como, melhor empalhamento da espiga, maior tolerância a grãos ardidos e inclinação natural da espiga na maturação, características que têm sido priorizadas pelos programas de melhoramento genético de cultivares.

A utilização de híbridos com baixa suscetibilidade à infecção por *Fusarium* spp., que conduz à acumulação de fumonisinas em grãos de milho, é o método de prevenção mais eficiente para diminuir o risco de contaminação (PASCALE et al., 1997). Outro fator importante é que o híbrido utilizado possui tecnologia para controle da lagarta do cartucho (*Spodoptera frugiperda*), lagarta da espiga (*Helicoverpa zea*) e broca do colmo (*Diatraea saccharalis*), que são pragas que podem atuar como vetores para penetração de fungos, como *F. verticillioides*, por exemplo. A seleção de genótipos de cereais resistentes a doenças causadas por *Fusarium* é uma opção importante que merece atenção com relação ao futuro do controle da contaminação de grãos por micotoxinas (PLACINTA; D'MELLO; MACDONALD, 1999).

Doses de N em cobertura apresentaram correlação significativa positiva ( $p < 0,05$ ) com teores de proteínas, ou seja, houve uma relação proporcional entre doses de N e teor de proteínas nos grãos de milho. Porém, níveis de proteínas apresentaram correlação significativa negativa ( $p < 0,05$ ) com densidade de plantas, ou seja, quanto maior número de plantas  $ha^{-1}$ , menores níveis de proteínas. No ano 2009/2010, houve aumento linear no teor de proteínas nos grãos nas densidades de 60 e 90 mil plantas  $ha^{-1}$  com incremento nas doses de N em cobertura. Nas densidades de 75 e 105 mil plantas  $ha^{-1}$  houve ajuste quadrático até o ponto máximo de 240 kg de N  $ha^{-1}$  (Figura 6a). No ano 2010/2011, todas as densidades de plantas apresentaram comportamento quadrático em função do incremento nas doses de N, com máxima resposta em 180 kg de N para densidade de 60 mil plantas  $ha^{-1}$  e 240 kg de N para as demais densidades (Figura 6b).

Este comportamento está de acordo com os obtidos por Ferreira et al. (2001), no qual relataram que doses de N aplicadas entre 0 e 210 kg  $ha^{-1}$ , aumentaram o teor de proteínas em grãos de milho, passando de 75 para 105 g  $kg^{-1}$ . A adubação nitrogenada influencia não só a produtividade, mas também a qualidade

do produto em consequência do teor de proteínas nos grãos de milho. O nitrogênio absorvido pelas plantas combina com esqueletos carbônicos para produção de aminoácidos, os quais resultam em proteínas que ficam armazenadas nos tecidos vegetais e, por ocasião da fase de enchimento de grãos, estas reservas são translocadas e armazenadas nestes órgãos, na forma de proteínas e aminoácidos (MARSCHNER, 1995). Tsai et al. (1983) sugeriram que a concentração de proteínas em grãos de milho aumenta com o suprimento de nitrogênio devido à deposição preferencial da zeína sobre as proteínas do endosperma.

Com relação ao comportamento das doses de N em cobertura em resposta a densidade de plantas, no ano 2009/2010, na dose de 240 kg de N, o teor de proteínas ajustou-se a uma equação linear decrescente conforme aumento na densidade de plantas (Figura 6c). Para as doses de 0, 120 e 180 kg de N ha<sup>-1</sup> houve comportamento quadrático com ponto de mínima em 99, 85 e 78 mil plantas ha<sup>-1</sup>, respectivamente. A dose de 60 kg de N ha<sup>-1</sup> se ajustou a uma equação quadrática, contudo com ponto de máxima em 63,8 mil plantas ha<sup>-1</sup>. No ano 2010/2011, as doses de 0, 60, 120 e 180 kg de N ha<sup>-1</sup> apresentaram ajuste quadrático com redução do teor de proteínas até os pontos mínimos de 88, 92, 95 e 105 mil plantas ha<sup>-1</sup>, respectivamente. A dose de 240 kg de N ha<sup>-1</sup> também houve comportamento quadrático, entretanto com ponto de máxima em 63,4 mil plantas ha<sup>-1</sup> (Figura 6c).

A redução no teor de proteínas nos grãos de milho com o aumento na população de plantas pode ser explicado pelo fato da densidade de plantas afetar o balanço nutricional nos diferentes órgãos da planta. Isso ocorre devido a maior competição entre indivíduos por água, luz e nutrientes, reduzindo a disponibilidade de fotoassimilados para atender a demanda para enchimento do grão e manutenção das demais estruturas da planta, conseqüentemente, diminui-se a síntese e acúmulo de proteínas nos grãos (SANGOI; SALVADOR, 1997).

Comparando os dois anos agrícolas avaliados, observou-se que teores de proteínas em grãos foram maiores no ano 2010/2011 (Tabela 5). Este comportamento se deve, provavelmente, às condições climáticas, visto que no ano 2009/2010, o volume de chuvas após aplicação de N em cobertura foram em torno de 150 mm, maior que em 2010/2011, que foi de aproximadamente 30 mm (Figuras 2a e 2b). Altas precipitações após aplicação de N em cobertura, dependendo da fonte de fertilizante utilizado, pode afetar a disponibilidade do nutriente na solução do solo, devido à lixiviação do NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. A lixiviação diminui sensivelmente a quantidade

de amônio e nitrato na camada arável, conseqüentemente reduz a disponibilidade do nutriente para as plantas (KIEHL, 1987). Deste modo, no ano de 2009/2010 pode ter ocorrido maior perda de N por lixiviação, reduzindo o efeito do nutriente em relação aos teores de proteínas nos grãos.

Na Tabela 3 é possível verificar que doses de N em cobertura apresentaram correlação significativa negativa ( $p < 0,05$ ) com teor de amido, ou seja, quanto maior a dose de N menor teor de amido nos grãos de milho. Porém, o teor de amido apresentou correlação significativa positiva com densidade de plantas, ou seja, quanto maior número de plantas  $ha^{-1}$ , maior teor de amido. No ano de 2009/2010, na densidade de 75 mil plantas  $ha^{-1}$ , o teor de amido ajustou-se à equação linear decrescente com aumento nas doses de N em cobertura. A densidade de 60 mil plantas  $ha^{-1}$  teve ajuste quadrático até o ponto mínimo de 120  $kg\ ha^{-1}$  e para 90 e 105 mil plantas  $ha^{-1}$ , ajuste quadrático com redução do teor de amido até o ponto mínimo de 240  $kg\ de\ N\ ha^{-1}$  (Figura 7a). Por outro lado, no ano 2010/2011, o comportamento da densidade de plantas em relação às doses de N em cobertura apresentou repostas variadas. Nas densidades de 60 e 105 mil plantas obteve-se comportamento quadrático com redução do teor de amido até os pontos mínimos de 180 e 240  $kg\ de\ N\ ha^{-1}$ . Para as densidades de 75 e 90 mil plantas  $ha^{-1}$ , ocorreram comportamento quadrático com ponto de máximo em 101 e 180  $kg\ de\ N\ ha^{-1}$ , respectivamente (Figura 7b).

A redução no teor de amido dos grãos de milho com incremento das doses de N são similares a estudos que demonstram que deficiência de nitrogênio, muitas vezes resulta na acumulação de carboidratos não-estruturais em plantas (ONO; TERASHIMA; WATANABE, 1996; ONO; WATANABE, 1997; PAUL; DRISCOLL, 1997). Deficiência de N pode levar a acumulação de açúcar pela diminuição da procura de esqueletos de carbono para síntese de aminoácidos e proteínas (WINGLER et al., 2006). As interações carbono/nitrogênio desempenham papel importante na regulação da senescência foliar. Teores de açúcares e nitrogênio mostram mudanças distintas durante a senescência foliar, com açúcares se acumulando, enquanto aminoácidos entram em declínio (MASCLAUX et al., 2000; DIAZ et al., 2005). O incremento nas doses de N pode provocar o crescimento vegetativo prolongado da planta, atrasando a senescência foliar e, por conseqüência, ocorre menor acúmulo de carboidratos nos grãos.

Considerando o comportamento das doses de N em cobertura em resposta a densidade de plantas, no ano 2009/2010, as doses de 0, 60, 120 e 180 kg de N ha<sup>-1</sup> apresentaram crescimento linear no teor de amido em grãos com aumento na densidade de plantas (Figura 7c). A dose de 240 kg de N ha<sup>-1</sup> obteve ajuste quadrático com reposta mínima em 84 mil planta ha<sup>-1</sup>. No ano 2010/2011 foi observado uma ampla variabilidade nos resultados, no qual a dose de 0 kg de N ha<sup>-1</sup> obteve ajuste quadrático com ponto mínimo em 81 mil plantas ha<sup>-1</sup>. A dose de 60 kg de N ha<sup>-1</sup> obteve crescimento linear até 105 mil plantas ha<sup>-1</sup>. Para doses de 120, 180 e 240 kg de N ha<sup>-1</sup>, obteve-se ajuste quadrático com respostas máximas em 87, 102 e 105 mil plantas ha<sup>-1</sup>, respectivamente (Figura 7d).

O aumento dos teores de amido com a maior densidade populacional pode estar relacionada com a menor quantidade de luz que penetra no dossel, aumentando a competição entre as plantas, minimizando a atividade fotossintética pós-antese. Como consequência, há menor produção de grãos por espiga, porém, com maior teor de carboidratos, em vista da distribuição deste entre os grãos. Ciampitti e Vyn (2011) estudaram densidades de plantas de 54, 79 e 104 mil plantas ha<sup>-1</sup>, observaram que as menores densidades populacionais de milho resultaram em maior número de grãos por espiga.

Comparando os dois anos agrícolas, constatou-se que teores de amido em grãos foram em média maiores no ano 2009/2010 (Tabela 5). O possível processo de lixiviação de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, causado pelo alto volume de chuva após aplicação do N em cobertura no ano 2009/2010, reduziu a disponibilidade do nutriente para as plantas, acarretando menores níveis de proteínas e, por consequência, maiores níveis de amido em grãos. Segundo Stitt e Krapp (1999), o acúmulo de amido é uma resposta passiva à diminuição das taxas de crescimento e o resultante acúmulo de açúcares em plantas com falta de nutrientes

Conforme mostra a Tabela 3, o teor de cinzas em grãos apresentou correlação negativa com densidade de plantas nos dois anos de avaliação. No ano 2009/2010, as doses de 60 e 180 kg de N ha<sup>-1</sup> apresentaram redução linear nos teores de cinzas com incremento na densidade de plantas. Para doses de 0 e 120 kg de N ha<sup>-1</sup> houve ajuste quadrático com redução nas cinzas até densidades de 98 e 100 mil plantas ha<sup>-1</sup>, enquanto que a dose de 240 kg de N ha<sup>-1</sup> atingiu máxima resposta em 78 mil plantas ha<sup>-1</sup> (Figura 8a). Em 2010/2011, a dose de 0 kg de N ha<sup>-1</sup> ajustou-se a uma equação linear decrescente com incremento na densidade de

plantas. As demais doses apresentaram, de um modo geral, comportamento quadrático com redução no teor de cinzas até densidades entre 86 e 93 mil plantas  $\text{ha}^{-1}$  (Figura 8b). A redução no teor de cinzas em grãos de milho com aumento na densidade de plantas pode estar relacionado com a competição entre as plantas pela captação de nutrientes e água no solo, acarretando menor absorção de minerais pelas raízes e menor acúmulo destes nos grãos.

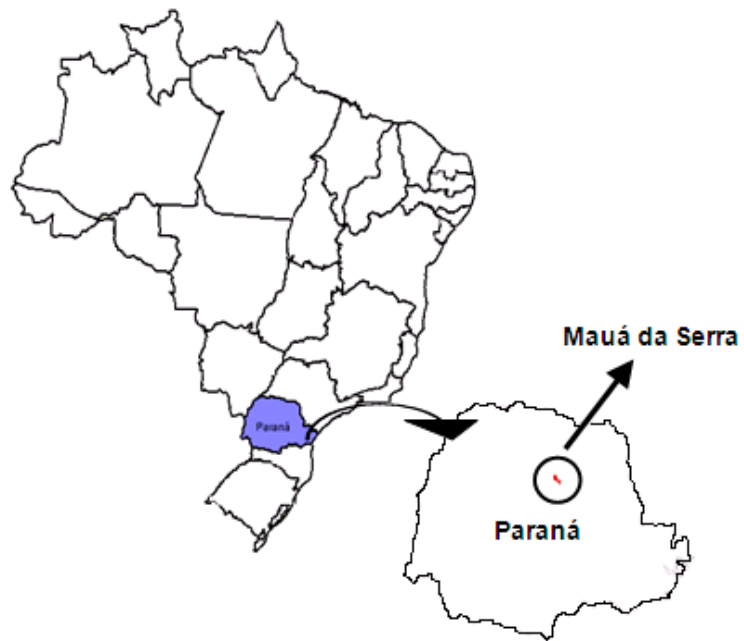
Comparando os dois anos agrícolas, o teor de cinzas nas menores doses de N em cobertura (0 e 60  $\text{kg ha}^{-1}$ ) no ano de 2010/2011 foram significativamente maiores do que em 2009/2010 ( $p < 0,05$ ). Para doses maiores (120, 180 e 240  $\text{kg de N ha}^{-1}$ ) não houve diferença significativa entre os anos (Tabela 7). Este efeito ocorreu, provavelmente, devido a melhor distribuição de chuvas no ano 2010/2011 (Figura 2a). No ano 2009/2010, com o processo de lixiviação devido ao alto volume de chuva após aplicação do N em cobertura, a cultura respondeu conforme o incremento das doses de N, minimizando a diferença entre os anos para maiores doses e diferenciando os valores para menores doses de N em cobertura. Este comportamento pode ser explicado pelo fato da adição de N ao solo aumentar a absorção de macro e micronutrientes e a translocação e acúmulo destes nos grãos. Ferreira et al. (2001) avaliaram os efeitos da adubação com N, Mo e Zn e sugeriram que o incremento das doses de N proporcionou, aos grãos de milho, ganhos expressivos nos teores de proteínas, enxofre, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, zinco, cobre, manganês e ferro.

## CONCLUSÃO

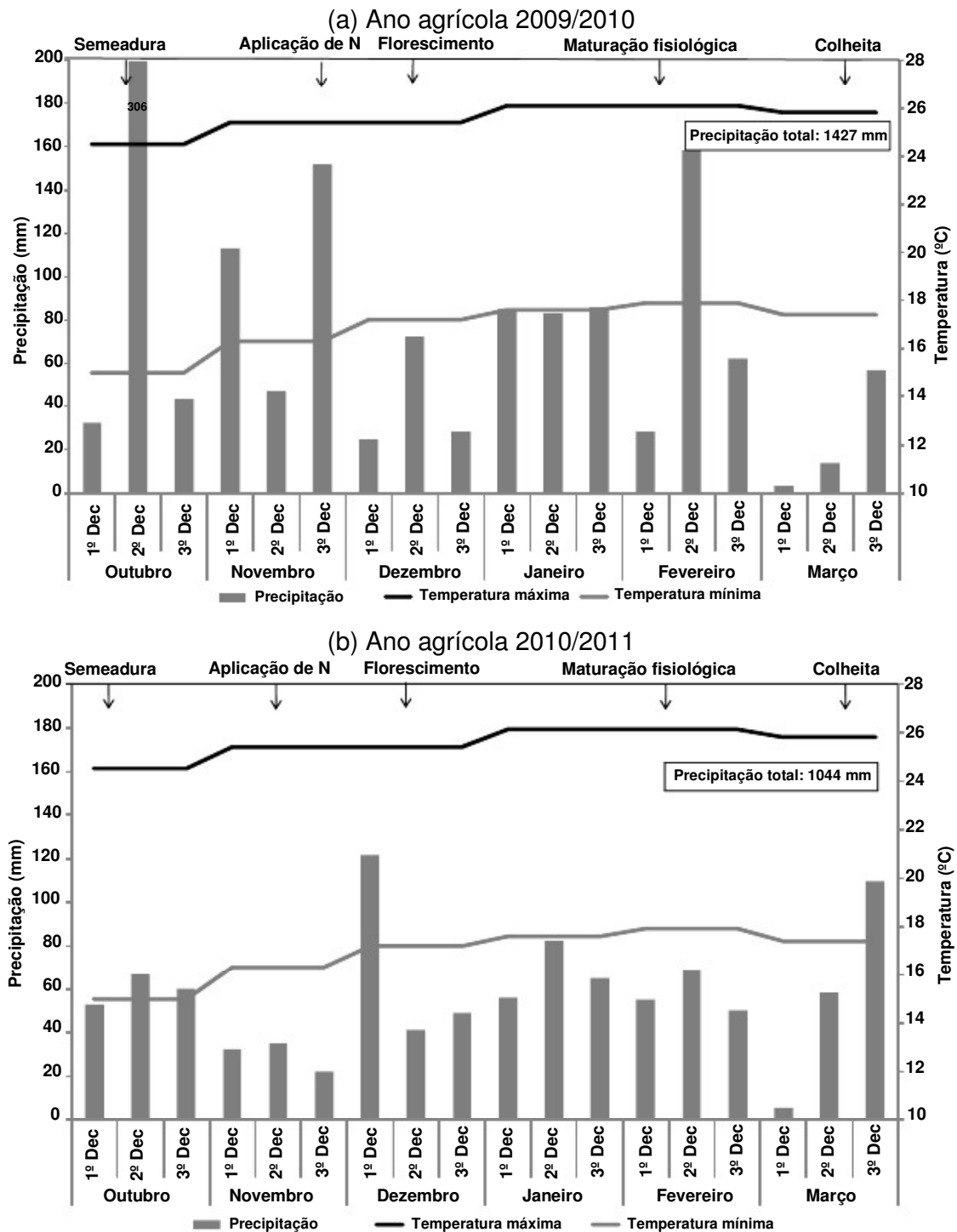
As diferentes doses de N em cobertura e densidade de plantas não exerceram efeito significativo na contaminação natural dos grãos de milho por fungos. Os níveis de contaminação das amostras por fumonisinas foram baixos, no entanto, o incremento na densidade de plantas causou aumento na contaminação, no qual detectou-se um número maior de amostras contaminadas com níveis superiores ao limite máximo tolerado. Fumonisininas não teve correlação significativa ( $p > 0,05$ ) com os teores de proteínas, amido e cinzas em grãos.

Os teores de proteínas e cinzas aumentaram com incremento de doses de N em cobertura e diminuíram com o incremento na população de plantas, independente da dose de adubação nitrogenada. O teor de amido em grãos aumentou com incremento na população de plantas e diminuiu com aumento nas doses de N em cobertura.

**Figura 1** - Localização de campo experimental, Município de Mauá da Serra - PR



**Figura 2** – Níveis de precipitação por decêndio nos anos agrícolas de 2009/2010 e 2010/2011, registradas no período de 01/10 a 31/03 nos anos de 2009 e 2010, em Marilândia do Sul - PR, pelo Instituto das Águas do Paraná e temperaturas mensais máximas e mínimas da média de 12 anos (1979 a 1992) do Instituto Agrônômico do Paraná (IAPAR) de Mauá da Serra - PR (2012)



Fonte: Adaptado a partir de Piazzoli (2012).

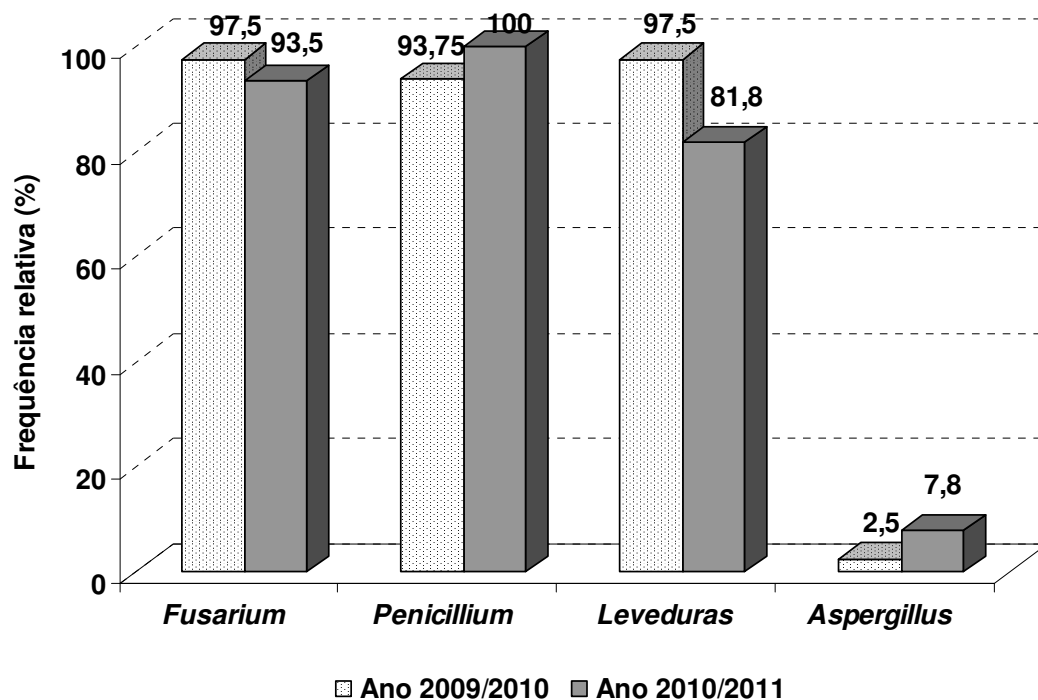
**Tabela 1** - Características químicas do solo (macronutrientes e dados complementares) da área experimental na camada de 0 a 0,2 m em Mauá da Serra - PR (2012)

Ano agrícola 2009/2010											
pH	P <sup>(1)</sup>	S <sup>(2)</sup>	K	Ca	Mg	Al	H+Al	SB	CTC	V	MO
CaCl <sub>2</sub> (mg dm <sup>-3</sup> )			-----cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> -----						% g dm <sup>-3</sup>		
5,5	8,5	11,7	0,36	5,9	1,6	0	5,6	7,9	13,5	58,3	37,9
Ano agrícola 2010/2011											
pH	P <sup>(1)</sup>	S <sup>(2)</sup>	K	Ca	Mg	Al	H+Al	SB	CTC	V	MO
CaCl <sub>2</sub> (mg dm <sup>-3</sup> )			-----cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> -----						% g dm <sup>-3</sup>		
5,2	4,83	14	0,32	3,7	1,5	0	5,7	5,5	11,2	49,4	45

(1) Método de Mehlich-1; (2) SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> Legenda: pH – pH em cloreto de cálcio; SB – soma de bases; CTC – capacidade de trocar cátions a pH 7,0; V – saturação por bases; MO – matéria orgânica.

Fonte: Piazzoli (2012).

