

Composição química e desoxinivalenol em trigo da região Centro-Sul do Paraná: adubação nitrogenada em cobertura associada com *Azospirillum brasilense*¹

Chemical composition and deoxynivalenol in wheat of Central-Southern Paraná: nitrogen fertilization in top dressing associated with *Azospirillum brasilense*

Thiago Montagner Souza^{1*}; André Mateus Prando²; Cássia Reika Takabayashi³; Joice Sifuentes dos Santos⁴; Angélica Tieme Ishikawa⁵; Ana Lúcia de Souza Madureira Felício³; Eiko Nakagawa Itano⁶; Osamu Kawamura⁷; Claudemir Zucareli⁸; Elisa Yoko Hirooka⁴

Resumo

O impacto de tratamentos culturais na qualidade do grão foi avaliado em trigo (*Triticum aestivum* L. cultivar BRS Tangará) da região Centro-Sul do Estado do Paraná (Ponta Grossa), nos anos agrícolas de 2010 e 2011. O cultivo foi realizado em sucessão a cultura da soja (2010) e do milho (2011). Os tratamentos consistiram de inoculação de sementes com *Azospirillum brasilense* e aplicação de doses crescentes de nitrogênio em cobertura (0, 30, 60, 90 e 120 kg ha⁻¹). O delineamento experimental foi em bloco casualizado, fatorial 2 x 5 (inoculação x dose N), com quatro repetições. Os parâmetros avaliados foram atividade de água, umidade, proteína e contaminação dos grãos por desoxinivalenol (DON). Os dados foram submetidos à análise de variância, comparação de médias pelo teste de Tukey (p<0,05) e regressão para doses de nitrogênio. A inoculação de sementes com *A. brasilense* resultou em aumento no teor de proteína no grão em 2010 (+1,6%; 16,9 g 100g⁻¹) e 2011 (+1,7%; 15,7 g 100g⁻¹), independente da dose de nitrogênio (p<0,01). As doses de nitrogênio em 2010 apresentaram resposta linear positiva com o teor de proteína, com aumento de 14,2% utilizando sementes não inoculadas (p<0,01; R²=0,955), e 14,4% para inoculadas com *A. brasilense* (p<0,01; R²=0,906). Entretanto, em 2011 observou-se resposta quadrática entre adubação e teor de proteína (p<0,01; R²=0,99), com estabilização ou redução na resposta sob doses elevadas de nitrogênio (>120 kg ha⁻¹). A contaminação por DON foi maior sob dose elevada de nitrogênio (3574 µg kg⁻¹; 120 kg ha⁻¹; sementes não inoculadas) em 2011, com resposta quadrática entre adubação e contaminação (p<0,05; R²=0,772). Outrossim, 37,5% das amostras apresentaram contaminação por DON superior ao limite máximo tolerado estabelecido pela legislação brasileira (2000 µg kg⁻¹; trigo integral). Os dados demonstraram que o manejo adequado de nitrogênio pode incrementar efeito intrínseco oriundo de melhoramento genético.

Palavras-chave: *Triticum aestivum* (L.), bactérias diazotróficas, nitrato de amônio, composição bromatológica, micotoxina, qualidade de grão

¹ Parte da Dissertação de Mestrado em Ciência de Alimentos do primeiro autor, apresentada à Universidade Estadual de Londrina, UEL, Londrina, PR.

² Discente do Curso de Mestrado em Ciência de Alimentos, UEL, Londrina, PR. E-mail: thiagomontagner_cv@hotmail.com

³ Pesquisador Dr. da EMBRAPA Soja, Londrina, PR. E-mail: andre.mateus@hotmail.com

³ Discentes do Curso de Doutorado em Ciência de Alimentos, UEL, Londrina, PR. E-mail: kcia_rt@yahoo.com.br; analusou@hotmail.com

⁴ Prof^{as} Dr^{as} do Dept^o de Ciência e Tecnologia de Alimentos, DCTA, UEL, Londrina, PR. E-mail: hirooka@uel.br; joice.sifuentes@gmail.com

⁵ Discente do Curso de Doutorado em Patologia Experimental, UEL, Londrina, PR. E-mail: angelicaishikawa@hotmail.com

⁶ Prof^a Dr^a do Dept^o de Ciências Patológicas, UEL, Londrina, PR. E-mail: itanoeiko@hotmail.com

⁷ Prof. do Food Hygiene Laboratory, Kagawa University, Miki-Cho, Kagawa, Japão. E-mail: kawamura@ag.kagawa-u.ac.jp

⁸ Prof. Dr. do Dept^o de Agronomia, UEL, Londrina, PR. E-mail: claudemircca@uel.br

* Autor para correspondência

Abstract

The impact of agricultural management practices on the quality of grain was evaluated in wheat (*Triticum aestivum* L. BRS Tangará) from the Central-Southern region of Paraná State (Ponta Grossa) in the crop years of 2010 and 2011. The field trial was carried out in succession with soybean (2010) and corn (2011). The treatments included inoculation of seeds with *Azospirillum brasilense* and increasing levels of nitrogen application in top dressing (0, 30, 60, 90 and 120 kg ha⁻¹). The experimental design was in randomized block, factorial 2 x 5 (inoculation x N level), with four replications. The parameters evaluated were water activity, moisture, protein, and grain contamination by deoxynivalenol (DON). The data were subjected to analysis of variance, comparison of means by Tukey's test ($p < 0.05$) and regression for nitrogen level. The inoculation of seeds with *A. brasilense* increased the protein content in grain in 2010 (+1.6%; 16.9 g 100g⁻¹) and 2011 (+1.7%, 15.7 g 100g⁻¹), independently of the nitrogen level ($p < 0.01$). Level of nitrogen in 2010 presented a positive linear response with protein content, increasing by 14.2% using non-inoculated seeds ($p < 0.01$, $R^2 = 0.955$) and 14.4% for those inoculated with *A. brasilense* ($p < 0.01$, $R^2 = 0.906$). However, in 2011 a quadratic response was observed between nitrogen level and protein content ($p < 0.01$, $R^2 = 0.99$), with stabilization or reduction in protein content using high levels of nitrogen (>120 kg ha⁻¹). The contamination by DON was greater using high levels of nitrogen (3574 µg kg⁻¹, 120 kg ha⁻¹; non-inoculated seeds) in 2011, with a quadratic response between nitrogen levels and contamination of grains ($p < 0.05$, $R^2 = 0.772$). Furthermore, 37.5% of the samples presented contamination by DON higher than the maximum tolerated limit established by Brazilian legislation (2000 µg kg⁻¹; whole-wheat grain). The data demonstrates that proper management of nitrogen enhances intrinsic effects arising from plant breeding.