**Figura 3** - Frequência relativa dos principais gêneros fúngicos em amostras de milho recém-colhidas de campo experimental em Mauá da Serra – PR, nos anos agrícolas de 2009/2010 (n = 80) e 2010/2011 (n = 80), submetidos a quatro populações de plantas e cinco doses de N em cobertura



**Tabela 2** - Contaminação fúngica de grãos de milho em função da densidade de plantas e doses de N, comparando os anos agrícolas de 2009/2010 (n = 80) e 2010/2011 (n = 80)

Dose de N (kg ha <sup>-1</sup> )	0		60		120		180		240	
Ano agrícola	09/10	10/11	09/10	10/11	09/10	10/11	09/10	10/11	09/10	10/11
Plantas ha <sup>-1</sup>	<i>Fusarium</i> spp. (log UFC g <sup>-1</sup> )									
60000	4,52 ± 1,00 <sup>a</sup>	2,92 ± 2,28 <sup>a</sup>	5,43 ± 0,55 <sup>a</sup>	4,35 ± 0,57 <sup>a</sup>	3,78 ± 2,54 <sup>a</sup>	5,18 ± 0,97 <sup>a</sup>	5,30 ± 2,11 <sup>a</sup>	2,83 ± 0,35 <sup>b</sup>	4,73 ± 0,35 <sup>a</sup>	3,93 ± 0,90 <sup>a</sup>
75000	5,77 ± 0,87 <sup>a</sup>	4,88 ± 1,07 <sup>a</sup>	3,78 ± 2,62 <sup>a</sup>	4,19 ± 1,11 <sup>a</sup>	5,03 ± 0,49 <sup>a</sup>	3,71 ± 1,08 <sup>a</sup>	4,75 ± 1,28 <sup>a</sup>	3,19 ± 0,46 <sup>a</sup>	5,31 ± 0,59 <sup>a</sup>	4,01 ± 1,26 <sup>a</sup>
90000	5,69 ± 0,47 <sup>a</sup>	3,91 ± 0,85 <sup>b</sup>	4,70 ± 0,85 <sup>a</sup>	3,27 ± 2,30 <sup>a</sup>	5,57 ± 0,87 <sup>a</sup>	4,60 ± 1,10 <sup>a</sup>	4,60 ± 0,08 <sup>a</sup>	3,29 ± 2,26 <sup>a</sup>	4,55 ± 0,91 <sup>a</sup>	4,55 ± 0,64 <sup>a</sup>
105000	5,77 ± 0,91 <sup>a</sup>	4,59 ± 1,37 <sup>a</sup>	5,47 ± 0,41 <sup>a</sup>	3,80 ± 0,44 <sup>a</sup>	5,12 ± 0,79 <sup>a</sup>	3,81 ± 2,56 <sup>a</sup>	4,58 ± 1,32 <sup>a</sup>	4,13 ± 1,02 <sup>a</sup>	4,83 ± 0,37 <sup>a</sup>	4,20 ± 0,71 <sup>a</sup>
Plantas ha <sup>-1</sup>	<i>Penicillium</i> spp. (log UFC g <sup>-1</sup> )									
60000	4,26 ± 1,60 <sup>b</sup>	6,34 ± 0,69 <sup>a</sup>	4,63 ± 0,28 <sup>a</sup>	4,95 ± 0,40 <sup>a</sup>	3,78 ± 2,72 <sup>a</sup>	4,93 ± 0,44 <sup>a</sup>	4,42 ± 1,48 <sup>a</sup>	5,35 ± 0,96 <sup>a</sup>	4,18 ± 0,86 <sup>a</sup>	5,36 ± 0,51 <sup>a</sup>
75000	4,63 ± 1,68 <sup>a</sup>	4,53 ± 0,33 <sup>a</sup>	3,32 ± 2,25 <sup>b</sup>	5,56 ± 0,99 <sup>a</sup>	4,47 ± 0,64 <sup>a</sup>	5,16 ± 1,04 <sup>a</sup>	5,67 ± 1,32 <sup>a</sup>	6,47 ± 0,95 <sup>a</sup>	5,25 ± 0,52 <sup>a</sup>	6,02 ± 0,79 <sup>a</sup>
90000	4,95 ± 0,43 <sup>a</sup>	5,74 ± 0,67 <sup>a</sup>	4,00 ± 2,81 <sup>a</sup>	5,53 ± 0,85 <sup>a</sup>	4,77 ± 1,34 <sup>a</sup>	5,48 ± 0,70 <sup>a</sup>	4,69 ± 1,02 <sup>a</sup>	5,77 ± 0,77 <sup>a</sup>	3,96 ± 0,86 <sup>b</sup>	6,37 ± 0,47 <sup>a</sup>
105000	4,56 ± 0,34 <sup>a</sup>	5,90 ± 0,37 <sup>a</sup>	4,86 ± 1,34 <sup>a</sup>	5,06 ± 0,20 <sup>a</sup>	3,53 ± 2,56 <sup>b</sup>	5,67 ± 0,41 <sup>a</sup>	3,80 ± 2,97 <sup>b</sup>	5,72 ± 0,45 <sup>a</sup>	4,97 ± 0,71 <sup>a</sup>	5,17 ± 0,65 <sup>a</sup>
Plantas ha <sup>-1</sup>	Leveduras (log UFC g <sup>-1</sup> )									
60000	4,76 ± 0,76 <sup>a</sup>	3,18 ± 2,54 <sup>a</sup>	6,05 ± 0,52 <sup>a</sup>	2,08 ± 1,40 <sup>b</sup>	4,18 ± 2,80 <sup>a</sup>	4,00 ± 1,53 <sup>a</sup>	5,62 ± 0,78 <sup>a</sup>	2,41 ± 1,84 <sup>b</sup>	4,94 ± 0,96 <sup>a</sup>	3,02 ± 0,80 <sup>b</sup>
75000	5,23 ± 1,10 <sup>a</sup>	3,25 ± 0,78 <sup>b</sup>	3,87 ± 2,60 <sup>a</sup>	3,09 ± 1,01 <sup>a</sup>	4,97 ± 0,70 <sup>a</sup>	3,58 ± 1,42 <sup>a</sup>	5,18 ± 0,45 <sup>a</sup>	2,19 ± 1,53 <sup>b</sup>	4,96 ± 0,33 <sup>a</sup>	3,20 ± 1,15 <sup>a</sup>
90000	4,76 ± 0,78 <sup>a</sup>	3,73 ± 0,54 <sup>a</sup>	5,00 ± 0,38 <sup>a</sup>	2,48 ± 1,81 <sup>b</sup>	4,62 ± 0,35 <sup>a</sup>	2,82 ± 1,94 <sup>a</sup>	4,76 ± 1,15 <sup>a</sup>	1,23 ± 1,48 <sup>b</sup>	4,78 ± 0,82 <sup>a</sup>	1,43 ± 1,66 <sup>b</sup>
105000	4,94 ± 0,54 <sup>a</sup>	3,03 ± 3,05 <sup>a</sup>	5,05 ± 0,68 <sup>a</sup>	2,34 ± 2,10 <sup>b</sup>	5,12 ± 0,34 <sup>a</sup>	2,51 ± 0,59 <sup>b</sup>	5,01 ± 0,93 <sup>a</sup>	3,59 ± 1,43 <sup>a</sup>	4,79 ± 0,34 <sup>a</sup>	1,68 ± 1,96 <sup>b</sup>
Plantas ha <sup>-1</sup>	<i>Aspergillus</i> spp. (log UFC g <sup>-1</sup> )									
60000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
75000	-	1,75 ± 2,00	-	-	-	0,67 ± 1,15	1,25 ± 2,50	-	-	0,50 ± 1,00
90000	-	-	0,87 ± 1,74	-	-	-	-	-	-	-
105000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,87 ± 2,58

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha, para comparação entre os anos, não apresentam diferença estatística pelo teste de Tukey (p < 0,05).

**Tabela 3** - Correlação entre doses de N, população de plantas, contaminação fúngica, fumonisinas, atividade de água (Aa), teores de amido, cinzas e proteínas nos anos agrícolas de 2009/2010 (n = 80) e 2010/2011 (n = 80)

Variáveis	P	D	<i>Fus</i>	<i>Pen</i>	Lev	FB <sub>1</sub>	FB <sub>2</sub>	Umidade	Aa	Cinzas	Amido	Proteínas
População (plantas ha <sup>-1</sup> )	$\rho = 1,00$ $p = \text{---}$	$\rho = 0,01$ $p = 0,86$	$\rho = -0,02$ $p = 0,82$	$\rho = -0,05$ $p = 0,54$	$\rho = -0,19^*$ $p = 0,00$	$\rho = 0,14$ $p = 0,08$	$\rho = 0,14$ $p = 0,08$	$\rho = -0,01$ $p = 0,93$	$\rho = 0,00$ $p = 0,95$	$\rho = -0,50^*$ $p = 0,00$	$\rho = 0,29^*$ $p = 0,00$	$\rho = -0,22^*$ $p = 0,00$
Dose N (kg ha <sup>-1</sup> )		$\rho = 1,00$ $p = \text{---}$	$\rho = -0,13$ $p = 0,10$	$\rho = 0,05$ $p = 0,55$	$\rho = -0,06$ $p = 0,48$	$\rho = -0,02$ $p = 0,75$	$\rho = -0,04$ $p = 0,61$	$\rho = -0,06$ $p = 0,49$	$\rho = 0,01$ $p = 0,88$	$\rho = 0,15$ $p = 0,06$	$\rho = -0,23^*$ $p = 0,00$	$\rho = 0,66^*$ $p = 0,00$
<i>Fusarium</i> spp.			$\rho = 1,00$ $p = \text{---}$	$\rho = 0,12$ $p = 0,12$	$\rho = 0,47^*$ $p = 0,00$	$\rho = -0,03$ $p = 0,69$	$\rho = -0,03$ $p = 0,67$	$\rho = 0,27^*$ $p = 0,00$	$\rho = 0,24^*$ $p = 0,00$	$\rho = -0,13$ $p = 0,11$	$\rho = 0,13$ $p = 0,09$	$\rho = -0,25^*$ $p = 0,00$
<i>Penicillium</i> spp.				$\rho = 1,00$ $p = \text{---}$	$\rho = 0,05$ $p = 0,50$	$\rho = 0,09$ $p = 0,27$	$\rho = 0,12$ $p = 0,14$	$\rho = -0,19^*$ $p = 0,01$	$\rho = -0,15$ $p = 0,07$	$\rho = -0,08$ $p = 0,35$	$\rho = 0,02$ $p = 0,79$	$\rho = 0,12$ $p = 0,14$
Leveduras					$\rho = 1,00$ $p = \text{---}$	$\rho = -0,05$ $p = 0,53$	$\rho = -0,05$ $p = 0,50$	$\rho = 0,25^*$ $p = 0,00$	$\rho = 0,22^*$ $p = 0,00$	$\rho = -0,00$ $p = 0,98$	$\rho = 0,03$ $p = 0,67$	$\rho = -0,13$ $p = 0,09$
FB <sub>1</sub> (μg g <sup>-1</sup> )						$\rho = 1,00$ $p = \text{---}$	$\rho = 0,97^*$ $p = 0,00$	$\rho = -0,06$ $p = 0,43$	$\rho = -0,08$ $p = 0,30$	$\rho = -0,19^*$ $p = 0,01$	$\rho = -0,09$ $p = 0,29$	$\rho = 0,02$ $p = 0,84$
FB <sub>2</sub> (μg g <sup>-1</sup> )							$\rho = 1,00$ $p = \text{---}$	$\rho = -0,08$ $p = 0,32$	$\rho = -0,09$ $p = 0,25$	$\rho = -0,18^*$ $p = 0,02$	$\rho = -0,10$ $p = 0,22$	$\rho = 0,01$ $p = 0,94$
Umidade (%)								$\rho = 1,00$ $p = \text{---}$	$\rho = 0,91^*$ $p = 0,00$	$\rho = -0,23^*$ $p = 0,00$	$\rho = 0,50^*$ $p = 0,00$	$\rho = -0,48^*$ $p = 0,00$
Aa									$\rho = 1,00$ $p = \text{---}$	$\rho = -0,24^*$ $p = 0,00$	$\rho = 0,52^*$ $p = 0,00$	$\rho = -0,41^*$ $p = 0,00$
Cinzas (%)										$\rho = 1,00$ $p = \text{---}$	$\rho = -0,35^*$ $p = 0,00$	$\rho = 0,42^*$ $p = 0,00$
Amido (%)											$\rho = 1,00$ $p = \text{---}$	$\rho = -0,44^*$ $p = 0,00$
Proteínas (%)												$\rho = 1,00$ $p = \text{---}$

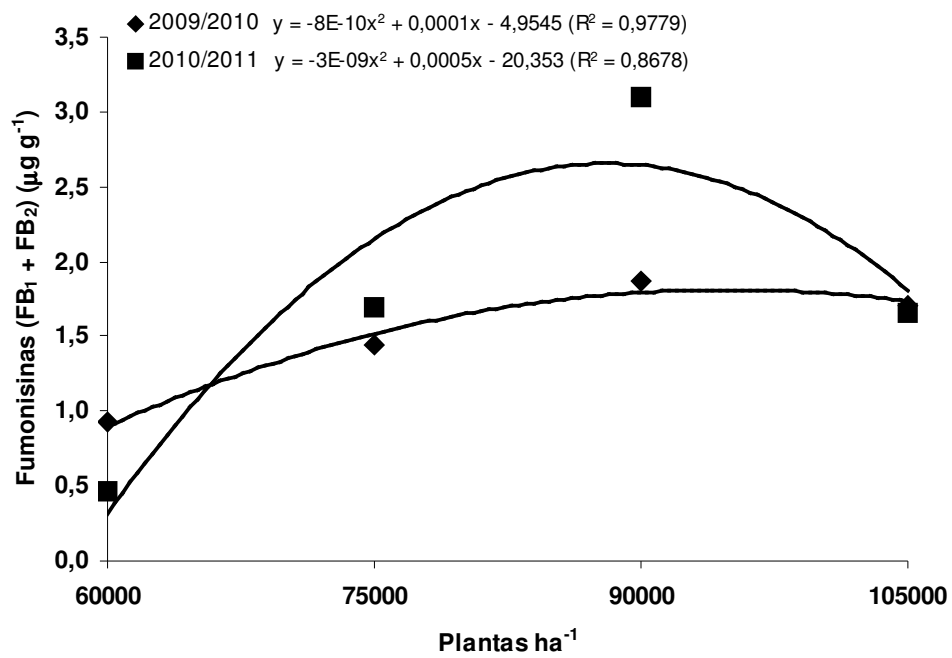
\*Correlações significantes a  $p < 0,05$ ,  $\rho$  = correlações,  $p$  = nível de significância.

**Tabela 4** - Valores médios de fumonisinas totais em função da densidade de plantas e doses de N em cobertura na cultura do milho, comparando os anos agrícolas de 2009/2010 (n = 80) e 2010/2011 (n = 80)

Dose (kg ha <sup>-1</sup> )	0		60		120		180		240	
Ano agrícola	09/10	10/11	09/10	10/11	09/10	10/11	09/10	10/11	09/10	10/11
Plantas ha <sup>-1</sup>	Fumonisinas totais (µg g <sup>-1</sup> )									
60000	0,44 ± 0,38 <sup>a</sup>	0,54 ± 0,60 <sup>a</sup>	0,73 ± 0,56 <sup>a</sup>	0,86 ± 0,77 <sup>b</sup>	1,69 ± 1,28 <sup>a</sup>	0,10 ± 0,04 <sup>a</sup>	1,24 ± 0,56 <sup>a</sup>	0,44 ± 0,62 <sup>b</sup>	0,51 ± 0,39 <sup>a</sup>	0,38 ± 0,32 <sup>a</sup>
75000	0,74 ± 0,88 <sup>a</sup>	0,68 ± 0,43 <sup>a</sup>	2,26 ± 1,74 <sup>a</sup>	0,64 ± 0,23 <sup>b</sup>	1,68 ± 1,38 <sup>a</sup>	4,51 ± 6,31 <sup>a</sup>	0,13 ± 0,13 <sup>b</sup>	0,20 ± 0,26 <sup>a</sup>	2,41 ± 2,18 <sup>a</sup>	2,77 ± 4,83 <sup>a</sup>
90000	2,46 ± 2,60 <sup>a</sup>	0,80 ± 1,13 <sup>a</sup>	2,49 ± 2,31 <sup>b</sup>	7,91 ± 11,0 <sup>a</sup>	0,95 ± 0,88 <sup>b</sup>	5,98 ± 10,7 <sup>a</sup>	1,32 ± 1,29 <sup>b</sup>	0,10 ± 0,10 <sup>a</sup>	2,10 ± 1,76 <sup>a</sup>	0,71 ± 0,50 <sup>a</sup>
105000	1,39 ± 1,96 <sup>a</sup>	1,39 ± 2,43 <sup>a</sup>	1,52 ± 1,68 <sup>a</sup>	0,46 ± 0,34 <sup>b</sup>	0,99 ± 0,87 <sup>a</sup>	5,04 ± 7,90 <sup>a</sup>	3,77 ± 2,92 <sup>a</sup>	0,32 ± 0,35 <sup>a</sup>	0,88 ± 1,02 <sup>a</sup>	0,47 ± 0,40 <sup>a</sup>

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha, para comparação entre os anos, não apresentam diferença estatística pelo teste de Tukey (p < 0,05).

**Figura 4** – Concentração de fumonisinas totais ( $FB_1 + FB_2$ ) em grãos de milho em função da densidade de plantas nos anos agrícolas de 2009/2010 ( $n = 80$ ) e 2010/2011 ( $n = 80$ )





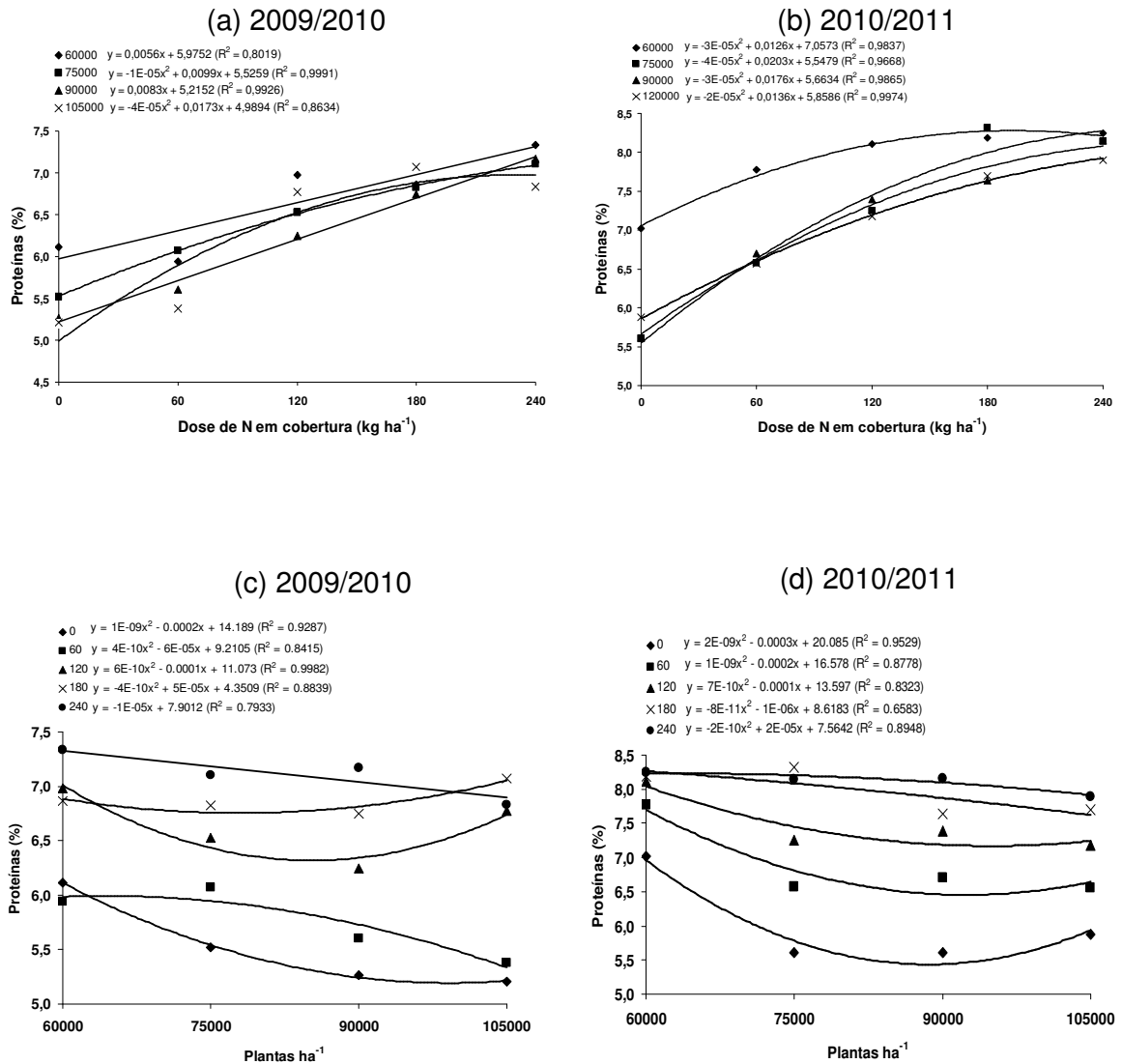
**Tabela 5** - Valores médios de atividade de água, umidade, amido, cinzas e proteínas em função da densidade de plantas e doses de N em cobertura na cultura do milho, comparando os anos agrícolas de 2009/2010 (n = 80) e 2010/2011 (n = 80)

Dose (kg ha <sup>-1</sup> )	0		60		120		180		240	
Ano agrícola	09/10	10/11	09/10	10/11	09/10	10/11	09/10	10/11	09/10	10/11
Plantas ha <sup>-1</sup>	Atividade de água									
60000	0,74 ± 0,09 <sup>a</sup>	0,60 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,77 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,60 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,77 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,61 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,79 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,61 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,79 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,61 ± 0,02 <sup>b</sup>
75000	0,78 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,60 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,75 ± 0,07 <sup>a</sup>	0,59 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,79 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,61 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,79 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,58 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,78 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,59 ± 0,03 <sup>b</sup>
90000	0,78 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,59 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,78 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,57 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,78 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,60 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,78 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,62 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,72 ± 0,10 <sup>a</sup>	0,61 ± 0,01 <sup>b</sup>
105000	0,79 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,59 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,80 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,60 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,77 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,58 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,76 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,59 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,79 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,59 ± 0,01 <sup>b</sup>
Plantas ha <sup>-1</sup>	Umidade (%)									
60000	15,04 ± 0,78 <sup>a</sup>	12,29 ± 0,40 <sup>b</sup>	15,59 ± 0,40 <sup>a</sup>	12,24 ± 0,36 <sup>b</sup>	15,04 ± 0,56 <sup>a</sup>	12,56 ± 0,31 <sup>b</sup>	15,33 ± 0,66 <sup>a</sup>	12,22 ± 0,26 <sup>b</sup>	15,32 ± 0,64 <sup>a</sup>	12,36 ± 0,37 <sup>b</sup>
75000	15,64 ± 0,19 <sup>a</sup>	12,72 ± 0,23 <sup>b</sup>	15,23 ± 0,43 <sup>a</sup>	12,64 ± 0,28 <sup>b</sup>	15,42 ± 0,56 <sup>a</sup>	12,68 ± 0,53 <sup>b</sup>	15,42 ± 0,31 <sup>a</sup>	12,13 ± 0,30 <sup>b</sup>	15,53 ± 1,59 <sup>a</sup>	12,07 ± 0,26 <sup>b</sup>
90000	15,46 ± 0,73 <sup>a</sup>	12,52 ± 0,34 <sup>b</sup>	15,29 ± 0,40 <sup>a</sup>	12,46 ± 0,57 <sup>b</sup>	15,21 ± 0,30 <sup>a</sup>	12,23 ± 0,33 <sup>b</sup>	15,14 ± 0,47 <sup>a</sup>	12,43 ± 0,25 <sup>b</sup>	14,76 ± 0,54 <sup>a</sup>	11,97 ± 0,28 <sup>b</sup>
105000	15,43 ± 0,39 <sup>a</sup>	12,75 ± 0,41 <sup>b</sup>	15,82 ± 0,32 <sup>a</sup>	12,60 ± 0,20 <sup>b</sup>	15,03 ± 0,59 <sup>a</sup>	12,13 ± 0,23 <sup>b</sup>	14,58 ± 0,62 <sup>a</sup>	12,33 ± 0,13 <sup>b</sup>	15,35 ± 0,21 <sup>a</sup>	12,17 ± 0,29 <sup>b</sup>
Plantas ha <sup>-1</sup>	Amido* (%)									
60000	64,93 ± 9,04 <sup>a</sup>	61,83 ± 3,31 <sup>b</sup>	62,26 ± 7,81 <sup>a</sup>	54,17 ± 3,55 <sup>b</sup>	63,41 ± 6,65 <sup>a</sup>	52,46 ± 8,15 <sup>b</sup>	60,11 ± 5,64 <sup>a</sup>	52,67 ± 6,50 <sup>a</sup>	65,83 ± 8,22 <sup>a</sup>	51,71 ± 5,29 <sup>b</sup>
75000	66,16 ± 2,72 <sup>a</sup>	57,00 ± 4,80 <sup>b</sup>	63,74 ± 6,60 <sup>a</sup>	62,63 ± 3,93 <sup>a</sup>	63,25 ± 5,17 <sup>a</sup>	62,85 ± 9,40 <sup>a</sup>	61,85 ± 5,60 <sup>a</sup>	60,66 ± 10,3 <sup>a</sup>	61,36 ± 1,64 <sup>a</sup>	52,23 ± 10,3 <sup>b</sup>
90000	69,65 ± 4,70 <sup>a</sup>	53,85 ± 8,77 <sup>b</sup>	69,72 ± 8,80 <sup>a</sup>	55,75 ± 7,22 <sup>b</sup>	67,07 ± 3,29 <sup>a</sup>	61,00 ± 5,63 <sup>a</sup>	61,85 ± 4,65 <sup>a</sup>	60,26 ± 6,11 <sup>a</sup>	59,67 ± 6,96 <sup>a</sup>	60,32 ± 7,74 <sup>a</sup>
105000	72,31 ± 6,54 <sup>a</sup>	64,94 ± 7,83 <sup>b</sup>	70,40 ± 8,31 <sup>a</sup>	64,22 ± 7,95 <sup>b</sup>	67,67 ± 5,81 <sup>a</sup>	60,12 ± 9,06 <sup>b</sup>	63,18 ± 5,63 <sup>a</sup>	63,31 ± 3,69 <sup>a</sup>	63,66 ± 7,83 <sup>a</sup>	57,59 ± 5,75 <sup>b</sup>
Plantas ha <sup>-1</sup>	Cinzas* (%)									
60000	1,21 ± 0,15 <sup>a</sup>	1,22 ± 0,12 <sup>a</sup>	1,06 ± 0,15 <sup>b</sup>	1,34 ± 0,11 <sup>a</sup>	1,33 ± 0,17 <sup>a</sup>	1,12 ± 0,14 <sup>b</sup>	1,23 ± 0,12 <sup>a</sup>	1,25 ± 0,17 <sup>a</sup>	1,10 ± 0,13 <sup>a</sup>	1,26 ± 0,12 <sup>a</sup>
75000	1,01 ± 0,10 <sup>a</sup>	1,08 ± 0,09 <sup>a</sup>	0,99 ± 0,05 <sup>a</sup>	1,10 ± 0,07 <sup>a</sup>	1,13 ± 0,06 <sup>a</sup>	1,08 ± 0,16 <sup>a</sup>	1,19 ± 0,18 <sup>a</sup>	1,05 ± 0,11 <sup>a</sup>	1,11 ± 0,08 <sup>a</sup>	1,12 ± 0,10 <sup>a</sup>
90000	0,91 ± 0,04 <sup>a</sup>	1,07 ± 0,09 <sup>a</sup>	0,91 ± 0,29 <sup>b</sup>	1,24 ± 0,09 <sup>a</sup>	0,97 ± 0,10 <sup>a</sup>	1,07 ± 0,09 <sup>b</sup>	1,02 ± 0,09 <sup>a</sup>	1,04 ± 0,09 <sup>a</sup>	1,14 ± 0,08 <sup>a</sup>	1,00 ± 0,04 <sup>a</sup>
105000	0,91 ± 0,17 <sup>a</sup>	0,96 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,84 ± 0,17 <sup>b</sup>	1,03 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,98 ± 0,09 <sup>a</sup>	1,10 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,93 ± 0,05 <sup>a</sup>	1,13 ± 0,10 <sup>a</sup>	1,02 ± 0,03 <sup>a</sup>	1,08 ± 0,14 <sup>a</sup>
Plantas ha <sup>-1</sup>	Proteínas* (%)									
60000	6,12 ± 0,43 <sup>b</sup>	7,01 ± 0,67 <sup>a</sup>	5,94 ± 0,64 <sup>b</sup>	7,92 ± 0,59 <sup>a</sup>	6,98 ± 0,30 <sup>b</sup>	8,01 ± 0,89 <sup>a</sup>	6,86 ± 0,50 <sup>b</sup>	8,13 ± 0,44 <sup>a</sup>	7,34 ± 0,44 <sup>b</sup>	8,36 ± 0,47 <sup>a</sup>
75000	5,52 ± 0,47 <sup>a</sup>	5,85 ± 0,47 <sup>a</sup>	6,07 ± 0,37 <sup>a</sup>	6,47 ± 0,53 <sup>a</sup>	6,53 ± 0,22 <sup>a</sup>	6,76 ± 0,69 <sup>a</sup>	6,82 ± 0,40 <sup>b</sup>	8,27 ± 0,62 <sup>a</sup>	7,10 ± 0,35 <sup>b</sup>	8,06 ± 0,62 <sup>a</sup>
90000	5,26 ± 0,30 <sup>b</sup>	6,21 ± 0,48 <sup>a</sup>	5,60 ± 0,53 <sup>b</sup>	6,71 ± 0,58 <sup>a</sup>	6,24 ± 0,35 <sup>b</sup>	7,24 ± 0,63 <sup>a</sup>	6,75 ± 0,39 <sup>b</sup>	7,33 ± 0,68 <sup>a</sup>	7,17 ± 0,15 <sup>b</sup>	8,15 ± 0,64 <sup>a</sup>
105000	5,21 ± 0,57 <sup>b</sup>	6,75 ± 0,66 <sup>a</sup>	5,38 ± 0,46 <sup>b</sup>	6,35 ± 0,81 <sup>a</sup>	6,77 ± 0,50 <sup>a</sup>	6,99 ± 0,90 <sup>a</sup>	7,07 ± 0,33 <sup>b</sup>	7,70 ± 1,36 <sup>a</sup>	6,83 ± 0,21 <sup>b</sup>	7,86 ± 1,00 <sup>a</sup>