Key words: *Triticum aestivum* (L.), diazotrophic bacteria, ammonium nitrate, bromatological composition, mycotoxin, quality grain

Introdução

O trigo (*Triticum aestivum* L.), monocotiledônea pertencente à família Poaceae (Gramíneas), destaca-se entre os cereais de maior cultivo mundial e importância na alimentação humana. O cereal ocupa o segundo lugar em volume de produção, com importante papel no agronegócio globalizado, pela adaptabilidade agrônômica, facilidade de armazenamento, qualidade nutricional e ampla diversidade de produtos derivados (WRIGLEY, 2009).

A produção nacional de trigo atingiu 5,8 milhões de toneladas na safra de 2011, caindo para 4,3 milhões de toneladas em 2012, devido principalmente à opção pelo milho de segunda safra, com preços mais favoráveis aos produtores. O Estado do Paraná é o principal produtor nacional do cereal, sendo responsável por 49% da produção de trigo na safra de 2012. No entanto, devido ao consumo de 10,5 milhões de toneladas (2012), há a necessidade de importação de trigo para o abastecimento do mercado interno (CONAB, 2013).

Embora o Brasil tenha condições de alcançar a autossuficiência no abastecimento de trigo, a produtividade e consequentemente a rentabilidade da cultura para o produtor é definida por uma série de fatores na pré-colheita, como técnicas de manejo e tratos culturais, cultivar, disponibilidade de nutrientes, especialmente nitrogênio, condições ambientais, pragas e doenças (TEIXEIRA FILHO et al., 2007).

Na produção, as doenças se apresentam como fator limitante para o cultivo de trigo no Brasil, com destaque para a fusariose ou giberela, cujo agente causal é o fungo *Gibberella zeae* (Schw.) Petch (anamórfico *Fusarium graminearum* Schwabe) (CASA et al., 2004). No país, entre os cultivares indicados para safra de 2012, não há cultivar resistente à doença disponível comercialmente, sendo em sua maioria cultivares classificados no máximo como moderadamente suscetível a giberela (BASSOI et al., 2012).

Após infecção a campo, além de reduzir a produtividade da planta, o fungo pode

produzir metabólitos secundários (micotoxina). Desoxinivalenol ou vomitoxina (DON) é a toxina predominante e importante economicamente na produção e segurança de grãos, ainda que seja menos tóxico que outros tricotecenos como nivalenol (NIV) e toxina T-2, e o esteroide zearalenona (ZEA), também produzidos por *F. graminearum* (VILLAR; CARSON, 2004). Segundo classificação da *International Agency for Research on Cancer*, DON pertence ao Grupo 3, isto é, não carcinogênico para humanos (IARC, 2002). No entanto, a exposição a níveis elevados de contaminação pode desencadear vômito, perda de peso, dores abdominais, diarreia e imunossupressão, sendo o suíno o animal mais sensível a intoxicações por DON (PESTKA, 2007).

A composição química do grão de trigo (umidade, proteína, carboidratos, lipídeos e minerais) determina as características funcionais tecnológicas e nutricionais e, juntamente com as propriedades estruturais, definem a qualidade da farinha de trigo (SCHEUER et al., 2011). A composição química, assim como a contaminação do grão por DON, além de não estarem uniformemente distribuídos no grão, podem variar em função de condições ambientais, práticas culturais, nível de suscetibilidade do cultivar, entre outros (MCKEVITH, 2004).

A inoculação de plantas com *Azospirillum* spp., bactéria capaz de fixar nitrogênio (N_2) e produzir hormônios que estimulam o crescimento vegetal (auxina e giberelina), pode resultar em variação significativa nos parâmetros de crescimento em diferentes cereais, tais como aumento da biomassa da planta, absorção de nutrientes, teor de nitrogênio nos tecidos, altura de planta, tamanho da folha, número de perfilhos, comprimento de raiz e volume (SALANTUR; OZTURK; AKTEN, 2006). Pesquisas sugerem que a inoculação de sementes com bactérias diazotróficas não substitui o adubo nitrogenado, porém, pode promover melhor absorção e utilização do nitrogênio disponível (SAUBIDET; FATTA; BARNEIX, 2002).

A disponibilidade de nutrientes para a planta é uma variável determinante na produção, tendo

o nitrogênio como principal fator limitante para o desenvolvimento e produtividade da cultura, devido à importância na formação de aminoácidos, proteínas, clorofila e enzimas essenciais, que estimulam o crescimento e desenvolvimento da parte aérea e sistema radicular da planta (BRADY, 1989; FUERTES-MENDIZABAL et al., 2010; PRANDO et al., 2012). Devido aos efeitos do nitrogênio na planta, a disponibilidade de nutriente no solo pode influenciar a qualidade nutricional e segurança dos grãos.

O trabalho objetivou avaliar o impacto de tratamentos culturais na qualidade de grão produzido (composição química e contaminação por desoxinivalenol), com enfoque na inoculação com *Azospirillum brasilense* (sementes não inoculadas ou inoculadas) e aplicação de doses crescentes de nitrogênio em cobertura (0, 30, 60, 90 e 120 kg ha⁻¹), cultivado em sucessão a cultura da soja (2010) e do milho (2011).

Material e Métodos

Localização e Caracterização da Área Experimental

O experimento a campo foi realizado na fazenda experimental da Embrapa-Produtos e Mercado (SPM), município de Ponta Grossa-PR, localizada a 25°09' latitude Sul, 50°06' longitude Oeste e altitude de 800 m. O solo da região é caracterizado como Latossolo Vermelho distroférrico (EMBRAPA, 2006). O clima, segundo a classificação de Köppen é Cfb, ou seja, temperado, com temperatura média no mês mais frio abaixo de 18°C, e temperatura média no mês mais quente abaixo de 22°C; com ausência de estação seca definida (CAVIGLIONE et al., 2000). Os dados de temperatura (°C) e precipitação diária (mm) durante o período de desenvolvimento da cultura foram fornecidos pela estação meteorológica da Embrapa, localizada a aproximadamente 3 km do experimento. Previamente à instalação dos experimentos foram coletadas amostras de solo da área experimental para análise química. A adubação de semeadura com nitrogênio, fósforo e potássio

(N-P-K) foi realizada conforme a análise de solo, seguindo as Indicações Técnicas da Comissão Brasileira de Pesquisa de Trigo e Triticale para o Estado do Paraná (FRONZA; CAMPOS; RIEDE, 2008). Para isso, utilizou-se 250 kg ha⁻¹ da fórmula 8-28-16, correspondendo a 20 kg ha⁻¹ de N, 70 kg ha⁻¹ de P₂O₅ e 40 kg ha⁻¹ de K₂O. O nitrato de amônio (32% de N e 3% de K₂O) foi aplicado em cobertura, em doses pré-estipuladas, no início do perfilhamento (estádio 2; LARGE, 1954). A quantidade de K₂O foi corrigida e todas as parcelas receberam a mesma quantidade deste nutriente.