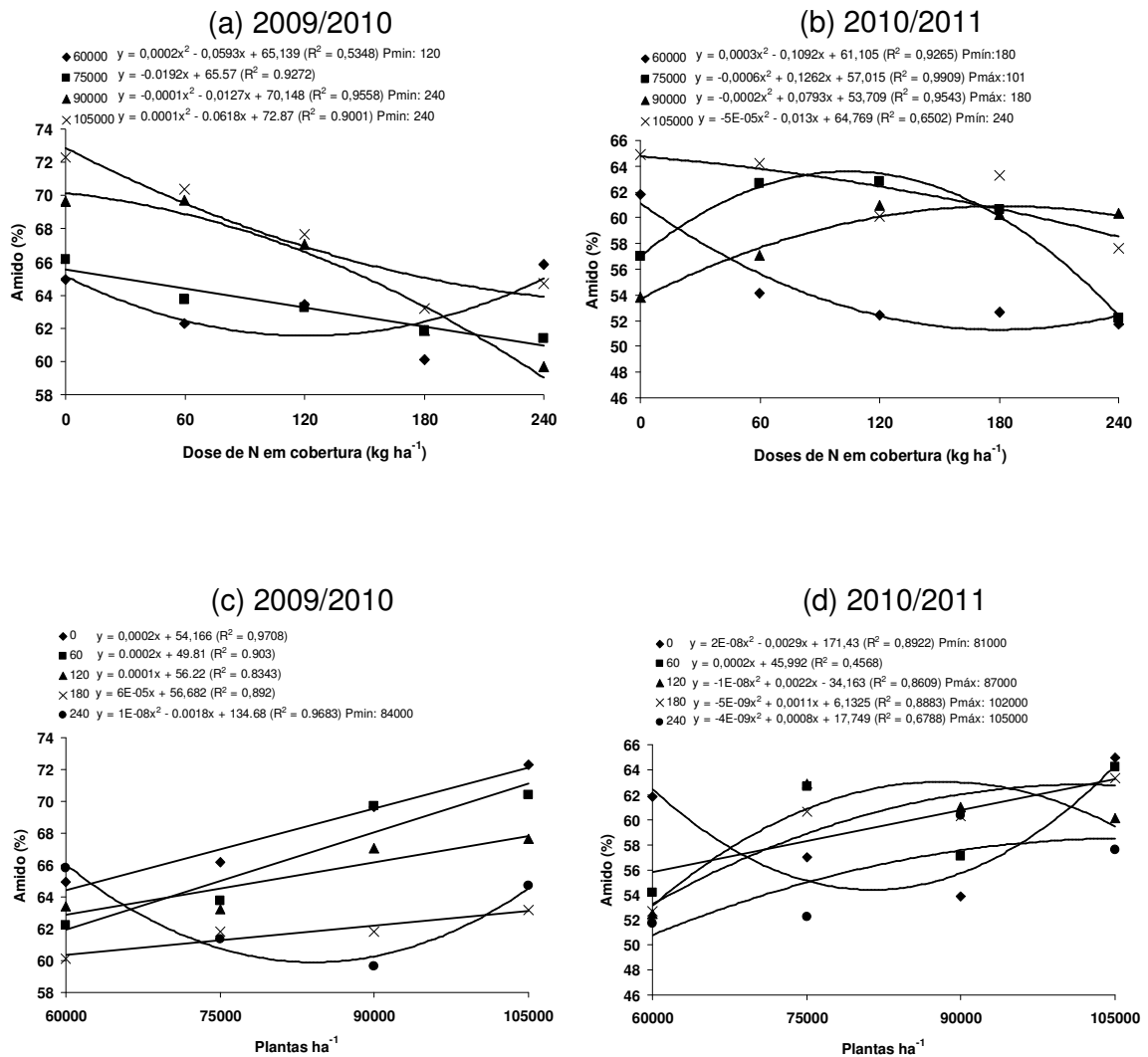
Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha, para comparação entre os anos, não apresentam diferença estatística pelo teste de Tukey (p < 0,05).

\*Expresso em porcentagem na matéria seca.

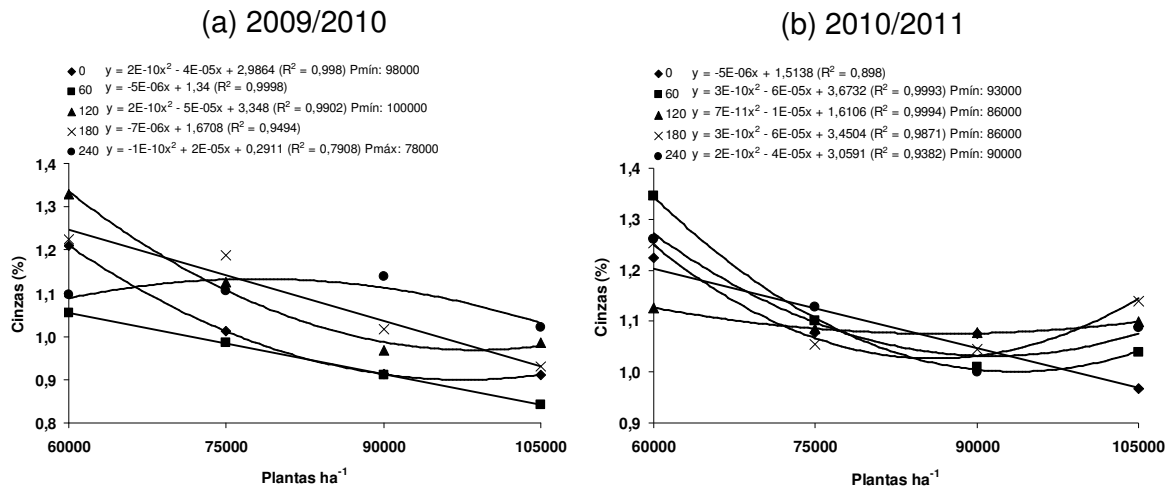
**Figura 6** – Teor de proteínas em grãos de milho em função de doses de N em cobertura e densidades de plantas na cultura do milho nos anos agrícolas de 2009/2010 (n = 80) e 2010/2011 (n = 80)



**Figura 7** – Teor de amido em grãos de milho em função de doses de N em cobertura e densidades de plantas na cultura do milho nos anos agrícolas de 2009/2010 (n = 80) e 2010/2011 (n = 80)



**Figura 8** – Teor de cinzas em grãos de milho em função de densidades de plantas na cultura do milho nos anos agrícolas de 2009/2010 (n = 80) e 2010/2011 (n = 80)



**Tabela 7** – Valores médios de cinzas em grãos de milho em função de doses de N em cobertura comparando os anos agrícolas de 2009/2010 (n = 80) e 2010/2011 (n = 80)

Ano agrícola	2009/2010	2010/2011
Dose de N (kg ha <sup>-1</sup> )		Cinzas* (%)
0	1,01 ± 0,21 <sup>b</sup>	1,08 ± 0,13 <sup>a</sup>
60	0,95 ± 0,20 <sup>b</sup>	1,13 ± 0,23 <sup>a</sup>
120	1,10 ± 0,18 <sup>a</sup>	1,10 ± 0,11 <sup>a</sup>
180	1,09 ± 0,15 <sup>a</sup>	1,12 ± 0,14 <sup>a</sup>
240	1,09 ± 0,13 <sup>a</sup>	1,12 ± 0,22 <sup>a</sup>
<b>Média</b>	<b>1,08<sup>b</sup></b>	<b>1,11<sup>a</sup></b>

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha, para comparação entre os anos, não apresentam diferença estatística pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

\*Expresso em porcentagem na matéria seca.

## 7 ARTIGO 3: EFEITO DA INOCULAÇÃO DE SEMENTE COM *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* E ADUBAÇÃO NITROGENADA NA CONTAMINAÇÃO FÚNGICA E NÍVEL DE FUMONISINA EM MILHO.

### RESUMO

Bactérias do gênero *Azospirillum* são organismos fixadores de nitrogênio que, quando associadas a rizosfera de plantas, podem contribuir com a nutrição nitrogenada e como agentes de biocontrole contra doenças. A otimização da possível simbiose entre *Azospirillum* spp. e milho pode resultar em aumento de produtividade e redução de custos de produção, além de melhorar a qualidade nutricional e sanitária dos grãos. O trabalho teve por objetivo avaliar o efeito da inoculação de sementes de milho com *Azospirillum brasilense* (estirpes Ab-V5 e Ab-V6) e doses de nitrogênio em cobertura no teor de proteínas, contaminação fúngica e fumonisinas, nos anos agrícolas de 2010/2011 e 2011/2012. Os experimentos foram conduzidos em duas regiões distintas (Norte e Centro-Sul do Estado do Paraná). O delineamento experimental foi de faixas na região Norte e de parcela subdividida na Centro-Sul, ambos em esquema fatorial 2x5, correspondentes a inoculação de sementes com *A. brasilense* (com e sem) e cinco doses de N em cobertura: 0, 30, 60, 90 e 120 kg ha<sup>-1</sup> na região Norte e 0, 50, 100, 150 e 200 kg ha<sup>-1</sup> na Centro-Sul. *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. e leveduras foram os gêneros fúngicos que prevaleceram nas amostras de milho em ambas as regiões. A inoculação de sementes e as doses de N em cobertura não apresentaram efeito significativo ( $p > 0,05$ ) em relação à contaminação dos grãos por fungos. Na região Norte, fumonisinas foram detectadas em 90% das amostras em 2010/2011 (média de 0,62 µg g<sup>-1</sup>) e 97,5% em 2011/2012 (média de 4,34 µg g<sup>-1</sup>). Na região Centro-Sul, fumonisinas foram detectadas em 45% das amostras em 2010/2011 (média de 0,14 µg g<sup>-1</sup>) e 100% em 2011/2012 (média de 2,67 µg g<sup>-1</sup>), no qual amostras oriundas de tratamentos com inoculante apresentaram redução nos níveis de fumonisinas em comparação aos tratamentos sem inoculante, indicando fator favorável quanto à condução sequencial de prática agrícola com inoculante. O teor de proteínas em grãos aumentou com incremento nas doses de N e a inoculação com *A. brasilense* não produziu efeito significativo para esta variável. O teor de proteínas, contaminação fúngica e fumonisinas foram influenciadas pelas diferentes condições climáticas ocorridas entre os anos de cultivo. O uso de bactérias diazotróficas surge como alternativa para redução do custo com fertilizantes e melhora da qualidade do grão, porém, restrições hídricas no período de desenvolvimento da cultura, principalmente no ano 2011/2012, representaram condições desfavoráveis para o pleno desempenho da cultura do milho.

**Palavras-chave:** milho, proteínas, *Azospirillum*, Bactérias diazotróficas, fumonisinas.

## EFFECT OF SEED INOCULATION WITH *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* AND NITROGEN TOPDRESSING ON FUNGAL CONTAMINATION AND FUMONISIN IN MAIZE GRAINS.

### ABSTRACT

Bacteria of the genus *Azospirillum* are nitrogen fixing organisms that, when associated with the rhizosphere of plants can contribute to nitrogen nutrition and as biocontrol agents against diseases. Optimization of this possible symbiosis between *Azospirillum* spp. and maize could result in increased productivity and reduced production costs and improve the health and nutritional quality of maize kernels. The study aimed to evaluate the effect of inoculation of maize seeds with *Azospirillum brasilense* (strains Ab-V5 and Ab-V6) and doses of nitrogen application on protein, fungal contamination and production of fumonisins in crop year 2010/2011 and 2011/2012. The experiments were conducted at two sites (Northern and Central-Southern regions, Paraná State, Brazil) in which the experimental design was of split block at Northern region and split plot at Central-South, in both 2x5 factorial arrangement, corresponding to seed inoculation with *A. brasilense* (with and without) and five doses of nitrogen: 0, 30, 60, 90 and 120 kg ha<sup>-1</sup> in Northern and 0, 50, 100, 150 and 200 kg ha<sup>-1</sup> in Central-Southern. *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. and yeasts fungi species that were prevalent in the corn samples in both regions. The seed inoculation and doses of nitrogen on coverage had no significant effect ( $p > 0.05$ ) in relation to contamination of grains by fungi. In Northern region fumonisins were detected in 90% of samples in 2010/2011 (average of 0.62 µg g<sup>-1</sup>) and 97.5% in 2011/2012 (average of 4.34 µg g<sup>-1</sup>). In Central-Southern, fumonisins have been detected in 45% of samples in 2010/2011 (mean 0.14 µg g<sup>-1</sup>) and 100% in 2011/2012 (average of 2.67 µg g<sup>-1</sup>), in which samples from treatment with inoculant had decreased in fumonisin levels ( $p < 0.05$ ) compared to treatments without inoculation, indicating favorable factor towards conducting sequential agricultural practice with inoculant. Protein content in grain increased with increasing doses of N and inoculation with *A. brasilense* produced no significant effect for this variable. The protein content, fungal contamination and fumonisin were influenced by different climate conditions that occurred between the years of cultivation. Use of diazotrophs is an alternative to reduce costs of fertilizer and improved grain quality, but restrictions rainfall during the period of crop development, especially in the year 2011/2012, represented unfavorable conditions for the full performance of maize.

**Keywords:** maize, protein, *Azospirillum*, diazotrophic bacteria, fumonisins.

## INTRODUÇÃO

A agricultura moderna demanda grande quantidade de fertilizante para maximizar o cultivo de cereais, sendo o milho uma das mais exigentes, requerendo especialmente os nitrogenados e fosfatados. O suprimento inadequado de nitrogênio (N) é fator limitante no rendimento, por ser macronutriente essencial na biossíntese de proteínas, enzimas, coenzimas, ácidos nucleicos e citocromos (BÜLL, 1993).

A busca crescente pela maior produtividade e qualidade, associado ao menor custo, elevam a participação de fertilizantes nitrogenados em 75% do custo, representando 40% do valor total da produção, além de causarem poluição ambiental (MACHADO et al., 1998). O aumento no rendimento e qualidade nutricional depende da eficiente canalização de C e N para o grão, transformando em componente estrutural e de reserva. Uma das alternativas visando a redução de custo seria a fixação de N<sub>2</sub> atmosférico empregando simbioses na rizosfera, a exemplo de *Azospirillum* spp., capaz de colonizar o habitat intra ou extra-raízes de uma ampla variedade de plantas (DIDONET; RODRIGUES; KENNER, 1996; BASHAN; HOLGUIN, 1997; BASHAN; HOLGUIN; DE-BASHAN, 2004). Estas bactérias diazotróficas beneficiam de nutrientes secretados pela raiz (BLOEMBERG; LUGTENBERG, 2001). Em contrapartida, favorecem diretamente a planta produzindo reguladores de crescimento (auxinas, giberelinas, citocininas e etileno), ou melhorando a absorção de nutrientes (BASHAN; HOLGUIN, 1997; CASSÁN et al., 2001; TIEN; GASKINS; HUBBELL, 1979; THULER et al., 2003). Entre os efeitos indiretos citam-se a produção de antibióticos, sideróforos e ácido hidrocianico, inibidores de fitopatógenos (MYOUNGSU et al., 2005).

*A. brasilense* é notavelmente versátil, sendo capaz de mineralizar nutrientes do solo e sequestrar Fe para sobreviver a condições ambientais adversas e favorecer associações benéficas entre planta e micorrizas (BASHAN; HOLGUIN; DE-BASHAN, 2004; CREUS; SUELDO; BARASSI, 2004). *A. brasilense* em sementes contribuiu aumentando a produtividade de trigo (DIDONET; RODRIGUES; KENNER, 1996; DALLA SANTA et al., 2004; NAIMAN; LATRÓNICO; DE SALAMONE, 2009) e milho (CAVALLET et al., 2000; NOVAKOWISKI et al., 2011).

O milho constitui substrato para fungos micotoxigênicos desde o período de pré-colheita, com ênfase num vasto número de espécies do gênero *Fusarium*, seja saprófitas ou fitopatógenos (CAST, 2003; DESJARDINS; HOHN, 1997;

FANDOHAN et al., 2005). *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg (= *Fusarium moniliforme* Sheldon, teleomorfo *Giberella moniliforme*, sinônimo *Giberella fujikuroi*) é o principal produtor de fumonisinas em milho, responsáveis pela leucoencefalomalácia em equinos, edema pulmonar e efeito cardiotoxico em suínos (SEIFERT et al., 2003; MARASAS et al., 1988; HARRISON et al., 1990; SMITH et al., 1996). A Agência Internacional para Pesquisa sobre o Câncer (IARC) em Lyon, França, avaliou as toxinas produzidas por *F. verticillioides* como cancerígenos do grupo 2B, isto é, possivelmente cancerígeno para seres humanos (IARC, 1993).

Considerando o elevado custo e a dependência intensiva de agroquímicos na prevenção e controle fúngico, além de poluição ambiental e resistência do patógeno, o controle biológico por *A. brasilense* surge como alternativa promissora (TORTORA; DÍAZ-RICCI; PEDRAZA, 2011). O antagonismo mediado por sideróforos reduz a disponibilidade de ferro para patógenos fúngicos, eliminando-os da rizosfera (CHAIHARN; CHUNHALEUCHANON; LUMYONG, 2009). *Pseudomonas* spp. e *Bacillus* spp. na rizosfera de milho inibiram *F. verticillioides*, *F. graminearum* e *Macrophomina phaseolina* produzindo antifúngicos, sideróforos, HCN e pigmentos fluorescentes, além de promoverem o crescimento da planta pela fixação de N<sub>2</sub> atmosférico, solubilização de fosfato e produção de ácidos orgânicos (PAL et al., 2001).

Como principais fontes de inóculo de *Fusarium*, têm-se os restos de cultura de milho, como colmos e espigas, sementes de milho contaminadas, restos de gramíneas de inverno (trigo, aveia e cevada) e também o solo (PINTO, 2005). A presença de microrganismos no solo, que possuam atividade antagonista contra *Fusarium* spp., pode resultar em redução da contaminação da planta por este fungo. Em adição, níveis adequados de adubação nitrogenada melhora a qualidade sanitária do grão, sendo que a insuficiência em N aumenta a susceptibilidade a fungos toxigênicos, assim como o excesso causa aumento da massa foliar, obtendo-se um microclima com menor fluxo de ar e maior umidade relativa, favorecendo a sobrevivência fúngica (BRUNS; ABBAS, 2005; BLANDINO; REYNERI; VANARA, 2008).

Diante disso, no presente trabalho foi avaliado o efeito da inoculação com *A. brasilense* em sementes de milho sob diferentes níveis de adubação nitrogenada em campos experimentais situados em duas regiões distintas do Estado do Paraná quanto à condição climática e, repercussão na qualidade de grão

produzido, com ênfase no teor de proteínas, contaminação fúngica e produção de fumonisinas.

## **EXPERIMENTAL**

### *Localização e caracterização das áreas experimentais*

O experimento foi realizado a campo, durante dois anos agrícolas, 2010/2011 e 2011/2012, em dois locais de pesquisa da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Centro Nacional de Pesquisa em Soja (Embrapa soja). O primeiro local, a fazenda experimental da sede Embrapa soja, localizada no Distrito da Warta, pertencente ao município de Londrina, região Norte do Estado do Paraná, o qual se encontra a 23°11' latitude Sul, 51°10' longitude Oeste de Greenwich, com altitude de 605 m (Figura 1). O solo do local é caracterizado como Latossolo Vermelho distroférico (EMBRAPA, 2006). O clima da região, segundo a classificação de Köppen, é Cfa, ou seja, clima subtropical com temperatura média no mês mais frio inferior a 18°C e temperatura média no mês mais quente acima de 22°C, com verões quentes, geadas pouco frequentes e tendência de concentração das chuvas nos meses de verão, contudo sem estação seca definida (IAPAR, 2012).

O segundo local, a fazenda experimental do Escritório de Negócios da Embrapa Transferência de Tecnologia localizada no município de Ponta Grossa, região Centro-Sul do Estado do Paraná, que se encontra a 25°09' latitude Sul, 50°06' longitude Oeste de Greenwich, com altitude de 800 m (Figura 1). O solo do local é caracterizado como Latossolo Vermelho distrófico (EMBRAPA, 2006). O clima da região, segundo a classificação de Köppen, é Cfb, ou seja, clima temperado propriamente dito, com temperatura média no mês mais frio inferior a 18°C, com verões frescos e temperatura média no mês mais quente abaixo de 22°C e sem estação seca definida (IAPAR, 2012). A Figura 2 apresenta os dados de temperatura média e precipitação pluviométrica mensal medidos nas regiões (a) Norte e (b) Centro-Sul, durante o período de condução do experimento, nos anos agrícolas de 2010/2011 e 2011/2012.