Matéria-Prima e Insumos

O cultivar BRS Tangará (*Triticum aestivum* L.) utilizado no experimento é caracterizado por ser de ciclo médio (69 dias da emergência ao espigamento), moderadamente suscetível a giberela e pertencente à classe comercial Trigo Melhorador, sendo seu cultivo indicado para as regiões 1, 2 e 3 de valor de cultivo e uso (VCU) do Estado do Paraná (BASSOI et al., 2012). Previamente a semeadura as sementes foram divididas em duas porções (não inoculada e inoculada), para posterior tratamento com inoculante líquido comercial Azototal® (Total Biotecnologia®, Curitiba, Brasil), contendo a bactéria *Azospirillum brasilense* estirpe Ab-V5 e Ab-V6 na concentração de 1x10⁸ células viáveis mL⁻¹, na dose de 4 mL do produto comercial para cada kg de semente. Os experimentos foram conduzidos com sementes não tratadas com inseticida e/ou fungicida.

Delineamento experimental

O delineamento experimental foi em bloco casualizado, esquema fatorial 2 x 5 (inoculação com *Azospirillum brasilense* x dose de N), com quatro repetições. O experimento foi conduzido em dois anos agrícola, em sucessão à cultura da soja (2010) e do milho (2011), utilizando sistema de plantio direto. Os tratamentos consistiram na avaliação de sementes não inoculadas ou inoculadas

com *Azospirillum brasilense* e doses crescentes de nitrogênio em cobertura (0, 30, 60, 90 e 120 kg ha⁻¹), aplicado no início de perfilhamento (estádio 2; LARGE, 1954). A parcela experimental foi constituída por 22 linhas, espaçadas em 20 cm e com seis metros de comprimento. Considerou-se como área útil da parcela as 12 linhas centrais, desprezando 1,0 m nas extremidades, totalizando 9,6 m² de área útil.

Procedimento operacional

O trigo foi semeado mecanicamente (semeadora adubadora de 11 linhas), obtendo-se densidade aproximada de 300 plantas m⁻² (considerando a taxa de germinação). Os tratos culturais foram realizados de acordo com as Indicações Técnicas da Comissão Brasileira de Pesquisa de Trigo e Triticale para o Estado do Paraná (FRONZA; CAMPOS; RIEDE, 2008). A área experimental foi monitorada semanalmente e a aplicação de fungicida realizada no aparecimento dos primeiros sintomas da doença. Durante a condução do experimento em 2010 foram realizadas duas aplicações de fungicida aos 59 e 82 dias após a emergência das plantas (DAE) (Tebuconazole, 1,0 L ha⁻¹). Em 2011, foram realizadas três aplicações, sendo as duas primeiras de fungicida aos 70 e 92 DAE (Tebuconazole, 0,75 L ha⁻¹), e uma terceira de mistura de fungicida e inseticida aos 104 DAE (Metconazole, 1,0 L ha⁻¹; Tiametoxam, 0,2 L ha⁻¹). O controle de plantas daninha foi feito quando necessário, em caso de infestação no período crítico para a cultura (emergência ao espigamento). A colheita mecânica ocorreu quando os grãos atingiram o estágio 11.4 ou ponto de maturação de colheita (LARGE, 1954). Após limpeza, as amostras foram moídas, realizando higienização do equipamento entre amostras (álcool 70%), em moinho de martelo a 30 mesh (MOD MA-090, Marconi®, Piracicaba-SP, Brasil) e armazenadas a -18 °C (MOD FE26, Electrolux®, Manaus, Brasil) até as análises (físico-químicas e quantificação de desoxinivalenol).

Análise físico-química

As análises físico-químicas foram realizadas nas amostras obtidas a partir da moagem dos grãos a 30 *mesh*. A atividade de água foi determinada por leitura em equipamento Aqualab (MOD 4TE, Decagon Devices®, Pullman, Estados Unidos), seguindo especificações descritas pelo fabricante ($24,93 \pm 0,07$ °C). Para determinação do teor de umidade realizou-se a secagem da amostra por 12 horas em estufa a 105 °C (MOD NV 1.5, Nevoni®, São Paulo, Brasil), com posterior resfriamento em dessecador e pesagem (IAL, 2008). O teor de proteína foi determinado pelo Método de Kjeldahl, utilizando bloco digestor (MOD TE-40/25, Tecnal®, Piracicaba, Brasil) e destilador de nitrogênio (MOD TE-036/1, Tecnal®, Piracicaba, Brasil), com posterior conversão do nitrogênio em proteína pelo fator 5,7 (MOSSE, 1990; AOAC, 1995) e cálculo das concentrações em base seca.

Determinação de Desoxinivalenol

A determinação de DON foi realizada por ensaio imunoenzimático ic-ELISA (*indirect competitive Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), conforme método descrito por Kawamura (2005), adaptando as modificações de Santos et al. (2011b).

Para a extração de DON, cinco gramas de trigo triturado (30 *mesh*) adicionado de 40 mL de metanol:água (70:30, v/v), foram homogeneizadas a 150 rpm/30 minutos a 10 °C (incubadora refrigerada, MOD MA-830/A, Marconi®, Piracicaba, Brasil), seguido de centrifugação a 800 xg por 5 minutos a 10 °C (MOD 5804 R (Eppendorf AG®, Hamburg, Alemanha). O sobrenadante resultante foi mantido a -18 °C por 18 horas (MOD FE26, Electrolux®, Manaus, Brasil) e centrifugado novamente a 2250 xg por 5 minutos. Alíquotas de 400 µL foram secas sob fluxo de nitrogênio gasoso a 40 °C (banho-maria, MOD MA-127, Marconi®, Piracicaba, Brasil) e estocadas a -18 °C até análise.

Para a quantificação de DON, microplaca de 96 poços (Corning®, Corning, Estados Unidos) foi sensibilizada com conjugado Desoxinivalenol-

Hemissuccinato-Ovoalbumina (DON-HS-OVA; 2 µg mL⁻¹), bloqueado com solução de leite desnatado 1% (Molico-Nestle®, Araçatuba, Brasil) em PBS (*Phosphate-Buffered Saline* 0,015M pH 7,3) e submetido à competição com anticorpo monoclonal (19,2 mg mL⁻¹) diluído em leite desnatado 1% (1:2000 v/v). A absorbância das amostras foi lida ($\lambda=450$ nm) em leitora de ELISA (MOD Asys Expert Plus, Biochrom®, Cambridge, Reino Unido), após adição de solução de substrato cromógeno TMB (3,3',5,5'-tetrametil-benzidina) e solução de bloqueio (ácido sulfúrico 1M). A curva de calibração de DON (15,625; 31,25; 62,5; 125; 250; 500 e 1000 ng mL⁻¹) foi preparada em metanol:PBS-Tween 20 0,05% (1:9, v/v).

Os cálculos de limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) de DON foram realizados conforme descrito por Soares (2006). O LD obtido foi de 14 ng mL⁻¹ (correspondente a 113 µg kg⁻¹), calculado como três vezes o desvio padrão (DP) da absorbância de sete réplicas de poços onde não foi adicionado padrão (branco do padrão). O LQ obtido foi de 56 ng mL⁻¹ (correspondente a 445 µg kg⁻¹), calculado como dez vezes o DP do branco do padrão. Foram consideradas como não detectado (ND) as amostras que apresentaram contaminação abaixo do LD. O método apresentou recuperação média de 103% de DON (contaminação artificial de 350, 750 e 1750 µg kg⁻¹) e desvio padrão relativo médio de 12,8%, estando de acordo com o *Codex Alimentarius*, que recomenda a utilização de métodos para determinação de micotoxinas que apresentem recuperação entre 60 e 120%, e desvio padrão relativo (DPR) inferior a 20% (FAO/WHO, 2013).

Análise Estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), comparação de médias pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) e regressão para dose de nitrogênio em cobertura, utilizando o programa STATISTICA *for Windows* versão 7.0 e programa SISVAR versão 4.0 (Sistema para Análise de Variância).

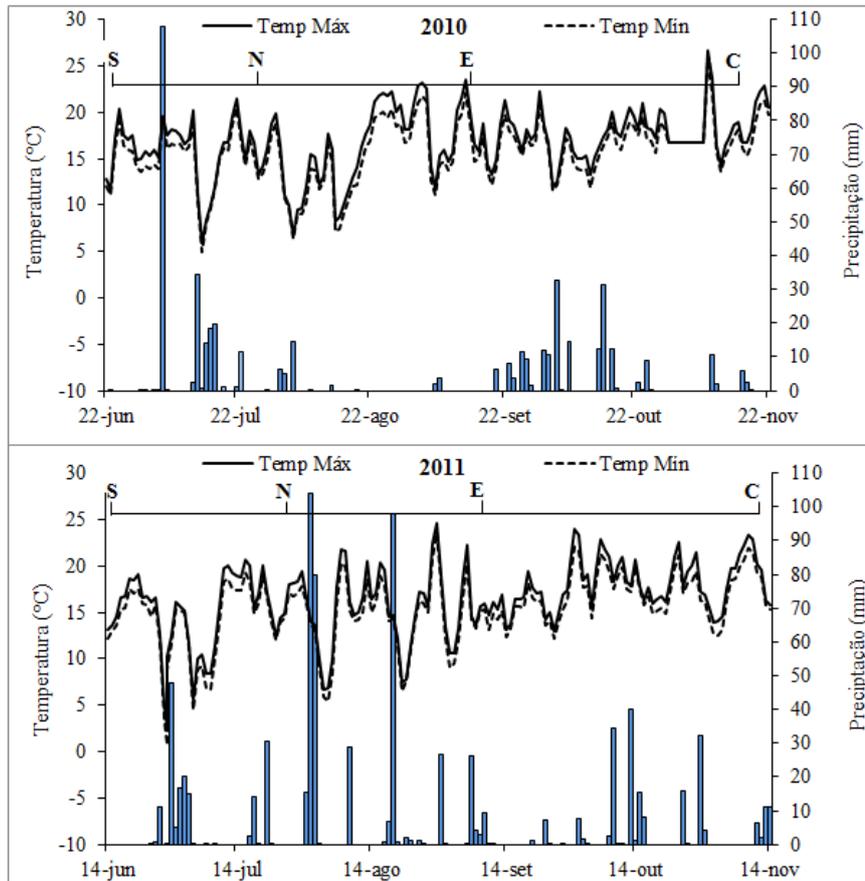
Resultados e Discussão

O resultado das amostras de solo coletadas entre 0 e 20 cm de profundidade foi: pH (CaCl_2): 4,7; C: $18,9 \text{ g dm}^{-3}$; P (Mehlich 1): $2,7 \text{ mg dm}^{-3}$; H+Al: $2,4 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$; K: $0,3 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$; Ca: $4,5 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$; Mg: $2,0 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$; e CTC: $9,3 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$. A acidez do solo na área experimental (pH 4,7) constituiu fator negativo para a planta, devido possível redução na disponibilidade de minerais em $\text{pH} < 5$, principalmente nitrogênio, fósforo, cálcio e magnésio. Em pH ácido ($< 5,5$), a disponibilidade de alumínio pode aumentar a níveis tóxicos, assim como cádmio e metais pesados, e a disponibilidade de molibdênio pode ser reduzida, sendo esse elemento importante para o *Azospirillum* na formação da

nitrogenase e posterior fixação do nitrogênio atmosférico (HAZELTON; MURPHY, 2007). A capacidade de troca catiônica ($\text{CTC} = 9,3 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$) observada é característica de solos tropicais, com capacidade reduzida para reter cátions em forma trocável, não sendo recomendada aplicação de dose única e elevada de adubação e calagem. A saturação por base (73,9%) encontra-se na faixa recomendada para a cultura do trigo no Estado do Paraná (70%) (RONQUIM, 2010).