### *Delineamento experimental*

O delineamento experimental foi de faixas na região Norte e de parcela subdividida na Centro-Sul no esquema fatorial 2x5 correspondente à inoculação de

sementes com *A. brasilense* (com e sem) e cinco doses de N em cobertura: 0, 30, 60, 90 e 120 kg ha<sup>-1</sup> na região Norte e 0, 50, 100, 150 e 200 kg ha<sup>-1</sup> na Centro-Sul, com quatro repetições, sendo o fator inoculação de sementes com *A. brasilense* alocado na parcela e as doses de N, aplicadas em cobertura, na subparcela. A parcela experimental foi constituída por quatro linhas com oito metros de comprimento e espaçamento entre linhas de 70 cm. Foi considerada como área útil da parcela experimental as duas linhas centrais, desprezando-se 1,25 m nas extremidades, totalizando 7,7 m<sup>2</sup> de área útil.

### *Amostras*

O cultivar utilizado nos dois locais foi o híbrido transgênico DKB390YG da empresa Dekalb<sup>®</sup>, com tecnologia Yieldgard<sup>®</sup> para supressão da lagarta do cartucho (*Spodoptera frugiperda*), controle da lagarta da espiga (*Helicoverpa zea*) e broca do colmo (*Diatraea saccharalis*). Segundo o fornecedor, o híbrido produz espigas com excelente empalhamento e tolerância a grãos ardidos (DEKALB, 2011).

Quando os grãos apresentaram aproximadamente 20% de umidade foram colhidas oito espigas de cada parcela. As amostras foram secas em estufa a 50 °C por 24 horas e armazenadas a 4 °C até o momento do uso. Os grãos foram triturados assepticamente até granulometria de 50 *mesh*, evitando contaminação das amostras, para proceder-se às análises de teor de proteínas, contagem de bolores e leveduras e quantificação de fumonisinas.

### *Procedimento experimental*

A área experimental foi manejada no sistema de plantio direto, sendo o milho cultivado em sucessão a cultura do trigo nos dois locais. Para adubação com nitrogênio, fósforo e potássio (NPK) na semeadura utilizou-se 270 kg ha<sup>-1</sup> da fórmula 8-28-16, correspondendo a 21,6 kg ha<sup>-1</sup> de N, 75,6 kg ha<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e 43,2 kg ha<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>O. Antes da semeadura, as sementes foram divididas em duas porções sendo uma tratada com inoculante líquido comercial Azototal<sup>®</sup> contendo a bactéria *Azospirillum brasilense* estirpe Ab-V5 e Ab-V6, que contém 1x10<sup>8</sup> células viáveis por mL, na dose de 4 mL do produto comercial para cada kg de semente. Na região Norte, as semeaduras foram realizadas em 20/10/2010 e 27/10/2011, na Centro-Sul nos dias 08/12/2010 e 10/12/2011. Foram semeadas duas sementes por cova e

após a emergência das plantas foi realizado o desbaste, deixando apenas uma planta por cova e obtendo a população pré-definida 60 mil plantas ha<sup>-1</sup>.

A adubação nitrogenada de cobertura foi realizada no estágio V4, ou seja, plantas apresentando quatro folhas expandidas (RITCHIE; HANWAY, 1993). A fonte utilizada foi nitrato de amônio (32% N e 3% de K<sub>2</sub>O), aplicado em cobertura na superfície do solo nas quatro linhas das parcelas e sendo aplicada a mesma quantidade de potássio em todas as parcelas do experimento.

#### *Determinação de fumonisinas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)*

A extração e quantificação de fumonisinas por CLAE foram realizadas de acordo com a metodologia descrita por Shephard et al. (1990), modificada por Ueno et al. (1993) (itens 4.2.2 e 4.2.3).

#### *Avaliação da microbiota fúngica*

A metodologia utilizada esta descrita no item 4.2.4. Os gêneros fúngicos foram identificados de acordo com Nelson, Toussoun e Marasas (1983) e Samson, Hoeskstra e Frisvad (1996).

#### *Determinação de proteínas*

O teor de proteínas bruta foi determinado pelo método de Kjeldahl (AOAC, 1995) (item 4.2.5).

#### *Análise estatística*

A contagem fúngica, contaminação por fumonisinas e teor de proteínas foram avaliados por análise de variância seguida por teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). A análise estatística foi realizada no programa SISVAR (FERREIRA, 2011).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A Tabela 1 apresenta a análise de variância das características avaliadas em resposta a doses de N em cobertura e inoculação com *Azospirillum brasilense* nos anos agrícolas de 2010/2011 e 2011/2012, nas regiões Norte e Centro-Sul do Estado do Paraná. Os resultados mostram que as interações dose x inoculação, dose x ano, inoculação x ano e a interação tripla dose x inoculação x

ano não foram significativas em relação aos parâmetros avaliados no experimento conduzido na região Norte. Na região Centro-Sul, as interações duplas dose x ano e inoculação x ano, apresentaram efeito significativo sobre a contaminação por fumonisinas. A dose de N em cobertura influenciou significativamente ( $p < 0,05$ ) no teor de proteínas nos grãos de milho em ambos os locais. A inoculação de sementes com *A. brasilense* apresentou efeito significativo na contaminação por fumonisinas no experimento conduzido na região Centro-Sul. O fator de variação ano agrícola teve efeito significativo em relação ao teor de proteínas, contaminação por fumonisinas, *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp. As diferenças observadas entre os anos se devem, provavelmente, às condições climáticas diferenciadas ocorridas durante a condução do experimento, tanto na região Norte, quanto na Centro-Sul.

No experimento conduzido na região Norte, a porcentagem média de proteínas nos grãos de milho aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) com incremento das doses de N em cobertura nos dois anos agrícolas (Tabela 2). Houve aumento quadrático conforme incremento nas doses de N em cobertura até o máximo de 120 kg de N ha<sup>-1</sup>, ou seja, quanto maior a disponibilidade de N em cobertura, maior a resposta em relação ao teor de proteínas nos grãos (Figuras 3a e 3b). Este efeito foi observado em ambos os tratamentos, com e sem inoculação de *A. brasilense*, sendo que menores teores foram encontrados nos grãos colhidos de plantas que não receberam adubação com N e maiores nos tratamentos com 90 e 120 kg de N ha<sup>-1</sup>.

Na região Centro-Sul, o teor de proteínas nos grãos também aumentou com incremento das doses de N em cobertura nos dois anos de avaliação ( $p < 0,05$ ). Doses de 150 e 200 kg de N ha<sup>-1</sup> diferiram significativamente dos tratamentos com ausência de adubação em ambos os tratamentos, com e sem inoculação de *A. brasilense* (Tabela 3). O teor de proteínas ajustou-se a uma equação quadrática em função do incremento das doses de N em cobertura até a dose máxima de 200 kg de N ha<sup>-1</sup> (Figuras 4a e 4b).

Os efeitos da fertilização com N sobre o teor de proteínas em grãos de milho foram descritos por outros autores (FERREIRA et al., 2001; SANGOI; ERNANI; SILVA, 2007), tendo em vista que é um dos nutrientes requeridos em maior quantidade pelas plantas e que mais limita o crescimento. O nitrogênio faz parte de proteínas, ácidos nucléicos e muitos outros importantes constituintes celulares, incluindo membranas e diversos hormônios vegetais. Ferreira et al. (2001)

obtiveram aumento linear na concentração protéica nos grãos de milho aplicando doses crescentes de sulfato de amônio entre 0 e 210 kg ha<sup>-1</sup> (6,55 para 7,61%) e, apontaram a variação devido ao reforço da adubação perante biossíntese de aminoácidos.

Constatou-se que, no ano 2010/2011, o teor de proteínas nos grãos foi em média superior aos encontrados em 2011/2012, nos dois locais do experimento (Tabelas 2 e 3). Isso se deve provavelmente às condições climáticas durante o ciclo da cultura. Na região Norte, a precipitação pluviométrica no ano 2010/2011 foi aproximadamente 720 mm, maior que 2011/2012, que foi de 543 mm (Figuras 2a e 2b). Além disso, as precipitações em 2011/2012 foram mal distribuídas durante o ciclo, com períodos de excesso de chuvas alternados por períodos de estiagem, situação que pode ter sido desfavorável tanto para o desenvolvimento das plantas quanto para *A. brasilense*. Na região Centro-Sul, a precipitação pluviométrica em 2010/2011 foi cerca de 868,2 mm, maior que em 2011/2012, que foi de 733 mm, ao mesmo tempo, as precipitações neste local também foram mal distribuídas durante a condução do experimento em 2011/2012 (Figuras 2c e 2d).

Deve-se considerar ainda que a cultura antecessora em ambos os locais nos dois anos de avaliação foi trigo, ou seja, o manejo de cultura utilizado não foi o mais recomendado para cultura do milho. Espécies gramíneas possuem alta relação carbono:nitrogênio (C/N), com isso a velocidade de liberação de N de seus resíduos é lenta (AITA et al., 2004). A rotação de cultura entre uma leguminosa e uma gramínea (neste caso, o milho) é considerada uma prática efetiva para se obter melhor produção, tanto do milho quanto da leguminosa. O cultivo de leguminosas antecedendo o milho aumenta a disponibilidade de N no solo, a absorção de N pela planta e o rendimento de grãos, sendo o sistema de manejo com leguminosa importante para melhoria dos componentes de produção da cultura (OHLAND et al., 2005).

Os resultados obtidos mostram que inoculação de sementes com *A. brasilense* não desenvolveu o efeito esperado, ou seja, grãos de milho oriundos de plantas cujas sementes foram inoculadas não apresentaram maior teor de proteínas em comparação às não inoculadas. Pesquisas apontaram que inoculação com *A. brasilense* pode implicar em vários efeitos benéficos para planta, como melhora do sistema radicular e absorção de nutrientes pelas raízes. Por outro lado, foram relatados incrementos na absorção da água e minerais, maior tolerância a estresses

como salinidade e seca, resultando em uma planta mais vigorosa e produtiva (BASHAN; HOLGUIN, 1997; DOBBELAERE et al., 2001; BASHAN; HOLGUIN; DE-BASHAN, 2004).

Segundo Baldani et al. (1986), o sucesso da prática de inoculação de cereais em condições de campo dependerá de dois pré-requisitos: (a) seleção de estirpes que são superiores aos já presentes no solo e (b) estabelecimento e multiplicação das estirpes selecionadas na rizosfera e nas raízes, ou seja, durante cultivos consecutivos, o estabelecimento da estirpe inoculada será dependente de sua "competitividade" que, por sua vez, depende de fatores climáticos, do solo e da cultivar.

*Fusarium* spp., *Penicillium* spp. e leveduras foram os gêneros que prevaleceram na região Norte e Centro-Sul, sendo que o gênero *Aspergillus* spp., produtor de micotoxinas comumente encontrado em milho, não foi detectado (Figura 5). Na região Norte, *Fusarium* spp. foi detectado em 59,5% (2010/2011) e 80,0% (2011/2012), *Penicillium* spp. em 62,6% (2010/2011) e 100% (2011/2012) e leveduras em 51,3% (2010/2011) e 45,0% (2011/2012). Ono et al. (1999) avaliaram 64 amostras de milho recém-colhidas (safra 1995/1996) nas regiões Norte (n = 37) e Centro-Sul (n = 27) do Estado do Paraná e verificaram que os gêneros *Fusarium* e *Penicillium* foram predominantes com 100% de detecção nas duas regiões.

A Tabela 4 apresenta os resultados obtidos na contagem de *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. e leveduras em grãos de milho do campo experimental na região Norte, considerando o efeito de diferentes doses de N e inoculação de sementes com *A. brasilense*. Em 2010/2011, os grãos de milho apresentaram contaminação natural por *Fusarium* spp. (não detectável a  $8,8 \times 10^4$  UFC g<sup>-1</sup>), *Penicillium* spp. (não detectável a  $1,0 \times 10^6$  UFC g<sup>-1</sup>) e leveduras (não detectável a  $1,1 \times 10^7$  UFC g<sup>-1</sup>). No ano 2011/2012, *Fusarium* spp. (não detectável a  $4,5 \times 10^5$  UFC g<sup>-1</sup>), *Penicillium* spp. ( $4,0 \times 10^2$  a  $1,4 \times 10^8$  UFC g<sup>-1</sup>) e leveduras (não detectável a  $1,1 \times 10^7$  UFC g<sup>-1</sup>). Não houve diferença significativa entre os valores médios nas safras de 2010/2011 e 2011/2012, pelo teste de Tukey (p > 0,05).

Na região Centro-Sul, *Fusarium* spp. foi detectado em 85% (2010/2011) e 60% (2011/2012), *Penicillium* spp. em 92,5% (2010/2011) e 100% (2011/2012) e leveduras em 65% (2010/2011) e 85% (2011/2012) (Figura 5). A Tabela 5 apresenta os resultados obtidos na contagem de *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. e leveduras em grãos de milho na região Centro-Sul. No ano 2010/2011, os grãos de milho

apresentaram contaminação natural por *Fusarium* spp. (não detectável a  $1,4 \times 10^3$  UFC g<sup>-1</sup>), *Penicillium* spp. (não detectável a  $6,5 \times 10^4$  UFC g<sup>-1</sup>) e leveduras (não detectável a  $6,2 \times 10^6$  UFC g<sup>-1</sup>). No ano 2011/2012, *Fusarium* spp. (não detectável a  $3,4 \times 10^4$  UFC g<sup>-1</sup>), *Penicillium* spp. ( $5,9 \times 10^4$  a  $4,8 \times 10^6$  UFC g<sup>-1</sup>) e leveduras (não detectável a  $2,2 \times 10^7$  UFC g<sup>-1</sup>). Não houve diferença significativa entre os valores médios pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).

Os resultados obtidos na região Norte e na Centro-Sul mostraram que a inoculação de sementes com *A. brasilense* não apresentou efeito significativo quanto à contaminação fúngica de grãos de milho em comparação aos tratamentos que não receberam inoculação da bactéria. Os diferentes comportamentos das bactérias como agentes de biocontrole e a sua capacidade de inibição do crescimento fúngico e produção de micotoxinas demonstram que vários fatores interferem nos resultados da inoculação, como estirpe da bactéria, cultivar, tipo de solo, níveis de fertilização e, principalmente, condições climáticas.

Embora *Azospirillum* spp. não seja conhecido como um típico agente de controle biológico, tem sido relatado que algumas cepas são capazes de estimular o crescimento de plantas suprimindo indiretamente patógenos do solo e outros microorganismos nocivos em vários sistemas. Shah, Karkhanis e Desai (1992) relataram que *Azospirillum lipoferum* M produziu sideróforos do tipo catecol em condições de estresse por falta de ferro e apresentaram atividade antimicrobiana *in vitro* contra vários isolados de fungos, como *Aspergillus niger* e *Fusarium oxysporium*, por exemplo. Sideróforos produzidos por *Azospirillum brasilense* exibiram atividade antifúngica *in vitro* contra *Colletotrichum acutatum*, fungo causador de antracnose em morangos, reduzindo também os sintomas da doença em testes com a planta (TORTORA; DÍAZ-RICCI; PEDRAZA, 2011). Estudo realizado com várias estirpes de bactérias antagonistas mostrou que *Azospirillum* spp. apresentou efeito antagonista contra *Aspergillus flavus*, produtor de aflatoxinas, sendo capaz de degradar 95% da toxina *in vitro* (CHO; HONG; KANG, 2000).

As Tabelas 6 e 7 apresentam os níveis médios de contaminação dos grãos de milho por fumonisinas totais (FB<sub>1</sub> + FB<sub>2</sub>) nos anos agrícolas de 2010/2011 e 2011/2012. As diferentes doses de N em cobertura não exerceram efeito significativo sobre a contaminação por fumonisinas ( $p > 0,05$ ). Apesar de alguns tratamentos apresentarem diferenças, nenhuma tendência foi observada em relação às doses de N aplicadas. Este resultado difere dos obtidos por Blandino; Reyneri e

Vanara (2008), no qual relataram redução nas concentrações de FB<sub>1</sub> em grãos de milho com uso de doses crescentes de N (0, 200 e 300 kg ha<sup>-1</sup>).

Na região Norte, no ano 2010/2011, fumonisinas foram detectadas em 90% das amostras, considerando todos os tratamentos, com faixa de concentração de 0,02 a 2,24 µg g<sup>-1</sup> (média de 0,62 µg g<sup>-1</sup>) e, em 2011/2012, foram detectadas em 97,5%, com variação de não detectado a 21,41 µg g<sup>-1</sup> (média de 4,34 µg g<sup>-1</sup>) (Tabela 6). Os valores médios encontrados nos dois anos agrícolas ficaram abaixo do limite máximo de 5,0 µg g<sup>-1</sup> recomendado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2011). Nos dois anos de avaliação, em milho cujas sementes foram inoculadas com *A. brasilense*, 77,5% das amostras apresentaram concentrações de fumonisinas < 5,0 µg g<sup>-1</sup>, 15% > 5,0 µg g<sup>-1</sup> e em 7,5% não foram detectadas. Nos tratamentos sem inoculação, 82,5% apresentaram contaminação < 5,0 µg g<sup>-1</sup>, 12,5% > 5,0 µg g<sup>-1</sup> e em 5,0% não foram detectadas (Figura 6).

Na região Centro-Sul, no ano 2010/2011, fumonisinas foram detectadas em 45% das amostras, com variação de não detectado a 1,17 µg g<sup>-1</sup> (média de 0,14 µg g<sup>-1</sup>) e, em 2011/2012, foram detectadas em 100%, com variação de 0,07 a 15,26 µg g<sup>-1</sup> (média de 2,67 µg g<sup>-1</sup>) (Tabela 7). Os valores médios de fumonisinas encontrados na região Centro-Sul nos dois anos agrícolas ficaram abaixo do limite máximo de 5,0 µg g<sup>-1</sup> recomendado pela legislação brasileira. Considerando os dois anos de avaliação, em tratamentos que receberam inoculação com *A. brasilense*, 62,5% das amostras apresentaram níveis de fumonisinas < 5,0 µg g<sup>-1</sup>, 5,0% > 5,0 µg g<sup>-1</sup> e em 32,5% não foram detectadas. Nos tratamentos sem inoculação, 62,5% apresentaram contaminação < 5,0 µg g<sup>-1</sup>, 15,0% > 5,0 µg g<sup>-1</sup> e em 22,5% não foram detectadas (Figura 6).

Os resultados mostraram maiores níveis de fumonisinas nas amostras de milho da região Norte em comparação a Centro-Sul, indicando tendência regional na contaminação. Resultados semelhantes foram obtidos por Ono et al. (1999), que avaliaram milho recém-colhido no Estado do Paraná e detectaram fumonisinas em 100% das amostras (média de 6,76 µg g<sup>-1</sup>) na região Norte e em 96,3% (média de 0,78 µg g<sup>-1</sup>) na Centro-Sul.

A inoculação de sementes com *A. brasilense* na região Norte não mostrou efeito significativo para contaminação por fumonisinas ( $p > 0,05$ ). No entanto, ressalta-se que houve tendência de redução nos níveis de fumonisinas,

principalmente no ano 2010/2011 (Figura 7). Na região Centro-Sul, no ano 2010/2011, tratamentos com inoculação de sementes apresentaram, em média, menor contaminação em relação ao tratamento sem inoculação. Em 2011/2012, os tratamentos com inoculação apresentaram redução significativa ( $p < 0,05$ ) na contaminação em comparação ao tratamento sem inoculação (Figura 7).

Diversos trabalhos têm demonstrado a eficácia do uso de bactérias diazotróficas como agente de biocontrole contra *F. verticillioides* e produção de fumonisinas em milho. Pereira et al. (2010) estudaram o efeito de três agentes bacterianos, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Microbacterium oleovorans* e *Enterobacter hormaechei* para o controle na infecção por *F. verticillioides* e produção de fumonisinas em milho durante o ano 2006/2007. Os autores inocularam as bactérias em sementes no pré-plantio e em espigas durante a floração e constataram que o tratamento de sementes com *B. amyloliquefaciens* e *E. hormaechei* reduziram a infecção por *F. verticillioides* e contaminação por FB<sub>1</sub> nos dois anos do estudo, enquanto que FB<sub>1</sub> foi significativamente maior nos grãos oriundos de plantas que tiveram sementes tratadas com suspensão de *M. oleovorans*. No entanto, Pereira; Nesci e Etcheverry (2007) avaliaram o efeito do tratamento de semente de milho no ano 2004/2005 com a mesma cepa de *M. oleovorans* e verificaram diminuição nos níveis de fumonisinas, em comparação ao controle. Bacon e Hinton (2002) inocularam *Bacillus mojavensis* em sementes esterilizadas de milho e observaram uma redução na contaminação por FB<sub>1</sub> em plantas cultivadas em estufa submetidas a condições de estresse por falta de água, condição propícia para produção de fumonisinas.

Um problema com utilização de bactérias diazotróficas para controle de doenças é a possibilidade do agente patogênico combater o crescimento e proliferação do agente de controle biológico. Espécies de *Fusarium* podem produzir ácido fusárico, particularmente quando milho é cultivado sob tensões abióticas do solo (CAPASSO et al., 1996). O ácido fusárico é uma potente fitotoxina do milho (ARIAS, 1985) e um antibiótico para várias bactérias utilizadas como biocontrole de patógenos. Como foi demonstrado no caso da utilização de *B. mojavensis* em condições de campo, no qual resultaram em menor controle de *F. verticillioides* e produção de fumonisina, em comparação aos experimentos realizados em estufa (BACON et al, 2004).

Em 2010/2011, o nível médio de fumonisinas em milho foi significativamente menor ( $p < 0,05$ ) em comparação a 2011/2012, nos dois campos experimentais (Figura 7). Dois fatores podem ter atuado para este resultado: níveis de precipitação e cultura antecessora. Verificou-se que em 2011/2012 as precipitações foram em menor quantidade e mal distribuídas durante o ciclo da cultura, principalmente na região Norte (Figura 2a), causando possível estresse hídrico nas plantas, condição favorável à acumulação de micotoxinas (MUNKVOLD, 2003b). A cultura antecessora foi trigo nos dois locais do experimento, ou seja, cultivou-se trigo no período de outono/inverno e milho na primavera/verão por dois anos consecutivos. O plantio sucessivo de gramíneas contribui para sobrevivência de *Fusarium* spp. no campo, além disso, restos culturais servem como fonte de inóculo no campo (COTTON; MUNKVOLD, 1998; MILLER, 2001). Este pode ter sido fator importante para aumento na contaminação por fumonisinas no ano 2011/2012 (Figura 7). A rotação de culturas tem papel importante no controle de doenças e pragas. Na cultura do milho tem sido empregada no controle de ferrugens, helmintosporiose, antracnose, mancha de *Phaeosphaeria* (FANCELLI; DOURADO NETO, 2000).

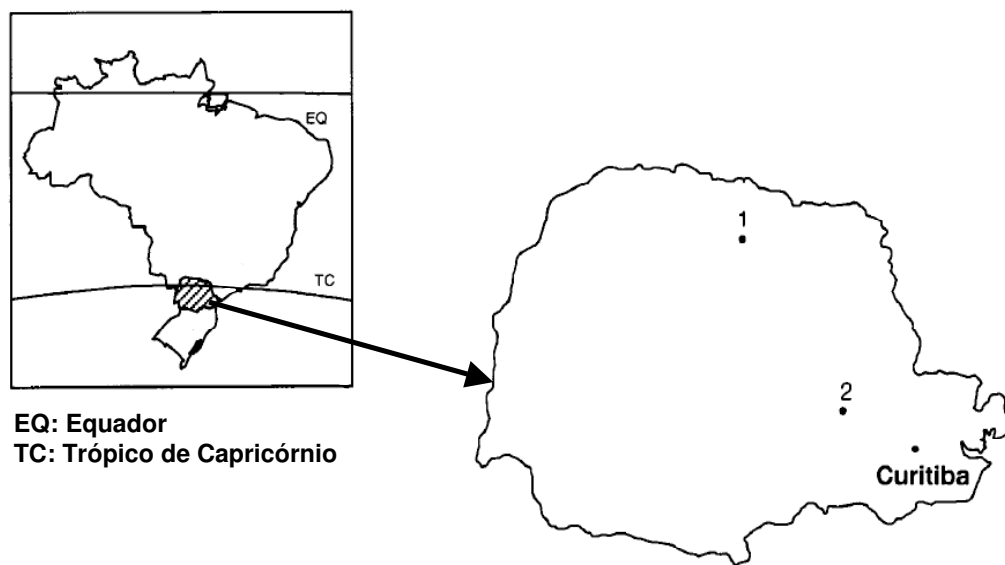
O uso de bactérias promotoras de crescimento de plantas, como *A. brasilense*, pode melhorar o sistema radicular e contribuir com a absorção de nutrientes pelas plantas, tornando-as mais resistentes a doenças e ao ataque de patógenos. Entretanto, resultados obtidos para o teor de proteínas nos grãos mostraram que a inoculação de sementes não contribuiu efetivamente para o acúmulo de nutrientes nas plantas. O baixo nível de contaminação por fumonisinas pode ser atribuído, entre outros fatores, à fertilidade natural do solo aliada a doses de N fornecida, as quais proporcionaram uma adubação balanceada e uma planta equilibrada nutricionalmente, aumentando assim sua resistência. Além disso, o híbrido utilizado (DKB390YG) possui tecnologia para controle da lagarta do cartucho (*Spodoptera frugiperda*), lagarta da espiga (*Helicoverpa zea*) e Broca do colmo (*Diatraea saccharalis*), que são pragas que podem atuar como vetores para penetração de fungos na espiga. A utilização de híbridos modernos com baixa suscetibilidade a infecção por *Fusarium* spp., que conduz à acumulação de fumonisinas em grãos de milho, tem sido considerado como método de prevenção mais eficiente para diminuir o risco de contaminação (PASCALE et al., 1997).