A precipitação pluviométrica total acumulada durante o ciclo da cultura foi de 437 e 796 mm para 2010 e 2011, respectivamente (Figura 1), atendendo a necessidade mínima da cultura de 300 mm (FORNASIERI FILHO, 2008).

Figura 1. Temperatura máxima e mínima diária ($^{\circ}\text{C}$), e precipitação (mm) em Ponta Grossa-PR (2010 e 2011). S: Semeadura, N: Adubação nitrogenada de cobertura, E: Espigamento, C: Colheita.



Fonte: Dados fornecidos pela Embrapa-SPM.

Na Tabela 1 é apresentado o resumo da análise de variância para os parâmetros avaliados (atividade de água, umidade, proteína e contaminação por DON) em resposta a inoculação de sementes

com *Azospirillum brasilense*, aplicação de doses crescentes de nitrogênio em cobertura e interação de fatores.

Tabela 1. Análise de variância (Prob.>F) – Atividade de água, umidade, proteína e contaminação por desoxinivalenol em trigo (*Triticum aestivum* L. BRS Tangará), em resposta a inoculação de sementes com *Azospirillum brasilense* (inoculação), aplicação de doses crescentes de nitrogênio em cobertura (dose) e interação de fatores (inoculação x dose).

Fator de Variação	GL	a _w		Umidade (g 100g ⁻¹)		Proteína (g 100g ⁻¹)		DON (µg kg ⁻¹)	
		2010	2011	2010	2011	2010	2011	2010	2011
Bloco	3	0,140 ^{ns}	0,859 ^{ns}	0,070 ^{ns}	0,043*	0,004**	0,500 ^{ns}	0,000**	0,251 ^{ns}
Inoculação (I)	1	0,185 ^{ns}	0,103 ^{ns}	0,001**	0,680 ^{ns}	0,006**	0,002**	0,890 ^{ns}	0,003**
Dose (D)	4	0,047*	0,099 ^{ns}	0,677 ^{ns}	0,081 ^{ns}	0,000**	0,000**	0,242 ^{ns}	0,000**
I x D	4	0,692 ^{ns}	0,011*	0,382 ^{ns}	0,001**	0,764 ^{ns}	0,507 ^{ns}	0,734 ^{ns}	0,014*
CV (%)		3,13	2,29	2,40	1,82	1,73	2,32	45,75	36,06

^{ns}, ** e *: não significativo e significativo a 1% e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F; GL: Graus de liberdade; CV: Coeficiente de variação; a_w: Atividade de água; DON: Desoxinivalenol.

Fonte: Elaboração dos autores.

A inoculação de sementes com *A. brasilense* resultou em redução da atividade de água nas amostras (grão moído a 30 mesh) em 2011, para os tratamentos com aplicação de 0 e 30 kg ha⁻¹ de nitrogênio (Tabela 2; p<0,05). Embora observada diferença, os grãos apresentaram níveis baixos de atividade de água, próximo a 0,60, ideal para manter a qualidade e estabilidade durante o armazenamento, por dificultar a ocorrência de reações químicas e deterioração por fungos (GONELI et al., 2007). A inoculação de sementes com *A. brasilense* (12,5 g 100g⁻¹) também resultou em redução de 2,8% no teor de umidade em 2010, comparando com a não inoculada (12,8 g 100g⁻¹), independente da dose de nitrogênio aplicada (p<0,01). Contudo, a umidade do grão, quando não adequada principalmente para o armazenamento, pode ser reduzida através de processo de secagem, fator esse importante e diretamente ligado à qualidade do grão de trigo e seus produtos. Apesar dos resultados observados, alterações no teor de umidade e atividade de água do grão podem ocorrer durante o preparo das amostras previamente às análises (moagem e armazenamento).

O teor de proteína no grão aumentou com a utilização de sementes inoculadas com *A. brasilense* em 2010 (+1,6%; 16,9 g 100g⁻¹) e 2011 (+1,7%; 15,7 g 100g⁻¹), independente da dose de nitrogênio aplicada (p<0,01). A inoculação de bactérias diazotróficas em plantas, a exemplo do *A. brasilense*, dependendo do ambiente e da interação com a planta, podem converter o nitrogênio atmosférico e disponibilizá-lo para as plantas, resultando em alterações na composição do grão. A inoculação com *Azospirillum* spp. pode resultar em variação significativa em parâmetros de cereais (biomassa, altura da planta, tamanho de folha, número de perfilhos e teor de nitrogênio nos tecidos e grão), devido a melhor absorção de nutrientes, proporcionado pelo aumento no comprimento de raiz e volume, induzido por fito-hormônios (auxina e giberelina) produzidos pela bactéria e liberados para a planta (SALANTUR; OZTURK; AKTEN, 2006).

Piccinin et al. (2013), utilizando a mesma concentração de inóculo (10⁸ UFC mL⁻¹) e cepas de *A. brasilense* (Ab-V5 e Ab-V6), nos anos de

2010 e 2011 na região de Maringá-PR, constataram que *A. brasilense* é uma alternativa capaz de suprir parcialmente a demanda de nitrogênio pela planta, com suplementação por fertilizante nitrogenado. Os autores observaram que a aplicação de metade da dose recomendada de nitrogênio associada com o inoculante, promoveram resultados positivos no desempenho agrônômico e produtividade de trigo. Entretanto, a inoculação de *A. brasilense* em plantas de trigo não substitui o adubo nitrogenado, porém, resulta em maior absorção e melhor utilização do nitrogênio disponível pelo aumento do crescimento radicular (SAUBIDET; FATTA; BARNEIX, 2002).

A inoculação com *A. brasilense* em 2011 resultou em incremento na contaminação dos grãos por DON (+46,5%; 2437 $\mu\text{g kg}^{-1}$), independente da dose de nitrogênio aplicada ($p < 0,01$), em nível superior ao limite máximo tolerado (LMT) vigente para trigo integral (2000 $\mu\text{g kg}^{-1}$), estabelecido pela legislação brasileira (BRASIL, 2011). Entretanto, a resposta foi dependente das condições ambientais, uma vez que o efeito significativo foi observado apenas em 2011 ($p < 0,01$), não sendo encontrados na literatura estudos sobre a relação entre inoculação com *A. brasilense* e a contaminação por DON.

Conforme observado na Tabela 2 e representado graficamente na Figura 2, a aplicação de doses crescentes de nitrogênio em cobertura foi a variável de maior influência nos parâmetros avaliados no grão.