## CONCLUSÃO

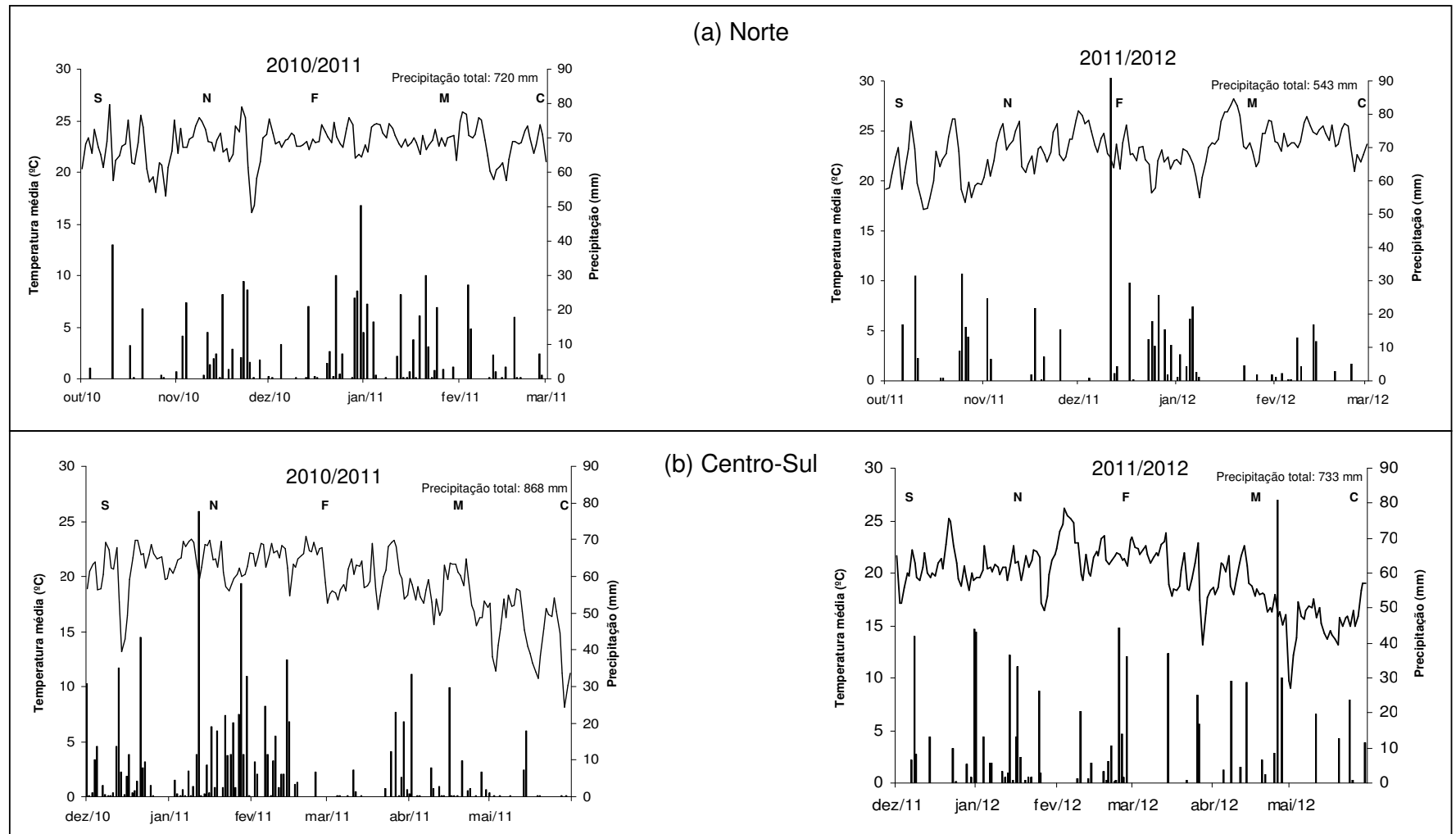
Amostras de milho que receberam inoculação com *A. brasilense* apresentaram redução nos níveis de fumonisinas, principalmente na região Centro-Sul, no qual houve redução significativa nos níveis de contaminação no segundo ano de experimento, em comparação aos tratamentos sem inoculação, indicando fator favorável quanto à condução sequencial de prática agrícola com inoculante.

O teor de proteínas em grãos aumentou com incremento nas doses de nitrogênio e a inoculação de sementes com *A. brasilense* não produziu efeito significativo para esta variável.

**Figura 1** – Locais de amostragem de milho nas regiões (1) Norte e (2) Centro-Sul do Estado do Paraná



**Figura 2** – Dados de temperatura média e precipitação durante o período de cultivo do milho nos anos agrícolas de 2010/2011 e 2011/2012 nas regiões (a) Norte e (b) Centro-Sul do Estado do Paraná



S = Semeadura; N = Adubação em cobertura; F = Florescimento; M = Maturação fisiológica e C = colheita.

**Tabela 1** – Análise de variância do teor de proteínas, contaminação fúngica e fumonisinas em grãos de milho em função de doses de N em cobertura e inoculação com *A. brasilense*, nos anos agrícolas de 2010/2011 (n = 40) e 2011/2012 (n = 40), regiões Norte e Centro-Sul do Estado do Paraná

Fonte de variação	GL	Quadrados médios				
		Proteínas (%)	Fumonisinias ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	<i>Fusarium</i> spp. (log UFC $\text{g}^{-1}$ )	<i>Penicillium</i> spp. (log UFC $\text{g}^{-1}$ )	Leveduras (log UFC $\text{g}^{-1}$ )
Região Norte						
Blocos	7	<b>1,333*</b>	43,146	19,470	5,648	3,791
Dose N (D)	4	<b>28,051*</b>	17,530	2,945	1,162	4,562
Inoculação (I)	1	0,033	3,989	0,001	0,492	1,283
Ano (A)	1	<b>30,027*</b>	<b>276,206*</b>	<b>16,419*</b>	<b>332,985*</b>	19,559
D*I	4	0,374	14,100	1,416	1,435	2,147
D*A	4	0,419	20,122	2,240	0,641	5,091
D*I*A	4	0,244	19,714	3,973	1,156	6,243
I*A	1	0,001	0,882	2,850	2,350	2,203
Média 2010/2011		8,39 <sup>a</sup>	0,62 <sup>b</sup>	1,89 <sup>b</sup>	2,06 <sup>b</sup>	2,46 <sup>a</sup>
Média 2011/2012		7,16 <sup>b</sup>	4,33 <sup>a</sup>	2,79 <sup>a</sup>	6,14 <sup>a</sup>	1,47 <sup>a</sup>
CV 1(%)		7,76	106,00	106,21	108,26	123,54
CV 2(%)		6,80	124,88	52,83	25,96	149,35
Região Centro-Sul						
Blocos	7	<b>0,245*</b>	1,459	19,470	0,115	0,745
Dose N (D)	4	<b>17,246*</b>	11,282	1,986	1,588	0,675
Inoculação (I)	1	0,189	<b>22,764*</b>	0,195	3,072	3,108
Ano (A)	1	<b>17,024*</b>	<b>127,808*</b>	<b>15,541*</b>	<b>24,444*</b>	<b>33,385*</b>
D*I	4	0,128	2,977	4,124	1,715	1,329
D*A	4	0,380	<b>13,040*</b>	1,833	1,202	2,112
D*I*A	4	0,105	2,515	1,639	1,124	0,910
I*A	1	0,374	<b>22,023*</b>	5,678	0,322	8,927
Média 2010/2011		8,31 <sup>a</sup>	0,14 <sup>b</sup>	1,86 <sup>b</sup>	4,53 <sup>b</sup>	2,39 <sup>b</sup>
Média 2011/2012		7,38 <sup>b</sup>	2,67 <sup>a</sup>	2,74 <sup>a</sup>	5,64 <sup>a</sup>	3,68 <sup>a</sup>
CV 1(%)		5,28	180,19	46,75	34,77	85,99
CV 2(%)		4,94	113,98	90,7	8,64	50,07

\*significativo a 5 % de probabilidade pelo teste F. GL = graus de liberdade. CV = coeficiente de variação. Média seguida pela mesma letra minúscula na vertical não apresenta diferença estatística pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 2** – Teor de proteínas em grãos de milho em função de doses de N em cobertura e inoculação (com e sem) de *Azospirillum brasilense* em sementes nos anos agrícolas de 2010/2011 (n = 40) e 2011/2012 (n = 40), região Norte do Paraná

Dose de N (kg ha <sup>-1</sup> )	Ano agrícola			
	2010/2011		2011/2012	
	Com	Inoculação com <i>A. brasilense</i>		Sem
		Sem	Com	
	Proteínas em grãos (%)			
0	6,36 ± 0,52 <sup>bB</sup>	7,24 ± 1,13 <sup>cA</sup>	5,23 ± 0,66 <sup>cA</sup>	5,33 ± 0,36 <sup>bA</sup>
30	7,55 ± 0,34 <sup>bA</sup>	7,56 ± 0,57 <sup>bcA</sup>	5,91 ± 0,30 <sup>cA</sup>	6,12 ± 0,36 <sup>bA</sup>
60	8,82 ± 0,26 <sup>aA</sup>	8,63 ± 0,91 <sup>abA</sup>	7,40 ± 0,74 <sup>bA</sup>	8,02 ± 0,86 <sup>aA</sup>
90	9,28 ± 0,91 <sup>abA</sup>	9,32 ± 0,43 <sup>aA</sup>	8,54 ± 0,69 <sup>abA</sup>	8,46 ± 0,33 <sup>aA</sup>
120	9,85 ± 0,47 <sup>aA</sup>	9,26 ± 0,50 <sup>aA</sup>	8,62 ± 0,42 <sup>aA</sup>	8,49 ± 0,40 <sup>aA</sup>
Média	8,37 ± 0,96 <sup>A</sup>	8,40 ± 1,41 <sup>A</sup>	7,13 ± 1,53 <sup>A</sup>	7,18 ± 1,41 <sup>A</sup>

Média seguida pela mesma letra minúscula na vertical não apresenta diferença estatística pelo teste de Tukey (p < 0,05).

Média seguida pela mesma letra maiúscula na horizontal, dentro do mesmo ano agrícola, não apresenta diferença estatística pelo teste de Tukey (p < 0,05).

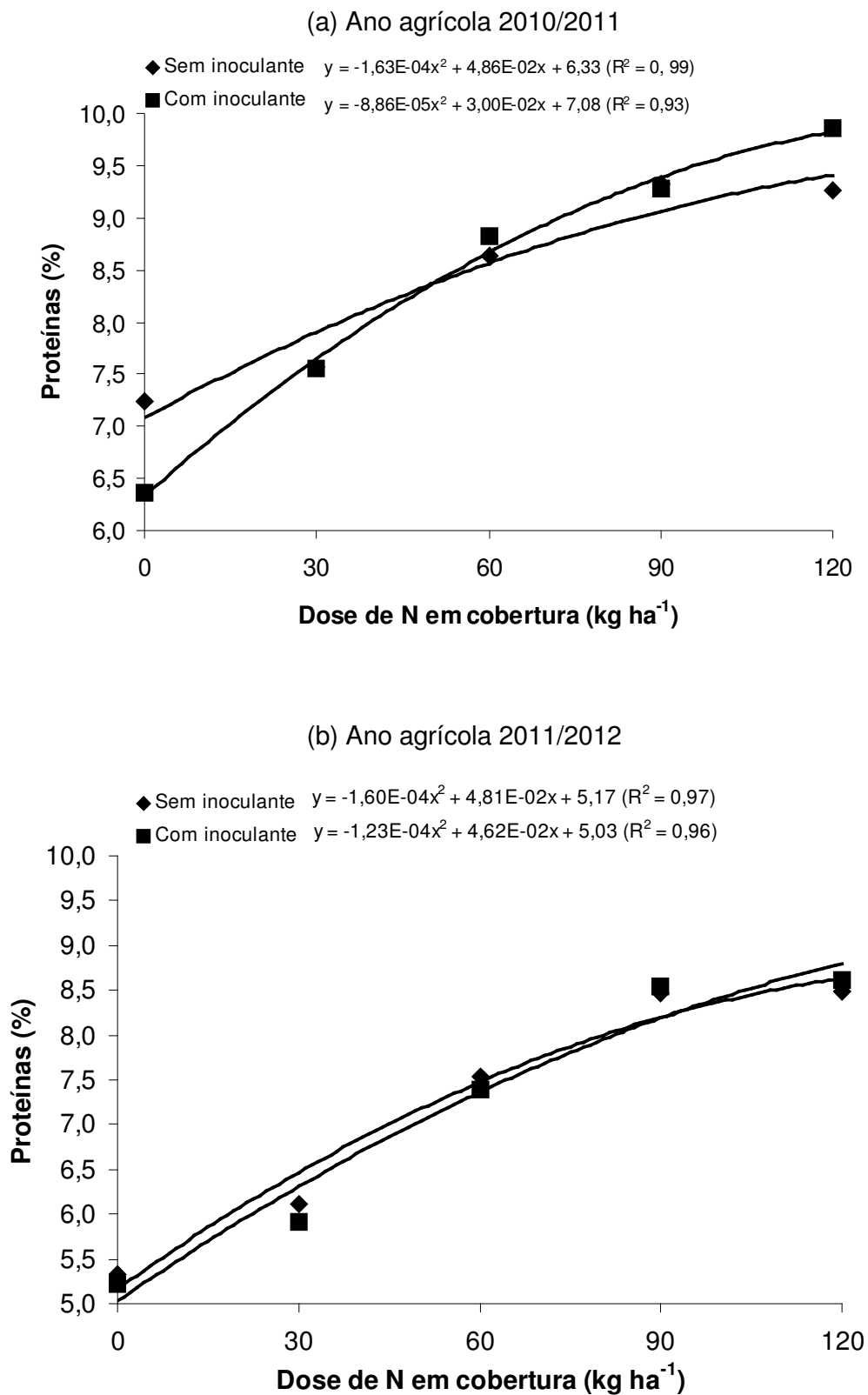
**Tabela 3** – Teor de proteínas em grãos de milho em função de doses de N em cobertura e inoculação (com e sem) de *Azospirillum brasilense* em sementes nos anos agrícolas de 2010/2011 (n = 40) e 2011/2012 (n = 40), região Centro-Sul do Paraná

Dose de N (kg ha <sup>-1</sup> )	Ano agrícola			
	2010/2011		2011/2012	
	Com	Inoculação com <i>A. brasilense</i>		Sem
		Sem	Com	
	Proteínas em grãos (%)			
0	7,05 ± 0,58 <sup>cA</sup>	6,92 ± 0,75 <sup>bA</sup>	5,66 ± 0,36 <sup>dA</sup>	5,55 ± 0,26 <sup>cA</sup>
50	8,00 ± 0,28 <sup>bA</sup>	7,65 ± 1,10 <sup>bA</sup>	7,06 ± 0,25 <sup>cA</sup>	6,72 ± 0,30 <sup>bA</sup>
100	8,67 ± 0,21 <sup>abA</sup>	8,85 ± 0,24 <sup>aA</sup>	7,78 ± 0,28 <sup>bcA</sup>	7,72 ± 0,31 <sup>aA</sup>
150	8,48 ± 0,46 <sup>abA</sup>	8,95 ± 0,36 <sup>aA</sup>	8,27 ± 0,19 <sup>abA</sup>	7,97 ± 0,47 <sup>aA</sup>
200	9,25 ± 0,46 <sup>aA</sup>	9,29 ± 0,35 <sup>aA</sup>	8,76 ± 0,22 <sup>aA</sup>	8,40 ± 0,73 <sup>aA</sup>
Média	8,29 ± 1,00 <sup>A</sup>	8,33 ± 0,83 <sup>A</sup>	7,50 ± 1,14 <sup>A</sup>	7,27 ± 1,20 <sup>A</sup>

Média seguida pela mesma letra minúscula na vertical não apresenta diferença estatística pelo teste de Tukey (p < 0,05).

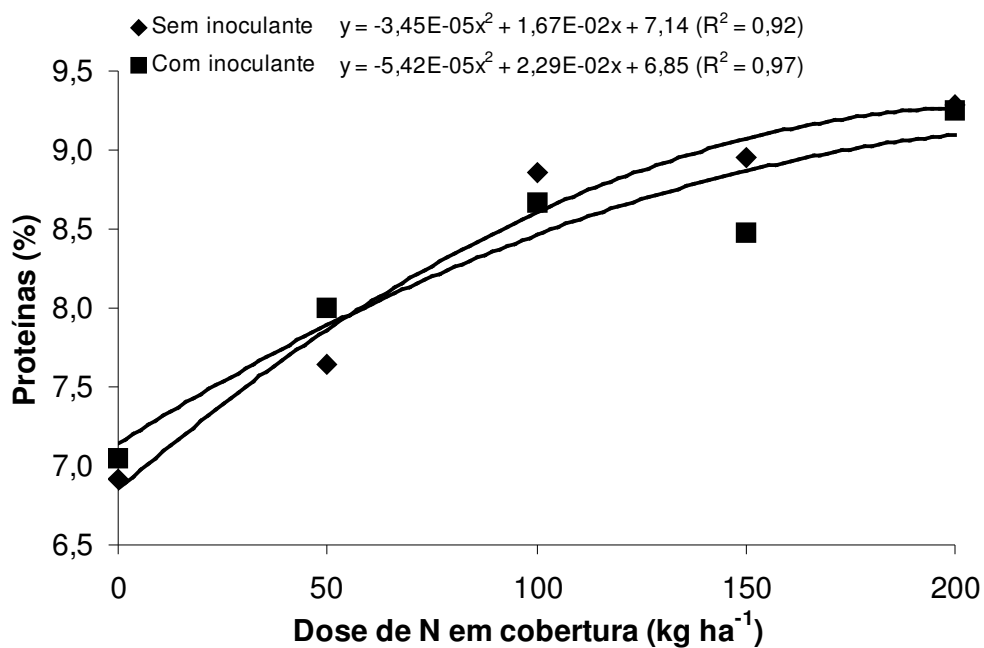
Média seguida pela mesma letra maiúscula na horizontal, dentro do mesmo ano agrícola, não apresenta diferença estatística pelo teste de Tukey (p < 0,05).

**Figura 3** – Porcentagem média de proteínas em grãos de milho em função de doses de N em cobertura e aplicação de *A. brasilense* em sementes nos anos agrícolas de 2010/2011 (n = 40) e 2011/2012 (n = 40), Norte - PR

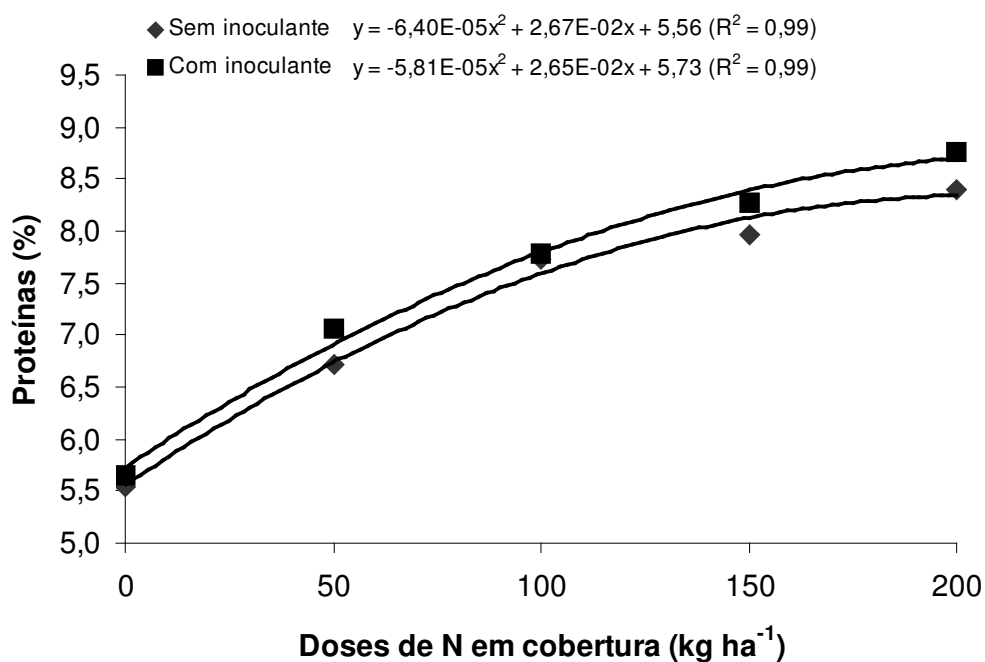


**Figura 4** – Porcentagem média de proteínas em grãos de milho em função de doses de N em cobertura e aplicação de *A. brasilense* em sementes nos anos agrícolas de 2010/2011 (n = 40) e 2011/2012 (n = 40), Centro-Sul - PR

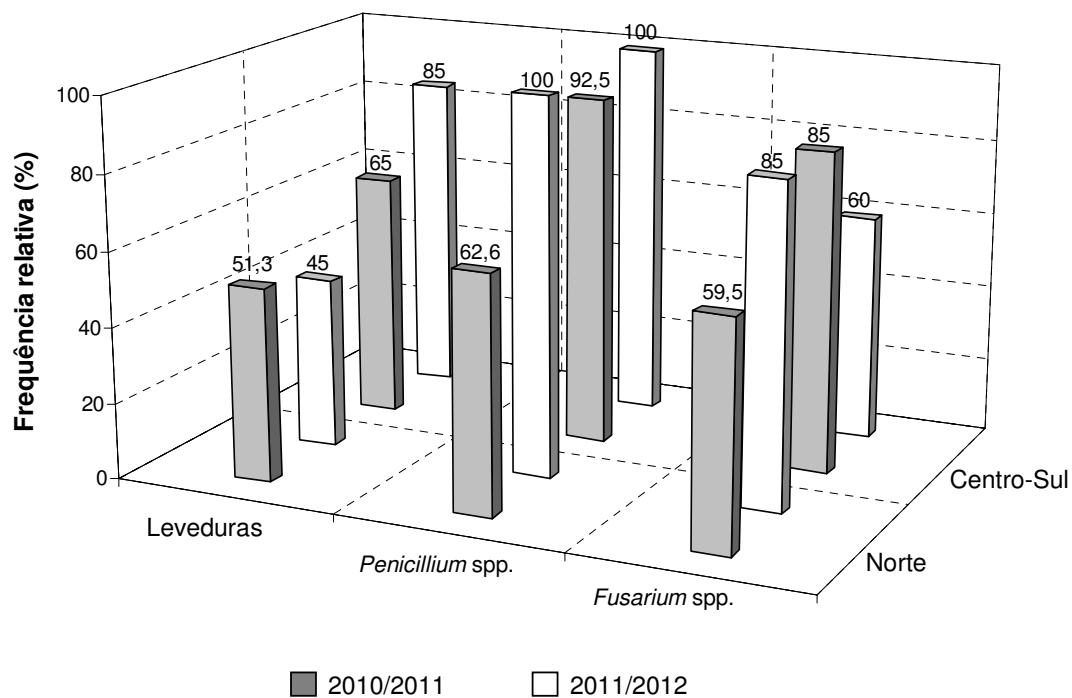
(a) Ano agrícola 2010/2011



(b) Ano agrícola 2011/2012



**Figura 5** - Frequência relativa dos principais gêneros fúngicos em amostras de milho submetidas a diferentes doses de N em cobertura e inoculação (com e sem) de *Azospirillum brasilense* em sementes nos anos agrícolas de 2010/2011 e 2011/2012, regiões Norte (n = 40) e Centro-Sul (n = 40) do Estado do Paraná



**Tabela 4** - Contaminação fúngica de grãos de milho (n = 40) em função de doses de N em cobertura e inoculação das sementes com *Azospirillum brasilense* na região Norte do Estado do Paraná (anos 2010/2011 e 2011/2012)

Ano	Dose N (kg ha <sup>-1</sup> )	<i>Fusarium</i> spp. (UFC g <sup>-1</sup> )		<i>Penicillium</i> spp. (UFC g <sup>-1</sup> )		Leveduras (UFC g <sup>-1</sup> )	
		Inoculação com <i>Azospirillum brasilense</i>					
		Com	Sem	Com	Sem	Com	Sem
2010/2011	0	ND	3,00 x 10 <sup>4</sup> <sup>a</sup>	2,28 x 10 <sup>4</sup> <sup>a</sup>	2,50 x 10 <sup>3</sup> <sup>a</sup>	7,74 x 10 <sup>4</sup> <sup>a</sup>	4,07 x 10 <sup>6</sup> <sup>a</sup>
	30	1,18 x 10 <sup>4</sup> <sup>a</sup>	5,30 x 10 <sup>3</sup> <sup>a</sup>	1,01 x 10 <sup>5</sup> <sup>a</sup>	1,07 x 10 <sup>4</sup> <sup>a</sup>	1,06 x 10 <sup>7</sup> <sup>a</sup>	1,87 x 10 <sup>6</sup> <sup>a</sup>
	60	7,23 x 10 <sup>3</sup> <sup>a</sup>	5,75 x 10 <sup>3</sup> <sup>a</sup>	3,73 x 10 <sup>3</sup> <sup>a</sup>	2,04 x 10 <sup>4</sup> <sup>a</sup>	1,26 x 10 <sup>6</sup> <sup>a</sup>	2,76 x 10 <sup>6</sup> <sup>a</sup>
	90	2,26 x 10 <sup>3</sup> <sup>a</sup>	4,60 x 10 <sup>3</sup> <sup>a</sup>	3,38 x 10 <sup>5</sup> <sup>a</sup>	5,69 x 10 <sup>4</sup> <sup>a</sup>	1,00 x 10 <sup>5</sup> <sup>a</sup>	2,00 x 10 <sup>2</sup> <sup>a</sup>
	120	6,90 x 10 <sup>3</sup> <sup>a</sup>	3,35 x 10 <sup>4</sup> <sup>a</sup>	5,81 x 10 <sup>4</sup> <sup>a</sup>	1,95 x 10 <sup>4</sup> <sup>a</sup>	4,31 x 10 <sup>6</sup> <sup>a</sup>	1,58 x 10 <sup>6</sup> <sup>a</sup>
2011/2012	0	4,03 x 10 <sup>3</sup> <sup>a</sup>	4,10 x 10 <sup>3</sup> <sup>a</sup>	7,54 x 10 <sup>6</sup> <sup>a</sup>	2,45 x 10 <sup>7</sup> <sup>a</sup>	3,90 x 10 <sup>7</sup> <sup>a</sup>	2,67 x 10 <sup>2</sup> <sup>a</sup>
	30	5,00 x 10 <sup>2</sup> <sup>a</sup>	4,80 x 10 <sup>3</sup> <sup>a</sup>	1,59 x 10 <sup>6</sup> <sup>a</sup>	4,19 x 10 <sup>7</sup> <sup>a</sup>	8,23 x 10 <sup>3</sup> <sup>a</sup>	1,53 x 10 <sup>6</sup> <sup>a</sup>
	60	3,31 x 10 <sup>4</sup> <sup>a</sup>	4,25 x 10 <sup>2</sup> <sup>a</sup>	1,22 x 10 <sup>7</sup> <sup>a</sup>	3,50 x 10 <sup>6</sup> <sup>a</sup>	ND	5,05 x 10 <sup>3</sup> <sup>a</sup>
	90	1,01 x 10 <sup>4</sup> <sup>a</sup>	2,08 x 10 <sup>4</sup> <sup>a</sup>	5,10 x 10 <sup>6</sup> <sup>a</sup>	6,22 x 10 <sup>6</sup> <sup>a</sup>	3,50 x 10 <sup>2</sup> <sup>a</sup>	2,51 x 10 <sup>4</sup> <sup>a</sup>
	120	3,38 x 10 <sup>4</sup> <sup>a</sup>	1,17 x 10 <sup>5</sup> <sup>a</sup>	3,76 x 10 <sup>6</sup> <sup>a</sup>	6,38 x 10 <sup>6</sup> <sup>a</sup>	1,00 x 10 <sup>2</sup> <sup>a</sup>	4,50 x 10 <sup>2</sup> <sup>a</sup>

Média seguida pela mesma letra minúscula na vertical não apresenta diferença estatística pelo teste de Tukey (p < 0,05).

ND = não detectado.

**Tabela 5** - Contaminação fúngica de grãos de milho (n = 40) em função de doses de N em cobertura e inoculação das sementes com *Azospirillum brasilense* na região Centro-Sul do Estado do Paraná (anos 2010/2011 e 2011/2012)

Ano	Dose N (kg ha <sup>-1</sup> )	<i>Fusarium</i> spp. (log UFC g <sup>-1</sup> )		<i>Penicillium</i> spp. (log UFC g <sup>-1</sup> )		Leveduras (log UFC g <sup>-1</sup> )	
		Inoculação com <i>Azospirillum brasilense</i>					
		Com	Sem	Com	Sem	Com	Sem
2010/2011	0	4,29 x 10 <sup>3a</sup>	2,11 x 10 <sup>3a</sup>	5,94 x 10 <sup>5a</sup>	1,86 x 10 <sup>5a</sup>	1,55 x 10 <sup>6a</sup>	1,11 x 10 <sup>4a</sup>
	50	6,63 x 10 <sup>2a</sup>	3,03 x 10 <sup>3a</sup>	2,95 x 10 <sup>4a</sup>	1,18 x 10 <sup>5a</sup>	4,45 x 10 <sup>3a</sup>	3,37 x 10 <sup>4a</sup>
	100	1,03 x 10 <sup>3a</sup>	6,78 x 10 <sup>3a</sup>	9,02 x 10 <sup>4a</sup>	5,90 x 10 <sup>5a</sup>	8,13 x 10 <sup>2a</sup>	1,89 x 10 <sup>3a</sup>
	150	2,75 x 10 <sup>3a</sup>	4,65 x 10 <sup>3a</sup>	3,16 x 10 <sup>5a</sup>	2,86 x 10 <sup>5a</sup>	4,84 x 10 <sup>3a</sup>	3,10 x 10 <sup>4a</sup>
	200	2,95 x 10 <sup>3a</sup>	5,35 x 10 <sup>3a</sup>	5,18 x 10 <sup>4a</sup>	6,37 x 10 <sup>5a</sup>	1,68 x 10 <sup>3a</sup>	3,38 x 10 <sup>3a</sup>
2011/2012	0	1,25 x 10 <sup>3a</sup>	ND	6,21 x 10 <sup>5a</sup>	6,67 x 10 <sup>5a</sup>	5,48 x 10 <sup>6a</sup>	3,75 x 10 <sup>4a</sup>
	50	1,01 x 10 <sup>3a</sup>	7,75 x 10 <sup>2a</sup>	5,31 x 10 <sup>5a</sup>	7,66 x 10 <sup>5a</sup>	1,46 x 10 <sup>4a</sup>	3,05 x 10 <sup>5a</sup>
	100	1,14 x 10 <sup>3a</sup>	2,55 x 10 <sup>3a</sup>	1,79 x 10 <sup>5a</sup>	1,73 x 10 <sup>6a</sup>	7,86 x 10 <sup>4a</sup>	2,18 x 10 <sup>4a</sup>
	150	5,25 x 10 <sup>2a</sup>	3,63 x 10 <sup>2a</sup>	8,13 x 10 <sup>5a</sup>	1,57 x 10 <sup>6a</sup>	2,58 x 10 <sup>4a</sup>	1,12 x 10 <sup>4a</sup>
	200	6,25 x 10 <sup>2a</sup>	1,12 x 10 <sup>4a</sup>	2,50 x 10 <sup>5a</sup>	1,07 x 10 <sup>6a</sup>	1,68 x 10 <sup>4a</sup>	1,46 x 10 <sup>4a</sup>

Média seguida pela mesma letra minúscula na vertical não apresenta diferença estatística pelo teste de Tukey (p < 0,05).

ND = não detectado.

**Tabela 6** – Fumonisinas totais (FB<sub>1</sub> + FB<sub>2</sub>) em grãos de milho em função de diferentes doses de N e inoculação (com e sem) de *Azospirillum brasilense* em sementes nos anos 2010/2011 (n = 40) e 2011/2012 (n = 40), região Norte do Paraná

Dose N (kg ha <sup>-1</sup> )	Ano agrícola			
	2010/2011		2011/2012	
	Inoculação com <i>A. brasilense</i>			
	Com	Sem	Com	Sem
	Fumonisinas (µg g <sup>-1</sup> )			
0	0,10 ± 0,10 <sup>aA</sup>	1,00 ± 1,04 <sup>aA</sup>	11,24 ± 10,18 <sup>aA</sup>	4,87 ± 4,91 <sup>aB</sup>
30	0,12 ± 0,11 <sup>aA</sup>	0,45 ± 0,38 <sup>aA</sup>	2,64 ± 3,15 <sup>bA</sup>	5,35 ± 6,85 <sup>aA</sup>
60	0,68 ± 0,31 <sup>aA</sup>	0,63 ± 0,92 <sup>aA</sup>	0,50 ± 0,71 <sup>bA</sup>	4,61 ± 5,09 <sup>aA</sup>
90	0,40 ± 0,47 <sup>aA</sup>	1,74 ± 1,02 <sup>aA</sup>	3,58 ± 1,73 <sup>bA</sup>	3,00 ± 1,42 <sup>aA</sup>
120	0,19 ± 0,25 <sup>aA</sup>	0,94 ± 0,78 <sup>aA</sup>	3,15 ± 3,38 <sup>bA</sup>	4,46 ± 7,77 <sup>aA</sup>
Média (µg g <sup>-1</sup> )	0,62 ± 0,74		4,33 ± 5,41	
Amostras positivas	36 (90%)		39 (97,5%)	

Média seguida pela mesma letra minúscula na vertical não apresenta diferença estatística pelo teste de Tukey (p < 0,05).

Média seguida pela mesma letra maiúscula na horizontal, dentro do mesmo ano, não apresenta diferença estatística pelo teste de Tukey (p < 0,05).

**Tabela 7** – Fumonisinas totais (FB<sub>1</sub> + FB<sub>2</sub>) em grãos de milho em função de diferentes doses de N e inoculação (com e sem) de *Azospirillum brasilense* em sementes nos anos 2010/2011 (n = 40) e 2011/2012 (n = 40), região Centro-Sul do Paraná

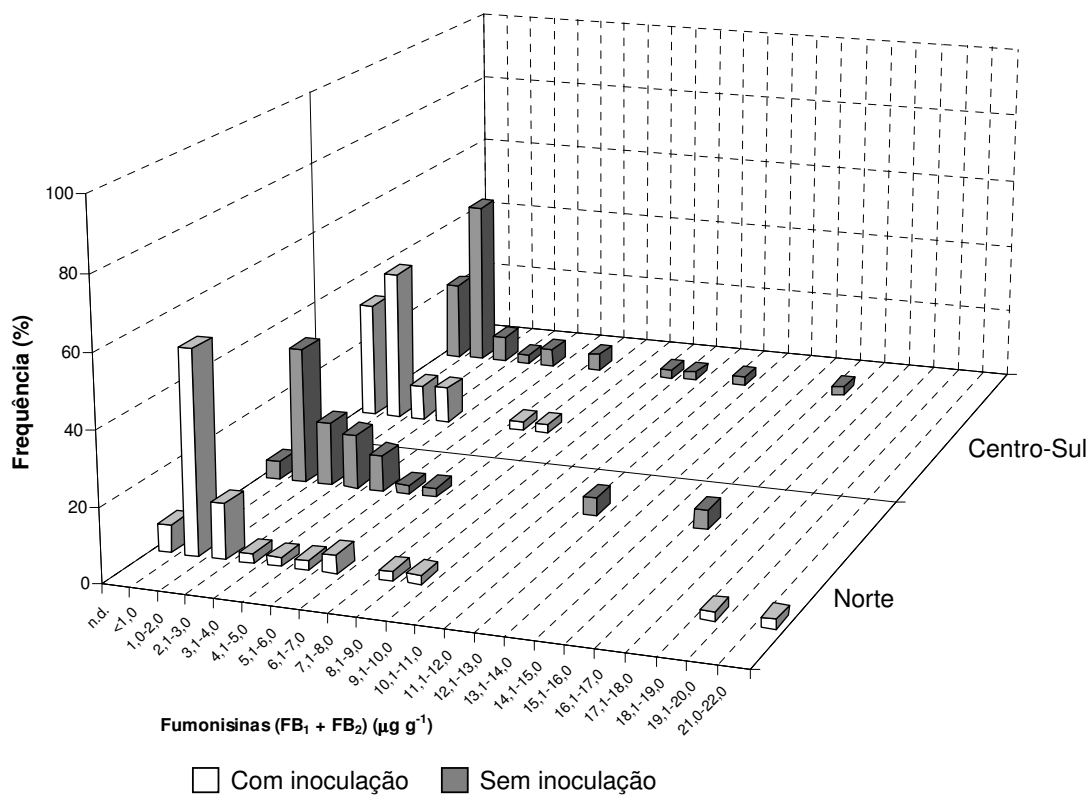
Dose N (kg ha <sup>-1</sup> )	Ano agrícola			
	2010/2011		2011/2012	
	Inoculação com <i>A. brasilense</i>			
	Com	Sem	Com	Sem
	Fumonisinas (µg g <sup>-1</sup> )			
0	ND	0,08 ± 0,13 <sup>a</sup>	2,75 ± 2,57 <sup>aB</sup>	6,98 ± 6,38 <sup>aA</sup>
50	0,11 ± 0,22 <sup>aA</sup>	0,17 ± 0,30 <sup>aA</sup>	0,97 ± 0,07 <sup>aA</sup>	1,86 ± 2,31 <sup>bcA</sup>
100	0,42 ± 0,51 <sup>aA</sup>	0,25 ± 0,47 <sup>aA</sup>	0,82 ± 0,83 <sup>aA</sup>	1,07 ± 0,37 <sup>cA</sup>
150	0,14 ± 0,19 <sup>aA</sup>	0,21 ± 0,18 <sup>aA</sup>	2,46 ± 2,16 <sup>aB</sup>	5,84 ± 5,24 <sup>abA</sup>
200	ND	0,05 ± 0,08 <sup>a</sup>	1,11 ± 1,04 <sup>aA</sup>	2,91 ± 2,14 <sup>abcA</sup>
Média (µg g <sup>-1</sup> )	0,14 ± 0,26		2,67 ± 3,30	
Amostras positivas	18 (45%)		40 (100%)	

Média seguida pela mesma letra minúscula na vertical não apresenta diferença estatística pelo teste de Tukey (p < 0,05).

Média seguida pela mesma letra maiúscula na horizontal, dentro do mesmo ano, não apresenta diferença estatística pelo teste de Tukey (p < 0,05).

ND = não detectado.

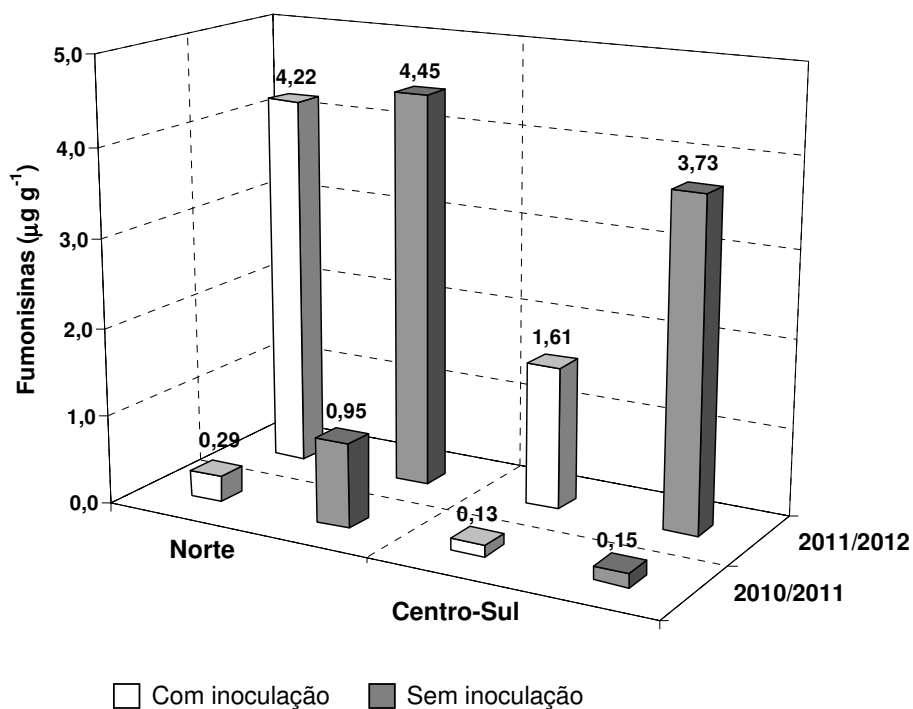
**Figura 6** – Distribuição dos níveis de fumonisinas totais ( $FB_1 + FB_2$ ) em grãos de milho em função da inoculação (com e sem) de *Azospirillum brasilense* em sementes, nos anos agrícolas de 2010/2011 e 2011/2012, regiões Norte (n = 80) e Centro-Sul (n = 80) do Estado do Paraná



Região	Norte		Centro-Sul	
	Com	Sem	Com	Sem
Amostras positivas	37 (92,5%)	38 (95,0%)	27 (67,5%)	31 (77,5%)
Média ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	$2,25 \pm 4,55$	$2,70 \pm 4,01$	$0,87 \pm 1,39$	$1,94 \pm 3,46$
Faixa ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	ND – 21,40	ND – 16,00	ND – 6,49	ND – 15,25

ND = não detectado.

**Figura 7** – Valores médios de fumonisinas totais (FB<sub>1</sub> + FB<sub>2</sub>) em grãos de milho em função da inoculação (com e sem) de *Azospirillum brasilense* em sementes, comparando os anos agrícolas de 2010/2011 (n = 40) e 2011/2012 (n = 40), regiões Norte e Centro-Sul do Estado do Paraná



Região	Inoculação	Fumonisinias totais (µg g <sup>-1</sup> )	
		2010/2011	2011/2012
Norte	Com	0,29 ± 0,39 <sup>aA</sup>	4,22 ± 5,86 <sup>aB</sup>
	Sem	0,95 ± 0,89 <sup>aA</sup>	4,45 ± 5,08 <sup>aB</sup>
Centro-Sul	Com	0,13 ± 0,25 <sup>aA</sup>	1,61 ± 1,68 <sup>aB</sup>
	Sem	0,15 ± 0,28 <sup>aA</sup>	3,73 ± 4,23 <sup>bB</sup>

Média seguida pela mesma letra minúscula na vertical, dentro da mesma localidade, não apresenta diferença estatística pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Média seguida pela mesma letra maiúscula na horizontal não apresenta diferença estatística pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

## **8 CONCLUSÃO GERAL**

Práticas agrícolas são procedimentos complementares ao melhoramento genético na busca de melhor rendimento na cultura do milho. Estas não afetaram a contaminação fúngica, mas o mesmo não se pode afirmar em relação à contaminação por fumonisinas, assim como a composição química de grãos. Embora exista estímulo à produção orgânica, não se recomenda o uso de lixo de aterro sanitário na produção de milho.

## 9 REFERÊNCIAS

- ABIMILHO (Associação Brasileira das Indústrias do Milho). 2006. Disponível em: <<http://www.abimilho.com.br>>. Acesso em 14 jun. 2011.
- AITA, C.; GIACOMINI, S.J.; HÜBNER, A.P.; CHIAPINOTTO, I.C.; FRIES, M.R. Consorciação de plantas de cobertura antecedendo o milho em plantio direto. I - dinâmica do nitrogênio no solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, n. 28, p. 739-749, 2004.
- ALMASRI, M.N.; KALUARACHCHI, J.J., Assessment and management of long-term nitrate pollution of ground in agriculture-dominated watersheds. **Journal of Hydrology**, v. 295, p. 225-245, 2004.
- ANJOS, A.R.M.; MATTIAZZO, M.E. Metais pesados em plantas de milho cultivadas em latossolos repetidamente tratados com biossólidos. **Scientia Agricola**, v. 57, p. 769-776, 2000.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). **Official Methods of Analysis**. 16<sup>th</sup> ed. Washington DC: AOAC, v. 2, 1995.
- ARIAS, J.A. Secretary organelle and mitochondrial alterations induced by fusaric acid in root cells of *Zea mays*. **Physiological Plant Pathology**, v. 27, p. 149-158, 1985.
- ARIÑO, A.; ESTOPAÑAN, G.; JUAN, T.; HERRERA, A. Estimation of dietary intakes of fumonisins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> from conventional and organic corn. **Food Control**, v. 18, n. 9, p. 1058-1062, 2007.
- BACON, C.W.; HINTON, D.M. Endophytic and biological control potential of *Bacillus mojavensis* and related species. **Biological Control**, v. 23, p. 274-284, 2002.
- BACON, C.W.; HINTON, D.M.; PORTER, J.K.; GLENN, A.E.; KULDAU, G. Fusaric acid, a *Fusarium verticillioides* metabolite, antagonistic to the endophytic biocontrol bacterium *Bacillus mojavensis*. **Canadian Journal of Botany**, v. 82, n. 7, p. 878-885, 2004.
- BALDANI, V.L.D.; ALVAREZ, M.A.B.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Establishment of inoculated *Azospirillum* spp. in the rhizosphere and in roots of field grown wheat and sorghum. **Plant and Soil**, v. 90, p. 35-46, 1986.
- BARLAZ, M.A. Microbial studies of landfills and anaerobic refuse decomposition. In: HURST, C.J.; KNUDSEN, G.R.; MCINERNEY, M.J.; STETZENBACH, L.D.; WALTER, M.V. **Manual of Environmental Microbiology**. Washington: ASM Press, 1996. p. 541-557.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 103-121, 1997.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; DE-BASHAN, L.E. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, p. 521-577, 2004.
- BATTILANI, P.; ROSSI, V.; PIETRI, A. Modelling *Fusarium verticillioides* infection and fumonisin synthesis in maize ears. **Aspects of Applied Biology**, v. 68, p. 91-100, 2003.
- BEZUIDENHOUT, S.C.; GELDERBLOM, W.C.A.; GORST-ALLMAN, C.P.; HORAK, R.M.; MARASAS, W.F.O.; SPITELLER, G. Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. **Journal of the Chemical Society – Chemical Communications**, v. 19, p. 743-745, 1988.
- BILGRAMI, K.S.; CHOUDHARY, A.K. Mycotoxins in preharvest contamination of agricultural crops. In: SINHA, K.K., BHATNAGAR, D. **Mycotoxins in Agriculture and Food Safety**. New York: Marcel Dekker, 1998. p. 1-43.
- BLANDINO, M.; REYNERI, A.; VANARA, F. Effect of plant density on toxigenic fungal infection and mycotoxin contamination of maize kernels. **Field Crops Research**, v. 106, p. 234-241, 2007.
- BLANDINO, M.; REYNERI, A.; VANARA, F. Influence of nitrogen fertilization on mycotoxin contamination of maize kernels. **Crop Protection**, v. 27, p. 222-230, 2008.