O incremento na dose de nitrogênio em 2011 resultou em aumento quadrático na atividade de água das amostras (grão moído a 30 *mesh*), para o tratamento utilizando semente inoculada com *A. brasilense*, conforme representado na Figura 2 ($p < 0,05$; $R^2 = 0,966$). Conforme a Tabela 2 e Figura 2, em 2011 o teor de umidade apresentou aumento de 4,4%, comparando as doses de 0 e 120 kg ha^{-1} de nitrogênio, além de efeito linear positivo com o incremento da adubação ($p < 0,01$; $R^2 = 0,811$), para o tratamento utilizando sementes inoculadas com *A. brasilense*. O incremento da adubação nitrogenada

prolonga o período de crescimento vegetativo da planta, devido ao atraso na senescência foliar, aumentando o ciclo da cultura e interferindo no rendimento e qualidade dos grãos (WINGLER et al., 2006). Assim, a diferença no ponto de maturação de cada parcela ocorreu em função da dose utilizada (0-120 kg ha^{-1}), sendo possível observar pelo aumento da umidade do grão com o incremento da adubação.

O teor de proteína no grão apresentou aumento linear em 2010 e quadrático em 2011, em resposta ao incremento da dose de nitrogênio, conforme representado na Figura 2. Em 2010, o teor de proteína no grão apresentou aumento linear de 14,2% com a utilização de sementes não inoculadas ($p < 0,01$; $R^2 = 0,955$) e 14,4% com sementes inoculadas com *A. brasilense* ($p < 0,01$; $R^2 = 0,906$), comparando as doses de 0 e 120 kg ha^{-1} . Em 2011, o incremento na disponibilidade de nitrogênio para a planta também resultou em aumento no teor de proteína no grão (resposta quadrática). Entretanto, aplicação de doses superiores a 60 kg ha^{-1} não resultou em aumento significativo ($p > 0,05$), chegando a uma estabilização ou redução no teor de proteína no grão caso doses elevadas fossem aplicadas ($> 120 \text{ kg ha}^{-1}$) (Tabela 2; Figura 2).

Conforme apresentado na Tabela 2, os teores de proteína obtidos sem a aplicação de nitrogênio em cobertura (0 kg ha^{-1}) foram maiores em 2010, utilizando sementes não inoculadas (15,4 $\text{g } 100\text{g}^{-1}$) e inoculadas com *A. brasilense* (15,6 $\text{g } 100\text{g}^{-1}$), do que em 2011, para as mesmas condições de sementes não inoculadas (13,7 $\text{g } 100\text{g}^{-1}$) e inoculadas com *A. brasilense* (14,2 $\text{g } 100\text{g}^{-1}$). Essa diferença observada entre os anos está possivelmente relacionada, além de fatores ambientais, ao teor de nitrogênio residual presente na parcela experimental, resultado da incorporação dos resíduos da cultura anterior em 2010 (soja) e 2011 (milho) no solo e subsequente utilização pela planta de trigo. A relação C/N do resíduo da cultura do milho é alta, promovendo maior imobilização de N no solo e, conseqüente redução na quantidade de N disponível para a planta de trigo (BRAZ et al., 2006).

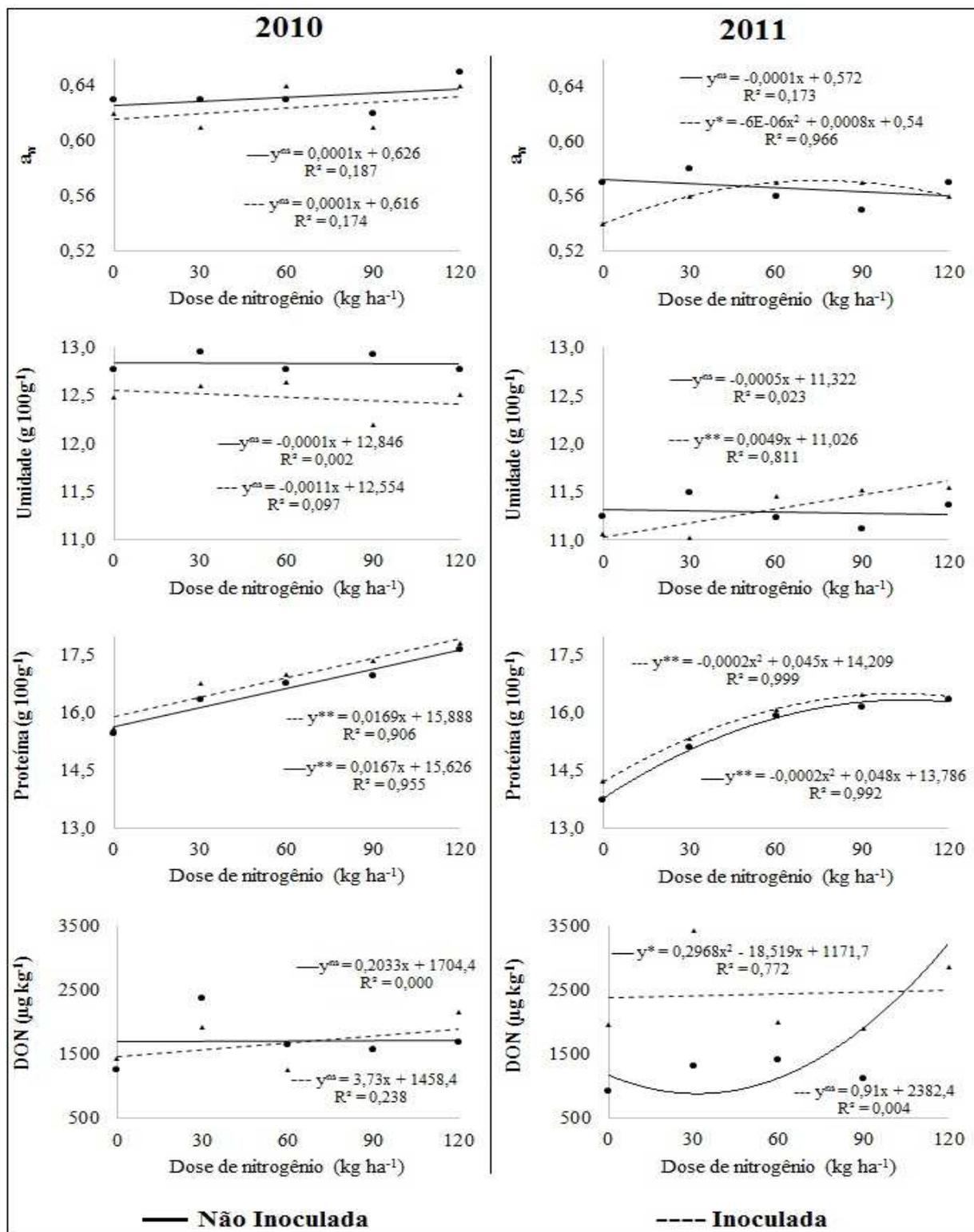
Tabela 2. Atividade de água, umidade, proteína e contaminação por desoxinivalenol em trigo (*Triticum aestivum* L. BRS Tangará), em resposta a inoculação de sementes com *Azospirillum brasilense* e aplicação de doses crescentes de nitrogênio em cobertura.