- BLANDINO, M.; REYNERI, A.; VANARA, F.; FERREO, C. Control of mycotoxins in corn from harvesting to processing operation. In: **Proceedings of International Quality Grains Conference**, 2004.
- BLOEMBERG, G.V.; LUGTENBERG, B.J.J. Molecular basis of plant growth promotion and biological control by rhizobacteria. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 4, p. 343–350, 2001.
- BOS, H.J.; VOS, J.; STRUIK, P.C. Morphological analysis of plant density effects on early leaf area growth in maize. **Netherlands Journal of Agricultural Science**, v. 48, p. 199-212, 2000.
- BRANHAM, B.E.; PLATTNER, R.D. Alanine is a Precursor in the Biosynthesis of Fumonisin B1 by *Fusarium moniliforme*. **Mycopathologia**, v. 124, p. 99-104, 1993.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Portaria nº 685 de 27 de agosto de 1998. Aprova o Regulamento Técnico: "Princípios Gerais para o Estabelecimento de Níveis Máximos de Contaminantes Químicos em Alimentos" e seu Anexo: "Limites Máximos de Tolerância para Contaminantes Inorgânicos". **Diário Oficial da União**, Brasília, seção 1, n. 165-E, p. 28-29, 28 ago. 1998.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução - RDC Nº 7, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, seção 1, n. 37, p. 72-73, 22 fev. 2011.
- BRASIL. Decreto nº 55871, de 26 de março de 1965. Modifica o Decreto nº 50.040, de 24 de janeiro de 1961, referente a normas reguladoras do emprego de aditivos para alimentos, alterado pelo Decreto nº 691, de 13 de março de 1962. **Diário Oficial da União**, Brasília, 26 mar. 1965.
- BRASIL. Lei nº 12.305, de 2 de agosto de 2010. Institui a Política Nacional de Resíduos Sólidos; altera a Lei nº 9.605, de 12 de fevereiro de 2008; e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, seção 1, p. 3-7, 03 ago. 2010.
- BRUNS, H.A. Controlling aflatoxin and fumonisin in maize by crop management. **Journal of Toxicology - Toxin Reviews**, n. 2 e 3, p. 153-173, 2003.
- BRUNS, H.A.; ABBAS, H.K.; Ultra-high plant populations and nitrogen fertility effects on corn in the Mississippi Valley. **Agronomy Journal**: Published by American Society of Agronomy, v. 97, p. 1136-1140, 2005.
- BÜLL, L.T. Nutrição mineral do milho. In:\_\_\_\_\_. BÜLL, L.T.; CANTARELLA, H., eds, **Cultura do milho: fatores que afetam a produtividade**. Piracicaba: Potafos, 1993. p. 63-145.
- BUYER, J.S.; KAUFMAN, D.D. Microbial diversity in the rhizosphere of corn grown under conventional and low-input systems. **Applied soil Ecology**, v. 5, p. 21-27, 1996.
- CANTARELLA, H. Nitrogênio. In: NOVAIS, R.F.; ALVAREZ, V.H.; BARROS, N.F; FONTES, R.L.; CANTARUTTI, R.B.; NEVES, J.C.L. **Fertilidade do solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007. p. 375-470.
- CANTARELLA, H.; MATTOS, D.; QUAGGIO, J.A.; RIGOLIN, A.T. Fruit yield of Valencia sweet orange fertilized with different N sources and the loss of applied N. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v. 67, p. 215-223, 2003.
- CAPASSO, R.; EVIDENTE, A.; CUTIGNANO, A.; VURRO, M.; ZONNO, M.C.; BOTTALICO, A. Fusaric and 9,10-dehydrofusaric acids and their methyl esters from *Fusarium nygamai*. **Phytochemistry**, v. 41, n. 4, p. 1035-1039, 1996.
- CASSÁN, F.; BOTTINI, R.; SCHNEIDER, G.; PICCOLI, P. *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum* hydrolyze conjugates of GA<sub>20</sub> and metabolize the resultant aglycones to GA<sub>1</sub> in seedlings of rice dwarf mutants<sup>1</sup>. **Plant Physiology**, v. 125, p. 2053-2058, 2001.
- CAST (Council for Agricultural Science and Technology). **Mycotoxins: Risks in plant, animal and human systems**. Ames, Iowa: Task Force Report, 2003. 191 p.

- CASTILHOS JUNIOR, A.B.; MEDEIROS, P.A.; FIRTA, I.N.; LUPATINI, G.; SILVA, J.D. Principais processos de degradação de resíduos sólidos urbanos. In: CASTILHOS, A.B.J. **Resíduos sólidos urbanos: aterro sustentável para municípios de pequeno porte**. São Paulo: USP, 2003. p. 12-21.
- CAVALLET, L.E.; PESSOA, A.C.S.; HELMICH, J.J.; HELMICH, P.R.; OST, C.F. Produtividade do milho em resposta à aplicação de nitrogênio e inoculação das sementes com *Azospirillum* spp. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 4, n. 1, p. 129-132, 2000.
- CEREDA, M. P. **Propriedades gerais do amido**. São Paulo, Fundação Cargill, Série: Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino-americanas, v. 1, 221 p., 2002.
- CHAIHARN, M; CHUNHALEUCHANON, S; LUMYONG, S. Screening siderophore producing bacteria as potential biological control agent for fungal rice pathogens in Thailand. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 25, n. 11, p. 1919–1928, 2009.
- CHANG, A.C.; HINESLY, T.D.; BATES, T.E.; DONER, H.E.; DOWDY, R.H.; RYAN, J.A. Effect of long-term sludge application on accumulation of trace elements by crops. In: Page, A.L.; Logan, T.G.; Ryan, J.A. **Land application of sludge**. Chelsea: Lewis Publishers, p. 53-66, 1987.
- CHENG, C.Y.; CHU, L.M. Fate and distribution of nitrogen in soil and plants irrigated with landfill leachate. **Waste Management**, v. 30, 2011.
- CHENG, C.Y.; CHU, L.M. Phytotoxicity data safeguard the performance of the recipient plants in leachate irrigation. **Environmental Pollution**, v. 145, p. 195-202, 2007.
- CHIANG, E.S.K.; DEWALLE, F.B. Sanitary landfill leachates and their treatment. **Journal of the Environmental Engineering Division**, p. 411-431, 1976.
- CHO, J.I.; HONG, K.W.; KANG, K.J. Control of aflatoxin production of *Aspergillus flavus* by inhibitory action of antagonistic bacteria. **Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 10, n. 2, p. 154-160, 2000.
- CHRISTENSEN, C.M.; SAUER, D.B. Mycoflora. In: CHRISTENSEN, C.M. **Storage of cereal grains and their products**. St. Paul, Minnesota: American Association of Cereal Chemists. p. 219-240, 1982.
- CHRISTENSEN, T.H.; KJELDSEN, P.; ALBRECHTSEN, H.J.; HERON, G.; NIELSEN, P.H.; BJERG, P.L.; HOLM, P.E. Attenuation of landfill leachate pollutants in aquifers. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 24, n. 2, p. 119-202, 1994.
- CIAMPITTI, I.A.; VYN, T.J.; A comprehensive study of plant density consequences on nitrogen uptake dynamics of maize plants from vegetative to reproductive stages. **Field Crops Research**, v. 121, n. 1, p. 2-18, 2011.
- CIRILLO, T.; RITIENI, A.; VISIONE, M.; COCCHIERI, R.A. Evaluation of conventional and organic italian foodstuffs for deoxynivalenol and fumonisins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub>. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51 n. 27, p. 8128-8131, 2003.
- COELHO, A. M. Sete Lagoas: **Nutrição e Adubação do Milho**. Embrapa Milho e Sorgo, 2006, p. 1-6. (Embrapa Milho e Sorgo. Comunicado técnico, n. 66).
- COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS, 2006a. Recomendação da Comissão, de 17 de Agosto de 2006, sobre a presença de deoxinivalenol, zearalenona, ocratoxina A, toxinas T-2 e HT-2 e fumonisinas em produtos destinados à alimentação animal. **Jornal Oficial da União Europeia**, Bruxelas, L229, p. 7-9, 17 ago. 2006.
- COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS, 2006b. Regulamento (CE) n. 1881/2006 da Comissão, de 19 de Dezembro de 2006, que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios. **Jornal Oficial da União Europeia**, Bruxelas, L364, p. 5-24, 19 dez. 2006.

CONAB (Companhia Nacional do Abastecimento). **Acompanhamento da Safra Brasileira:** Grãos. Safra 2011/2012, décimo segundo levantamento. 2012. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12\\_09\\_06\\_09\\_18\\_33\\_boletim\\_graos\\_-\\_setembro\\_2012.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_09_06_09_18_33_boletim_graos_-_setembro_2012.pdf)>. Acesso em: 26 de outubro de 2012.

CORREA, O.S.; ROMERO, A.M.; SORIA, M.A.; DE ESTRADA, M. *Azospirillum brasilense*-plant genotype interactions modify tomato response to bacterial diseases, and root and foliar microbial communities. In: CASSÁN, F.D.; GARCIA DE SALAMONE, I. ***Azospirillum sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina***. Argentina: Asociación Argentina de Microbiología, 2008. p. 87-95.

COTTON, T.K.; MUNKVOLD, G.P. Survival of *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans* in maize stalk residue. **Phytopathology**, n. 88, p. 550-555, 1998.

CREUS, C.M.; SUELDO, R.J.; BARASSI, C.A. Water relations and yield in *Azospirillum* inoculated wheat exposed to drought in the field. **Canadian Journal of Botany**, v. 82, p. 273-281, 2004.

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).

CRUZ, J.C.; FILHO, I.A.P.; ALVARENGA, R.C.; NETO, M.M.G.; VIANA, J.H.M.; OLIVEIRA, M.F.; SANTANA, D.P. **Manejo da Cultura do Milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2006, p. 1-12. (Embrapa Milho e Sorgo. Comunicado técnico, n. 87).

D'ALMEIDA, M.L.O.; VILHENA, A. **Lixo Municipal: Manual de gerenciamento integrado**. 2. ed. São Paulo: IPT/CEMPRE, 2000.

D'MELLO, J.P.F.; MACDONALD, A.M.C. Mycotoxins. **Animal Feed Science and Technology**, v. 69, n. 1-3, p. 155-166, 1997.

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, n. 3-4, p. 183-205, 1999.

DALLA SANTA, O.R.; HERNÁNDEZ, R.F.; ALVAREZ, G.L.M.; RONZELLI J.P.; SOCCOL, C.R. *Azospirillum* sp. inoculation in wheat, barley and oats seeds greenhouse experiments. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, n. 6, p. 843-850. 2004.

DECHEN, A.R.; NACHTIGALL, G.R. Micronutrientes. In: FERNANDES, M. S. **Nutrição Mineral de Plantas**. 1. ed. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo (SBCS), 2006. p. 552-557.

DEKALB. **DKB240 YG**. Disponível em: <<http://www.dekalb.com.br>> Acesso em: 27 jul. 2011.

DENTI, E.A.; REIS, E.M. Efeito da rotação de culturas, da monocultura e da densidade de semeadura de plantas na incidência das podridões da base do colmo e no rendimento de grãos do milho. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, n. 3, p. 635-639, 2001.

DESAI, K.; SULLARDS, M.C.; ALLEGOOD, J.; WANG, E.; SCHMELZ, E.M.; HARTL, M.; HUMPF, H.-U.; LIOTTA, D.C.; PENG, Q.; MERRILL JUNIOR, A.H. Fumonisin and fumonisin analogs as inhibitors of ceramide synthase and inducers of apoptosis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1585, p. 188-192, 2002.

DESJARDINS, A.E.; HOHN, T.M. Mycotoxins in Plant Pathogenesis. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 10, n. 2, p. 147-152, 1997.

DESJARDINS, A.E.; PROCTOR, R.H. Molecular biology of *Fusarium* mycotoxins. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, p. 47-50, 2007.

- DIAZ, C.; PURDY, S.; CHRIST, A.; MOROT-GAUDRY, J-F.; WINGLER, A.; MASCLAUX-DAUBRESSE, C. Characterization of markers to determine the extent and variability of leaf senescence in arabidopsis. A metabolic profiling approach. **Plant Physiology**, v. 138, n. 2, p. 898-908, 2005.
- DIDONET, A.D.; RODRIGUES, O.; KENNER, M.H. Acúmulo de nitrogênio e de massa seca em plantas de trigo inoculadas com *Azospirillum brasilense*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 31, n. 9, p. 645-651, 1996.
- DOBBELAERE, S.; CROONRNBOGHES, A.; THYS, A.; PTACEK, D.; VANDERLEYDEN, J.; DUTTO, P.; LABANDERA-GONZALEZ, C.; CABALLERO-MELLADO, J.; AGUIRRE, J.F.; KAPULNIK, Y.; BRENER, S.; BURDMAN, S.; KADOURI, D.; SARIG, S.; OKON, Y. Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 28, p. 871-879, 2001.
- DOOHAN, F.M.; BRENNAN, J.; COOKE, B.M. Influence of Climatic Factors on *Fusarium* Species Pathogenic to Cereal. **European Journal of Plant Pathology**, v. 109, n. 107, p. 755-768, 2003.
- DUARTE, J.O.; CRUZ, J.C.; GARCIA, J.C.; MATTOSO, M.J. **Cultivo do Milho: Sistemas de Produção. Economia da produção. Versão Eletrônica, 4. ed.** Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2008. Disponível em: <<http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho/economia.htm>>. Acesso em: 09 dez. 2012.
- EL-FADEL, M.; BOU-ZEID, E.; CHAHINE, W.; ALAYLI, B. Temporal variation of leachate quality from pre-sorted and baled municipal solid waste with high organic and moisture content. **Waste Management**, v. 22, n. 3, p. 269-282, 2002.
- EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). 2006. **Cultivo de Milho: Economia da produção.** Disponível em: <[http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Milho/CultivodoMilho\\_7ed/index.htm](http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Milho/CultivodoMilho_7ed/index.htm)>. Acesso em: 09 de jan de 2013.
- EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). **Sistema brasileiro de classificação de solos.** Rio de Janeiro: Centro Nacional de Pesquisa de Solos (Embrapa Solos), 2006. 306 p.
- ERSES, A. S.; ONAY, T. T. *In situ* metal attenuation in landfills under methanogenic conditions. **Journal of Hazardous Materials**, v. 99, p. 159-175, 2003.
- FANCELLI, A.L.; DOURADO NETO, D. Principais doenças e seu controle. In:\_\_\_\_\_. **Produção de milho.** Guaíba Agropecuária, 2000. p. 253-282.
- FANDOHAN, P.; GNONLONFIN, B.; HELL, K.; MARASAS, W.F.O., WINGFIELD, M.J. Natural occurrence of *Fusarium* and subsequent fumonisin contamination in preharvest and stored maize in Benin, West Africa. **International Journal of Food Microbiology**, v. 99, n. 2, p. 173-83, 2005.
- FERNÁNDEZ-LUQUEÑO, F.; REVES-VARELA, V.; CERVANTES-SANTIAGO, F.; GÓMEZ-JUÁREZ, C.; SANTILLÁN-ARIAS, A.; DENDOOVEN, L. Emissions of carbon dioxide, methane and nitrous oxide from soil receiving urban wastewater for maize (*Zea mays* L.) cultivation. **Plant and Soil**, v. 331, p. 203-215, 2010.
- FERREIRA, A.C.B.; ARAUJO, G.A.A.; PEREIRA, P.R.G.; CARDOSO, A.A. Características agrônômicas e nutricionais do milho adubado com nitrogênio, molibdênio e zinco. **Scientia Agricola**, v. 58, n. 1, p. 131-138, 2001.
- FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia (UFLA)**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.
- FLECK, E. **Sistema integrado por filtro anaeróbio, filtro biológico de baixa taxa e banhado construído aplicado ao tratamento de lixiviado de aterro sanitário.** Dissertação de Mestrado - Instituto de Pesquisas Hidráulicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2005.

FRANCHINI, J.C.; CRISPINO, C.C.; SOUZA, R.A.; TORRES, E.; HUNGRIA, M. Microbiological parameters as indicators of soil quality under various soil management and crop rotation systems in southern Brazil. **Soil and Tillage Research**, v. 92, n. 1-2, p. 18-29, 2007.

FRISVAD, J.C.; SMEDSGAARD, J.; SAMSON, R.A.; LARSEN, T.O.; THRANE, U. Fumonisin B<sub>2</sub> production by *Aspergillus niger*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 23, p. 9727–9732, 2007.

GELDERBLUM, W.C.A.; RHEEDER, J.P.; LEGGOTT, N.; STOCKENSTROM, S.; HUMPHREYS, J.; SHEPHARD, G.S.; MARASAS, W.F.O. Fumonisin contamination of a corn sample associated with the induction of hepatocarcinogenesis in rats-role of dietary deficiencies. **Food And Chemical Toxicology**: an international journal published for the British industrial biological research association, v. 42, p. 471-479, 2004.

GELDERBLUM, W.C.A.; SAMPLE, E.; MARASAS, W.F.O. Fumonisin: novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 54, p. 1806-1811, 1988.

GRIFFIN, D.H. Secondary (special) metabolism. In \_\_\_\_\_. **Fungal Physiology**. 2<sup>a</sup> ed. New York: Editora Wiley-Liss, 1994. p. 258-259.

HAMADA, J. Estimativa de geração e caracterização do chorume em aterros sanitários. Rio de Janeiro. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, 19. 1999, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro, 1999. p. 1801-1810.

HARRISON, L.R.; COLVIN, B.M.; GREENE, J.T.; NEWMAN, L.E.; COLE JUNIOR, J.R. Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B<sub>1</sub>, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. **Journal Veterinary Diagnostic and Investigational Laboratory**, v. 2, p. 217-221, 1990.

HASSEGAWA, R.H.; FONSECA, H.; FANCELLI, A.L.; DA SILVA, V.N.; SCHAMMASS, E.A.; REIS, T.A.; CORREA, B. Influence of macro- and micronutrient fertilization on fungal contamination and fumonisin production in corn grains. **Food Control**, v. 19, n. 1, p. 36-43, 2008.

HUMPF, H.-U.; VOSS, K.A. **Effects of food processing on the chemical structure and toxicity of fumonisin mycotoxins**. *Molecular Nutrition and Food Research*, v. 48, p. 255-269, 2004.

HUNGRIA, M. **Inoculação com *Azospirillum brasilense***: inovação em rendimento a baixo custo. Londrina: Embrapa Soja, 2011. 36 p.

IAL (INSTITUTO ADOLFO LUTZ). Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. **Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimentos**. 4 ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz., p. 98-99, 2008.

IAL (INSTITUTO ADOLFO LUTZ). Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. **Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimentos**. 3.ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, p. 553, 1985.

IAPAR (Instituto Agrônomo do Paraná). **Cartas Climáticas do Estado do Paraná**. Disponível em: <<http://www.iapar.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=856>>. Acesso em: 12 junho 2012.

IARC. International Agency for Research on Cancer. Toxins derived from *Fusarium moniliforme*: Fumonisin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> and Fusarin C. In: \_\_\_\_\_. **Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Human**. v. 56. Lyon, França, 1993. p. 445.

IM, J.H.; WOO, H.J.; CHOI, M.W.; HAN, K.B.; KIM, C.W. Simultaneous organic and nitrogen removal from municipal landfill leachate using an anaerobic-aerobic system. **Water Research**, v. 35, n. 10, p. 2403-2410, 2001.

JONES, D.L.; WILLIAMSON, K.L.; OWEN, A.G. Phytoremediation of landfill leachate. **Waste Management**, v. 26, p. 825-837, 2005.

JUCÁ, J.F.T.; MONTEIRO, V.E.D.; OLIVEIRA, F.J.S.; MACIEL F.J. Monitoramento ambiental do aterro de resíduos sólidos da Muribeca. In: **III Seminário Nacional sobre Resíduos Sólidos Urbanos**, Toledo, 1999.

- KIEHL, J. C. Nitrogênio: Dinâmica e disponibilidade no solo. In: \_\_\_\_\_. **Curso de atualização de fertilidade do solo**. Campinas: Fundação Cargil, 1987. p. 139-157.
- KJELDSEN, P.; BARLAZ, M.A.; ROOKER, A.P.; BAUN, A.; LEDIN, A.; CHRISTENSEN, T.H. Present and Long-Term Composition of MSW Landfill Leachate: A Review. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**. v. 32, p. 297-336, 2002.
- KLADIVKO, E.J. Tillage systems and soil ecology. **Soil & Tillage Research**, n. 61, p. 61-76, 2001.
- KLIMIUK, E.; KULIKOWSKA, D. Organics removal from landfill leachate and activated sludge production in SBR reactors. **Waste Management**. v. 26, p. 1140-1147, 2006.
- KLOEPFER, J.; LIFSHITZ, R.; SCHROTH, M. *Pseudomonas* inoculants to benefit plant production. **ISI Atlas of Science: Animal and Plant Science**. v. 1, n. 1, p. 60-64, 1988.
- KRSKA, R.; WELZIG, E.; BOUDRA, H. Analysis of *Fusarium* toxins in feed. **Animal Feed Science and Technology**, v. 137, n. 3-4, p. 241-264, 2007.
- LEAL, R.M.P.; HERPIN, U.; FONSECA, A.F.; FIRME, L.P.; MONTES, C.R.; MELFI, A.J. Sodicity and salinity in a Brazil Oxisol cultivated with sugarcane irrigated with wastewater. **Agricultural Water Management**, v. 96, p. 307-316, 2009.
- LEMOS, M.M.G. Metodologia adotada para o estabelecimento dos valores de referência de qualidade para solos e águas subterrâneas no Estado de São Paulo. In: Joint World Congress on Groundwater. **Anais...** São Paulo: Cetesb, 2000.
- LEW, H.; ADLER, A.; EDINGER, W. Moniliformin and the European corn borer (*Ostrinia nubilalis*). **Mycotoxin Research**, v. 7, p. 71-76, 1991.
- LOGRIECO, A.; MULÈ, G.; MORETTI, A.; BOTTALICO, A. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe. **European Journal of Plant Pathology**, v. 108, n. 7, p. 597-609, 2002.
- MACHADO, A.T.; SODEK, L.; DÖBEREINER J.; REIS, M.V. Efeito da adubação nitrogenada e da inoculação com bactérias diazotróficas no comportamento bioquímico da cultivar de milho nitroflint. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 33, p. 961-970, 1998.
- MADRID, F.; LÓPEZ, R.; CABRERA, F. Metal accumulation in soil after application of municipal solid waste compost under intensive farming conditions. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 119, p. 249-256, 2007.
- MAGAN, N.; ALDRED, D. Post-harvest control strategies: Minimizing mycotoxins in the food chain. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, p. 131-139, 2007.
- MAIORANO, A.; REYNERI, A.; SACCO, D.; MAGNI, A.; RAMPONI, C. A dynamic risk assessment model (FUMAGrain) of fumonisin synthesis by *Fusarium verticillioides* in maize grain in Italy. **Crop Protection**, v. 28, n. 3, p. 243-256, 2009.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. **Avaliação do estado nutricional de plantas: princípios e aplicações**. 2. ed. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato (Potafos), 1997. 319 p.
- MALLMANN, C.A.; SANTURIO, J.M.; DILKIN, P. Equine leukoencephalomalacia associated with ingestion of corn contaminated with fumonisin B<sub>1</sub>. Short Communication. **Revista de Microbiologia**, v. 30, p. 249-252, 1999.
- MARASAS, W.F.O. Discovery and occurrence of the fumonisins: A historical perspective. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, n. 2, p. 239-243, 2001.
- MARASAS, W.F.O.; KELLERMAN, T.S.; GELDERBLOM, W.C.; COETZER, J.A.; THIEL, P.G.; VAN DER LUGT, J.J. Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B<sub>1</sub> isolated from *Fusarium moniliforme*. **The Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 55, n. 4, p. 197-203, 1988.