Nitrogênio (kg ha ⁻¹)	2010		Umidade (g 100g ⁻¹)		Proteína (g 100g ⁻¹)		DON (µg kg ⁻¹)	
	Não Inoculada	Inoculada	Não Inoculada	Inoculada	Não Inoculada	Inoculada	Não Inoculada	Inoculada
0	0,63 ± 0,04 ^{aA}	0,62 ± 0,01 ^{aA}	12,77 ± 0,40 ^{aA}	12,48 ± 0,24 ^{aA}	15,45 ± 0,52 ^{aD}	15,57 ± 1,03 ^{aC}	1268 ± 1930 ^{aA}	1447 ± 982 ^{aA}
30	0,63 ± 0,03 ^{aA}	0,61 ± 0,06 ^{aA}	12,96 ± 0,58 ^{aA}	12,60 ± 0,65 ^{aA}	16,33 ± 0,34 ^{bC}	16,77 ± 0,43 ^{aB}	2378 ± 1509 ^{aA}	1926 ± 1585 ^{aA}
60	0,63 ± 0,03 ^{aA}	0,64 ± 0,01 ^{aA}	12,77 ± 0,37 ^{aA}	12,64 ± 0,75 ^{aA}	16,76 ± 0,47 ^{aBC}	17,00 ± 0,72 ^{aB}	1657 ± 818 ^{aA}	1257 ± 1366 ^{aA}
90	0,62 ± 0,02 ^{aA}	0,61 ± 0,04 ^{aA}	12,93 ± 0,53 ^{aA}	12,20 ± 0,38 ^{bA}	16,96 ± 0,27 ^{aB}	17,36 ± 0,50 ^{aAB}	1585 ± 1446 ^{aA}	1623 ± 2107 ^{aA}
120	0,65 ± 0,03 ^{aA}	0,64 ± 0,03 ^{aA}	12,77 ± 0,57 ^{aA}	12,51 ± 0,55 ^{aA}	17,64 ± 0,28 ^{aA}	17,81 ± 0,59 ^{aA}	1695 ± 1617 ^{aA}	2158 ± 2415 ^{aA}
2011								
0	0,57 ± 0,02 ^{aAB}	0,54 ± 0,01 ^{bB}	11,25 ± 0,39 ^{aA}	11,06 ± 0,33 ^{aBC}	13,74 ± 0,54 ^{aC}	14,22 ± 0,51 ^{aC}	914 ± 435 ^{aB}	1965 ± 1913 ^{aA}
30	0,58 ± 0,01 ^{aA}	0,56 ± 0,04 ^{bAB}	11,50 ± 0,47 ^{aA}	11,02 ± 0,31 ^{bC}	15,11 ± 0,15 ^{aB}	15,33 ± 0,18 ^{aB}	1306 ± 621 ^{bB}	3436 ± 610 ^{aA}
60	0,56 ± 0,02 ^{aABC}	0,57 ± 0,01 ^{aAB}	11,23 ± 0,19 ^{aA}	11,46 ± 0,28 ^{aAB}	15,92 ± 0,51 ^{aA}	16,10 ± 0,23 ^{aA}	1407 ± 333 ^{aB}	2009 ± 1604 ^{aA}
90	0,55 ± 0,02 ^{aBC}	0,57 ± 0,02 ^{aA}	11,12 ± 0,42 ^{bA}	11,52 ± 0,48 ^{aA}	16,14 ± 0,43 ^{aA}	16,49 ± 0,33 ^{aA}	1116 ± 872 ^{aB}	1911 ± 1580 ^{aA}
120	0,57 ± 0,00 ^{aAB}	0,56 ± 0,01 ^{aAB}	11,37 ± 0,39 ^{aA}	11,55 ± 0,20 ^{aA}	16,35 ± 0,25 ^{aA}	16,42 ± 0,42 ^{aA}	3574 ± 462 ^{aA}	2864 ± 1922 ^{aA}

Média ± desvio padrão; Médias seguidas por letra minúscula diferentes indica diferença entre colunas (sementes não inoculada e inoculada com *Azospirillum brasilense*), pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade; Médias seguidas por letra maiúsculas diferentes indica diferença entre linhas (doses crescentes de nitrogênio em cobertura), pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade; Proteína em base seca; a^w: Atividade de água.

Fonte: Elaboração dos autores.

Figura 2. Atividade de água, umidade, proteína e contaminação por desoxinivalenol em trigo (*Triticum aestivum* L. BRS Tangará), em resposta a inoculação de sementes com *Azospirillum brasilense* e aplicação de doses crescentes de nitrogênio em cobertura.



ns, ** e *: não significativo e significativo a 1% e 5% pelo teste t de Student, respectivamente.

Fonte: Elaboração dos autores.

Prando et al. (2012), avaliando efeito de fontes e doses de nitrogênio (0-120 kg ha⁻¹) em genótipos de trigo, observaram que o teor de nitrogênio no grão não foi alterado significativamente pelas doses, contudo, o nitrogênio acumulado no grão aumentou linearmente com o incremento da dose de nitrogênio aplicadas em cobertura (p<0,01; R²=0,831). Outros autores, avaliando a resposta de cultivares de trigo a adubação nitrogenada (0-240 kg ha⁻¹), observaram aumento de 28,3% no teor de proteína sob dose elevada de nitrogênio (120 kg ha⁻¹). Outrossim, utilizando o dobro da dose (240 kg ha⁻¹), observou-se aumento de 40,1% no teor de proteína, em comparação com o controle (0 kg ha⁻¹) (KINDRED et al., 2008).