- MARÍN, S.; SANCHIS, V.; RAMOS, A.J.; VINAS, I.; MAGAN, N. Environmental factors, in vitro interactions, and niche overlap between *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum*, and *F. graminearum*, *Aspergillus* and *Penicillium* species from maize grain. **Mycology**, v. 102, p. 831-837, 1998.
- MARSARO JÚNIOR, A.L.; LAZZARI, S.M.N.; DE SOUZA, J.L.; LAZZARI, F.A.; CÂNDIDO, L.M.B. Influência de diferentes sistemas de adubação na composição nutricional do milho *Zea mays* L. (*Poaceae*) e seus efeitos no ataque de *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: *Curculionidae*) no produto armazenado. **Semina**, v. 28, n. 1, p. 51-64, 2007.
- MARSCHNER, H. Adaptation of Plants to Adverse Chemical Soil Conditions In: \_\_\_\_\_. **Mineral nutrition of higher plant**. 2. ed. New York: Academic Press, 1995. 606 p.
- MARTINES, A.M.; NOGUEIRA, M.A.; SANTOS, C.A.; NAKATANI, A.S.; ANDRADE, C.A.; COSCIONE, A.R.; CANTARELLA, H.; SOUSA, J.P.; CARDOSO, E.J.B.N. Ammonia volatilization in soil treated with tannery sludge. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4690-4696, 2010.
- MASCLAUX, C.; VALADIER, M.H.; BRUGIÈRE, N.; MOROT-GAUDRY J.F.; HIREL, B. Characterization of the sink/source transition in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) shoots in relation to nitrogen management and leaf senescence. **Planta**, v. 211, p. 510-518, 2000.
- MERRILL JUNIOR, A.H. Cell regulation by sphingosine and more complex sphingolipids. **Journal Bioenergetics and Biomembranes**, v. 23, p. 83-104, 1991.
- MERRILL JUNIOR, A.H.; SULLARDS, M.C.; WANG, E.; VOSS, K.A.; RILEY, R.T. Sphingolipid metabolism: roles in signal transduction and disruption by fumonisins. **Environment Health Perspective**, v. 109, n. 2, p. 283-289, 2001.
- MIETHKE, M.; MARAHIEL M.A. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 71, n. 3, p. 413-451, 2007.
- MILLER, J.D. Factors that affect the occurrence of fumonisin. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, n. 2, p. 321-324, 2001.
- MISSMER S.A.; SUAREZ, L.; FELKNER, M.; WANG, E.; MERRILL JUNIOR, A.H.; ROTHMAN K.J.; HENDRICKS, K.A. Exposure to fumonisins and the occurrence of neural tube defects along the Texas-Mexico border. **Environmental Health Perspectives**, v. 114, n. 2, p. 237-241, 2006.
- MORENO, E.C.; GARCIA, G.T.; ONO, M.A.; VIZONI, É.; KAWAMURA, O.; HIROOKA, E.Y.; ONO, E.Y.S. Co-occurrence of mycotoxins in corn samples from the Northern region of Paraná State, Brazil. **Food Chemistry**, v. 116, p. 220-226, 2009.
- MORETTO, E.; FETT, R. **Tecnologia de óleos e gorduras vegetais**. São Paulo: Varela, 1998. 178 p.
- MUNKVOLD, G.P. Epidemiology of *Fusarium* diseases and their mycotoxins in maize ears. **European Journal Plant Pathology**, v. 109, p. 705-713, 2003a.
- MUNKVOLD, G.P. Cultural and genetic approaches to managing mycotoxins in maize. **Annual Review of Phytopathology**, v. 41, p. 99-116, 2003b.
- MUNKVOLD, G.P.; DESJARDINS, A.E. Fumonisin in maize: Can we reduce their occurrence? **Plant Disease**, v. 81, n. 6, p. 556-565, 1997.
- MYOUNGSU, P.; CHUNGWOO, K.; JINCHUL, Y.; HYOUNGSEOK, L.; WANSIK, S.; SEUNGHWAN, K.; TONGMIN, S. Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea. **Research in Microbiology**, v. 160, p. 127-133, 2005.
- NAIMAN, A.D.; LATRÓNICO, A.; DE SALAMONE, I.E.G. Inoculation of wheat with *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens*: Impact on the production and culturable rhizosphere microflora. **European Journal of Soil Biology**, v. 45, p. 44-51, 2009.

- NELSON, N. A photometric adaptation of the Somogyi method for determination of glucose. **Biochemistry**, v. 153, p. 375-380, 1944.
- NELSON, P.E.; TOUSSOUN, T.A.; MARASAS, W.F.O. *Fusarium* species: an illustrated manual for identification. **The Pennsylvania State University Press**, University Park, Pennsylvania, 1983.
- NESCI, A.; BARROS, G.; CASTILLO, C.; ETCHEVERRY, M. Soil fungal population in preharvest maize ecosystem in different tillage practices in Argentina. **Soil and Tillage Research**, v. 91, n. 1-2, p. 143-149, 2006.
- NOVAKOWISKI, J.H.; DANDINI, I.E.; FALBO, M.K.; MORAES, A.; NOVAKOWISKI, J.H.; CHENG, N.C. Efeito Residual da Adubação Nitrogenada e Inoculação de *Azospirillum brasilense* na Cultura do Milho. **Semina**, v. 32, suplemento 1, p. 1687-1698, 2011.
- OHLAND, R.A.A.; DE SOUZA, L.C.F.; HERNANI, L.C.; MARCHETTI, M.E.; GONÇALVES, M.C. Culturas de cobertura do solo e adubação nitrogenada no milho em plantio direto. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, n. 3, p. 538-544, 2005.
- OLIVEIRA, S.; PASQUAL, A. Avaliação de parâmetros indicadores de poluição por efluente líquido de um aterro sanitário. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 9, p. 240-249, 2004.
- ONO, E.Y.; SUGIURA, Y.; HOMECHIN, 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, n. 3, p. 139-148, 1999.
- ONO, E.Y.S.; BIAZON, L.; DA SILVA, M.; VIZONI, E.; SUGIURA, Y.; UENO, Y.; HIROOKA, E.Y. Fumonisins in corn: Correlation with *Fusarium* sp. count, damaged kernels, protein and lipid content. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, p. 63-71, 2006.
- ONO, K.; TERASHIMA, I.; WATANABE, A. Interaction between nitrogen deficit of a plant and nitrogen content in the old leaves. **Plant and Cell Physiology**, v. 37, n. 8, p. 1083-1089, 1996.
- ONO, K.; WATANABE, A. Levels of endogenous sugars, transcripts of *rbcS* and *rbcL*, and of RuBisCO protein in senescing sunflower leaves. **Plant and Cell Physiology**, v. 38, n. 9, p. 1032-1038, 1997.
- ONO, E.Y.S.; SILVA, M.; HASHIMOTO, E.H.; VIZONI, É.; KAWAMURA, O.; SUGIURA, Y.; HIROOKA, E.Y. Mycotoxological quality evaluation of corn samples used by processing industries in the Northern region of Paraná State, Brazil. **Food Additives & Contaminants: Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment**, v. 25, n. 11, p. 1392-1399, 2008.
- PACHECO, E.P. **Sistema Plantio Direto: Uma alternativa para os produtores de grãos de Sergipe**. 2004. Disponível em: <<http://www.agronline.com.br/artigos/artigo.php?id=193>>. Acesso em: 16 de julho de 2009.
- PAES, M.C.D.; Sete Lagoas: **Aspectos Físicos, Químicos e Tecnológicos do Grão de Milho**. Embrapa Milho e Sorgo, 2006, p. 1-6. (Embrapa Milho e Sorgo. Comunicado técnico, n. 75).
- PAL, K.K.; TILAK, K.V.; SAXENA, A.K.; DEY, R.; SINGH C.S. Suppression of maize root diseases caused by *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium moniliforme* and *Fusarium graminearum* by plant growth promoting rhizobacteria. **Microbiological Research**, v. 156, p. 209-223, 2001.
- PANCHONI, L.C. **Potencial de lixiviado de aterro sanitário como fonte de nutrientes e efeitos em propriedades do solo**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.
- PASCALE, M.; VISCONTI, A.; PRONCZUK, M.; WISNIEWSKA, H.; CHELKOWSKI, J. Accumulation of Fumonisins in Maize Hybrids Inoculated under Field Conditions with *Fusarium moniliforme* Sheldon. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, n. 74, p. 1-6, 1997.
- PAUL, M.; DRISCOLL, S.P. Sugar repression of photosynthesis during N deficiency. **Plant, Cell Environment**, v. 20, p. 110-116, 1997.

- PEREIRA FILHO, I.A.P.; OLIVEIRA, A.C.; CRUZ, J.C. Milho verde: espaçamentos, densidade de plantas, cultivares e épocas de semeadura, influenciando o rendimento e algumas características de espigas comerciais. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 22., 1998, Recife. **Anais...** Recife: EMBRAPA, 1998.
- PEREIRA, A.A.; HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J.C.; KASCHUK, G.; CHUEIRE, L.M.O.; CAMPO, R.J.; TORRES, H. Variações qualitativas e quantitativas na microbiota do solo e na fixação biológica do nitrogênio sob diferentes manejos com soja. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 31, n. 6, p. 1397-1412, 2007.
- PEREIRA, P.; NESCI, A.; CASTILLO, C.; ETCHEVERRY, M. Impact of bacterial biological control agents on fumonisina B<sub>1</sub> content and *Fusarium verticillioides* infection of field-grown maize. **Biological Control**, v. 53, p. 258-266, 2010.
- PEREIRA, P.; NESCI, A.; ETCHEVERRY, M. Effects of biocontrol agents on *Fusarium verticillioides* count and fumonisin content in the maize agroecosystem: Impact on rhizospheric bacterial and fungal groups. **Biological Control**, v. 42, p. 281–287, 2007.
- PIAZZOLI, D. **Densidade de plantas e doses de nitrogênio em cobertura na cultura do milho sob espaçamento reduzido**. 2012. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.
- PINTO, N.F.J.A.; DE OLIVEIRA, E.; FERNANDES, F.T. **Manejo das Principais Doenças do Milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2007, p. 1-17. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica nº 92).
- PINTO, N.F.J.A.; Sete Lagoas: **Grãos Ardidos em Milho**. Embrapa Milho e Sorgo, 2005, p. 1-6. (Embrapa Milho e Sorgo. Comunicado técnico, n. 66).
- 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.
- PRABPAI, S.; CHARERNTANYARAK, L.; SIRI, B.; MOORE, M.R.; NOLLER, B.N. Effects of residues from municipal solid waste landfill on corn yield and heavy metal content. **Waste Management**, v. 29, p. 2316-2320, 2009.
- PROCTOR, R.H.; PLATTNER, R.D.; DESJARDINS, A.E.; BUSMAN, M.; BUTCHKO, A.E. Fumonisin Production in the Maize Pathogen *Fusarium verticillioides*: Genetic Basis of Naturally Occurring Chemical Variation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 6, p. 2424-2430, 2006.
- RAIJ, B.V. **Fertilidade do solo e adubação**. Piracicaba: Ceres Potafos, 1991. 343 p.
- RAMIREZ, M.L., TORRES, A., RODRIGUEZ, M.I., CASTILLO, C., CHULZE, S. *Fusarium* and fumonisins in corn at harvest time: effect of fertilization and planting area. **Cereal Research Communications**, v. 25, n. 3, p. 381-383, 1997.
- REID, L. M.; ZHU, X.; MA, B.L. Crop rotation and nitrogen effects on maize susceptibility to *Gibberella* (*Fusarium graminearum*) ear rot. **Plant and Soil**, v. 237, p. 1-14, 2001.
- REIS, E.M.; CASA, R.T.; BRESOLIN, A.C.R. **Manual de diagnose e controle de doenças do milho**. 2. ed. Lages: Graphel, 2004. 141 p.
- REYNERI, A. The role of climatic condition on mycotoxin production in cereal. **Veterinary Research Communications**, v. 30, p. 87-92, 2006.
- RHEEDER, J.P.; MARASAS, W.F.O. *Fusarium* species from plant debris associated with soils from maize production areas in the Transkei region of South Africa. **Mycopathologia**, v. 143, p. 113-119, 1998.

- RHEEDER, J.P.; MARASAS, W.F.O.; FARINA, M.P.W.; THOMPSON, G.R.; NELSON, P.E. Soil fertility factors in relation to oesophageal cancer risk areas in Transkei, Southern Africa. **European Journal Cancer Prevent**, v. 3, p. 49-56, 1994.
- RHEEDER, J.P.; MARASAS, W.F.O.; THIEL, P.G.; SYDENHAM, E.W.; SHEPHARD, G.S.; VAN SCHALKWYK, D.J. *Fusarium moniliforme* and fumonisins in corn in relation to human oesophageal cancer in Transkei. **Phytopathology**, v. 82, p. 353-357, 1992.
- RHEEDER, J.P.; MARASAS, W.F.O.; VISMER, H.F. Production of Fumonisin Analogs by *Fusarium* Species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 5, p. 2101-2105, 2002.
- RILEY, R.T.; AN, N.-H.; SHOWKER, J.L.; YOO, H.-S.; NORRED, W.P.; CHAMBERLAIN, W.J.; WANG, E.; MERRILL JUNIOR, A.H.; MOTELIN, G.; BEASLEY, V.R.; HASCHEK, W.M. Alteration of tissue and serum sphinganine to sphingosine ratio: an early biomarker of exposure to fumonisin-containing feeds in pigs. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 118, p. 108-112, 1993.
- RILEY, R.T.; ENONGENE, E.; VOSS, K.A.; NORRED, W.P.; MEREDITH, F.I.; SHARMA, R.P.; SPITSBERGEN, J.; WILLIAMS, D.E.; CARLSON, D.B.; MERRILL JUNIOR, A.H. Sphingolipid perturbations as mechanisms for fumonisin carcinogenesis. **Environment Health Perspective**, v. 109, n. 2, p. 301-308, 2001.
- RITCHIE, S.W.; HANWAY, J.J. **How a corn plant develops**. Iowa State University: Special report, n. 48, 1993. Disponível em: <[www.maize.agron.iastate.edu/corngrows.html](http://www.maize.agron.iastate.edu/corngrows.html)> Acesso em: 3 ago. 2011.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; SABINO, M. Mycotoxin research in Brazil: the last decade in review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, n. 1, p. 1 - 11, 2002.
- RODRIGUEZ-DEL-BOSQUE, L. A. Impact of agronomic factors on aflatoxin contamination in preharvest field corn in Northeastern Mexico. **Plant Disease**, v. 80, p. 988-993, 1996.
- ROESCH, L.F.W.; OLIVARES, F.L.; PASSAGLIA, L.P.M.; SELBACH, P.A.; SÁ, E.L.S de; CAMARGO, F.A.O. Characterization of diazotrophic bacteria associated with maize: effect of plant genotype, ontogeny and nitrogen-supply. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 22, n. 9, p. 967-974, 2006.
- SAMAPUNDO, S.; DEVLIEGHIERE, F.; MEULENAUER, B.; GEERARD, A.; MUTUKUMIRA, A.N.; VAN IMPE, J.; DEBEVERE, J. Modeling the effect of water activity and temperature on growth of *Fusarium moniliforme* and *proliferatum* in corn. **International Journal of Food Microbiology**, v. 105, p. 35-52, 2005.
- SAMSON, R.A.; HOEKSTRA, E.S.; FRISVAD, J.C. **Introduction to food-Borne fungi**. 5. ed. Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 1996. 322 p.
- SANG, N.; HAN, M.; LI, G.; HUANG, M. Landfill leachate affects metabolic responses of *Zea mays* L. seedlings. **Waste Management**, v. 30, p. 856-862, 2010.
- SANGOI, L. Understanding plant density effects on maize growth and development: an important issue to maximize grain yield. **Ciência Rural**, v. 31, p. 159-168, 2001.
- SANGOI, L.; ENDER, M.; GUIDOLIN, A.F.; BOGO, A.; KOTHE, D.M. Incidência e severidade de doenças de quatro híbridos de milho cultivados em diferentes densidades de planta. **Ciência Rural**, v. 30, p. 17-21, 2000.
- SANGOI, L.; ERNANI, P.R.; DA SILVA, P.R.F. Maize response to nitrogen fertilization timing in two tillage systems in a soil with high organic matter. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 31, n. 3, p. 507-517, 2007.
- SANGOI, L.; GRACIETTI, M.A.; RAMPAZZO, C.; BIANCHET, P. Response of Brazilian maize hybrids from different eras to changes in plant density. **Field Crops Research**, v. 79, p. 39-51, 2002.
- SANGOI, L.; SALVADOR, R.J. Dry matter production and partitioning of maize hybrids and dwarf lines at four plant populations. **Ciência Rural**, v. 27, n. 1, p. 1-6, 1997.

SCHERER, E.E.; BALDISSERA, I.T.; NESI, C.N. Propriedades químicas de um latossolo vermelho sob plantio direto e adubação com esterco de suínos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 31, n. 1, p. 123-131, 2007.

SEIFERT, K.A.; TAKAYUKI, A.; BAAYEN, R.P.; BRAYFORD, D.; BURGESS, L.W.; CHULZE, S.; GAMS, W.; GEISER, D.; DE GRUYTER, J.; LESLIE, J.F.; LOGRIECO A.; MARASAS, W.F.O.; NIRENBERG, H.I.; O'DONNELL, K.; RHEEDER, J.; SAMUELS, G.J.; SUMMERELL, B.A.; THRANE, U.; WAALWIJK, C. The name *Fusarium moniliforme* should no longer be used. **Mycological Research**, v. 107, n. 6, p. 643-644, 2003.

SEMENTES AGROCERES. **AG 9010 YG**. Disponível em:  
<[http://www.sementesagrocere.com.br/milho\\_safrinha.asp?produto=ag\\_s\\_9010&h=1000](http://www.sementesagrocere.com.br/milho_safrinha.asp?produto=ag_s_9010&h=1000)> Acesso em: 14 de novembro 2012.

SEO, J.A.; LEE, Y.W. Natural occurrence of the C Series of Fumonisin in Moldy Corn. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 3, p. 1331 – 1334, 1998.

SHAH, S.; KARKHANIS, V.; DESAI, A. Isolation and characterization of siderophore, with antimicrobial activity, from *Azospirillum lipoferum* M. **Current Microbiology**, v. 25, p. 347-351, 1992.

SHELBY, R.A.; WHITE, D.G.; BAUSKE, E.M. Differential fumonisin production in maize hybrids. **Plant Disease**, v. 78, p. 582-584, 1994.

SHEPHARD, G.S.; SYDENHAM, E.W.; THIEL, P.G.; GELDERBLUM, W.C.A. Quantitative determination of fumonisins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Liquid Chromatography**, v. 13, p. 2077-2087, 1990.

SHIOGA, P.S.; OLIVEIRA, E.L.; GERAGE, A.C. Densidade de plantas e adubação nitrogenada em milho cultivado na safrinha. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 3, n. 3, p. 381-390, 2004.

SILVA, F.C.; SILVA, C.A.; BERGAMASCO, A.F.; RAMALHO, A.L. Efeito do período de incubação e de doses de composto de lixo urbano na disponibilidade de metais pesados em diferentes solos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 3, p. 403-412, 2003.

SILVA, M.; GARCIA, G.T.; VIZONI, E.; KAWAMURA, O.; HIROOKA, E.Y.; ONO, E.Y.S. Effect of the time interval from harvesting to the pre-drying step on natural fumonisin contamination in freshly harvested corn from the State of Paraná, Brazil. **Food Addition Contamination**, v. 25, n. 5, p. 643-649, 2008.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. 2. ed. São Paulo: Varela, 2001. 317 p.

SMITH, G.W.; CONSTABLE, P.D.; BACON, C.W.; MEREDITH, F.I.; HASCHEK, W.M. Cardiovascular effects of fumonisins in swine. **Fundamental and Applied Toxicology**, v. 31, p. 169-172, 1996.

SOMOGYI, M. Determination of blood sugar. **Journal Biology Chemical**, n. 160, p. 69-73, 1945.

SPOSITO, G. **The Chemistry of Soils**. New York: Oxford University Press, 1989. 277 p.

STITT, M.; KRAPP, A. The interaction between elevated carbon dioxide and nitrogen nutrition: the physiological and molecular background. **Plant, Cell and Environment**, v. 22, n. 6, p. 583-621, 1999.

STURZ, A.V.; CARTER, M.R.; JOHNSTON, H.W. A review of plant disease, pathogen interactions and microbial antagonism under conservation tillage in temperate humid agriculture. **Soil and Tillage Research**, v. 41, p. 169-189, 1997.

SWEENEY, M. J.; DOBSON, A.D.W. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. **International Journal of Food Microbiology**, v. 43, p. 141-158, 1998.

THULER, D.S.; FLOH, E.I.S.; HANDRO, W.; BARBOSA, H.R. Plant growth regulators and amino acids released by *Azospirillum* sp. in chemically defined media. **Letters in Applied Microbiology**, v. 37, n. 2, p. 174–178, 2003.

TIEN, T.M.; GASKINS, M.H.; HUBBELL, D.H. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 37, p. 1016–1024, 1979.

TOLLENAAR, M.; AGUILERA, A. Radiation use efficiency of and old and new maize hybrid. **Agronomy Journal**, v. 84, n. 3, p. 536 - 541, 1992.

TORTORA, M.L.; DÍAZ-RICCI, J.C.; PEDRAZA, R.O. *Azospirillum brasilense* siderophores with antifungal activity against *Colletotrichum acutatum*. **Archives of Microbiology**, v. 134, n. 4, p. 275-286, 2011.

TOSELLO, G. A. Milhos especiais e seu valor nutritivo. In: CERVELATTI, E. P. **Caracterização biológica e genética de fungos presentes em lesões da mancha de *Phaeosphaeria* em milho (*Zea mays*)**. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 1999. Londrina – PR.

TRENTO, S.M.; IRGANG, H.H.; REIS, E.M. Efeito da rotação de culturas, da monocultura e da densidade de plantas na incidência de grãos ardidos em milho. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, n. 6, p. 609-613, 2002.

TSAI, C.Y.; WARREN, H.L.; HUBER, D.M.; BRESSAN, R.A. Interactions between the kernel N sink, grain yield and protein nutritional quality of maize. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 34, n. 3, p. 255-263, 1983.

UENO, Y.; AOYAMA, S.; SUGIURA, Y.; WANG, D.S.; HIROOKA, E.Y.; HARA, S.; KARKI, T.; CHEN, G.; YU, S.H. A limited survey of fumonisin 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.; TANAKA, 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. **Food and Chemical Toxicology**, v. 35, n. 12, p. 1143-1150, 1997.

USFDA (United States Food and Drugs Administration, 2001). **Guidance for Industry: Fumonisin Levels in Human Foods and Animal Feeds**. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/GuidanceDocuments/ChemicalContaminantsandPesticides/ucm109231.htm>>. Acesso em: 5 de junho de 2009.

USDA (United States Department of Agriculture, 2013). **World Corn Production, Consumption, and Stocks**. Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov/psdonline/psdReport.aspx?hidReportRetrievalName=World>> Acesso em: 07 de junho 2013.

VAN DER WESTHUIZEN, L.; BROWN, N.L.; MARASAS, W.F.O.; SWANEVELDER, S.; SHEPHARD, G.S. Sphinganine/sphingosine ratio in plasma and urine as a possible biomarker for fumonisin exposure in humans in rural areas of Africa. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, p. 1153-1158, 1999.

VAN DER WESTHUIZEN, L.; SHEPHARD, G.S.; SCUSSEL, V.M.; COSTA, L.L.F.; VISMER, H.F.; RHEEDER J.P.; MARASAS, W.F.O. Fumonisin contamination and *Fusarium* incidence in corn from Santa Catarina, Brazil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 5574-5578, 2003.

VOSS, K.A.; SMITH, G.W.; HASCHEK, W.M. Fumonisin: Toxicokinetics, mechanism of action and toxicity. **Animal Feed Science and Technology**, v. 137, p. 299-325, 2007.

WALTER, M.; SILVA, L.P.; PERDOMO, D.M.X. Amido disponível e resistente em alimentos: Adaptação do método da AOAC 996.11. **Alimentos e Nutrição**, v. 16, n. 1, p. 39-43, 2005.

WANG, C.; HU, X.; CHEN, M.L.; WU, Y.H. Total concentrations and fractions of Cd, Cr, Pb, Cu, Ni and Zn in sewage sludge from municipal and industrial wastewater treatment plants. **Journal Hazardous Material**, v. 119, p. 245–249, 2005.

- WANG, E.; NORRED, W.P.; BACON, C.P.; RILEY, R.T.; MERRILL JUNIOR, A.H. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by Fumonisin: Implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, p. 14486-14490, 1991.
- WANG, E.; ROSS, P.F.; WILSON, T.M.; RILEY, R.T.; MERRILL JUNIOR, A.H. Increases in serum sphingosine and sphinganine and decreases in complex sphingolipids in ponies given feed containing fumonisins, mycotoxins produced by *Fusarium moniliforme*. **Journal of Nutrition**, v. 122, n. 8, p. 1706-1716, 1992.
- WANG, J.; ZHOU, Y.; LIU, W.; ZHU, X.; DU, L.; WANG, Q. Fumonisin level in corn-based food and feed from Linxian County, a high-risk area for esophageal cancer in China. **Food Chemistry**, v. 106, p. 241-246, 2008.
- WATSON, S.A.; RAMSTAD, P.E. **Corn: Chemistry and Technology**. St. Paul, Minnesota: American Association of Cereal Chemist, 1987. 605 p.
- WELANDER, U.; HENRYSSON, T.; WELANDER, T. Nitrification of landfill leachate using suspended-carrier biofilm technology. **Water Research**, v. 31, n. 9, p. 2351-2355, 1997.
- WILSON, D.M.; ABRAMSON, D. Mycotoxins. In: SAUER, D.B. **Storage of cereal grains and their products**. St. Paul, Minnesota: American Association of Cereal Chemists, p. 341-391, 1992.
- WINGLER, A.; PURDY, S.; MACLEAN, J.A.; POURTAU, N. The role of sugars in integrating environmental signals during the regulation of leaf senescence. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, n. 2, p. 391-399, 2006.
- WISZNIOWSKI, J.; ROBERT, D.; SURMACZ-GORSKA, J.; MIKSCH, K.; WEBER, J. V. Landfill leachate treatment methods: A review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 4, n. 1, p. 51-61, 2006.
- YAMADA, T.; ABDALLA, S.R.S. **Como melhorar a eficiência da adubação nitrogenada do milho?** Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato (Potafos). Informações Agronômicas, n. 91, p. 1-5, 2000.
- ZIMDAHL R.; SKOGERBOE K.R. Behavior of Lead in Soil. **Environmental Science & Technology**, v. 11, n. 13, p. 1202-1206, 1977.