Conforme observado por Fuertes-Mendizabal et al. (2010), o aumento no teor de proteína pode refletir diretamente na qualidade tecnológica do grão. Avaliando o efeito de doses de nitrogênio (0-180 kg ha⁻¹) na qualidade tecnológica dos grãos, os autores observaram correlação positiva e significativa entre a força de glúten (W; r=0,952), extensibilidade (L; r=0,953) e tenacidade (P; r=0,900) da massa, com o aumento do teor de proteína no grão em resposta ao incremento na adubação nitrogenada (p<0,01). Outrossim, os autores observaram que das proteínas analisadas no grão, a gliadina (r=0,931) e a glutenina (r=0,994), formadoras do glúten, apresentaram alta correlação positiva com a adubação (p<0,01).

Conforme apresentado na Tabela 2, em 2011 a contaminação dos grãos por DON apresentou

diferença significativa em resposta às doses de nitrogênio aplicado em cobertura, utilizando sementes não inoculadas com *A. brasilense* (p<0,05). Conforme representado na Figura 2, observou-se maior contaminação do grão por DON (3574 µg kg⁻¹) com a aplicação de dose elevada de nitrogênio (120 kg ha⁻¹) e utilizando sementes não inoculadas, com resposta quadrática positiva entre a contaminação dos grãos e o incremento na adubação (p<0,05; R²=0,772). Resultados semelhantes foram observados no Canadá, onde pesquisadores avaliando a influência da aplicação de doses de nitrogênio (0-100 kg ha⁻¹) em 3 safras da cultura de trigo (2003, 2004 e 2005), não observaram efeito significativo da adubação na contaminação dos grãos por DON, mas constataram que a utilização de dose elevada de nitrogênio resultou em alguns casos em aumento na contaminação dos grãos (MA et al., 2013).

Conforme apresentado na Tabela 3, a contaminação dos grãos de trigo por DON em 2010 variou entre <LQ e 4424 µg kg⁻¹, e entre <LQ e 3934 µg kg⁻¹ em 2011. A maior média de contaminação observada em 2011 (2093 µg kg⁻¹), em comparação com 2010 (1768 µg kg⁻¹), pode estar relacionada ao resíduo da cultura anterior presente no solo. O milho cultivado previamente ao trigo em 2011 é uma potencial fonte de inóculo de *Fusarium graminearum*, agente causal da giberela (fusariose) e produtor de DON.

Tabela 3. Estimativa da concentração de desoxinivalenol por ic-ELISA em amostras (n=80 amostras) de trigo (*Triticum aestivum* L. BRS Tangará), Ponta Grossa-PR (2010 e 2011).

Ano	Amostras Positivas – DON (µg kg ⁻¹)		
	n	Média	Faixa
2010	40	1768	<LQ – 4424
2011	40	2093	<LQ – 3934
Total	80	1932	<LQ – 4424

Amostras positivas: resultado acima do limite de detecção (LD = 113 µg kg⁻¹); LQ: Limite de quantificação (445 µg kg⁻¹); Média: valores superiores ao LQ; DON: desoxinivalenol, n: número de amostra.

Fonte: Elaboração dos autores.

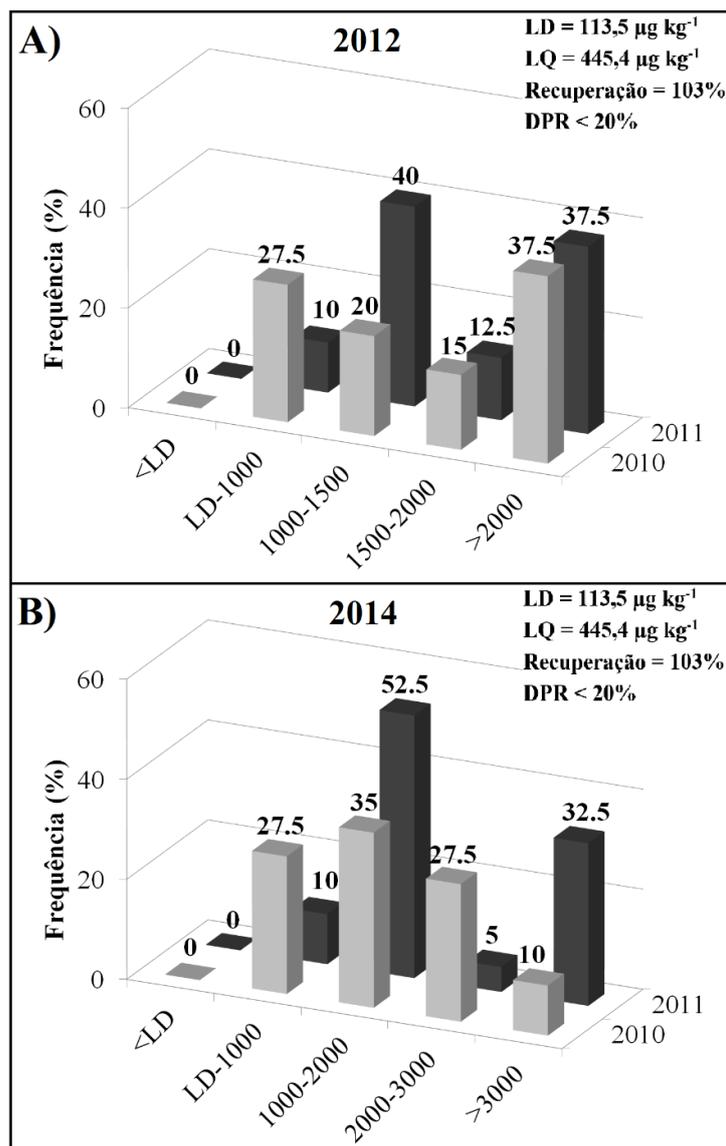
Blandino et al. (2012), analisando grãos naturalmente contaminados por DON em experimentos a campo, observaram que as variáveis avaliadas (controladas) apresentaram a seguinte ordem de influência na produção da micotoxina: suscetibilidade da cultivar \geq cultura antecessora \geq sistema de plantio \geq aplicação de fungicida no período de antese do trigo. Entretanto, as condições climáticas ocorridas no desenvolvimento da cultura podem alterar a ordem de influência dos fatores apresentados. Durante o experimento a campo observou-se que, sete dias antes e após o espigamento ocorreu maior precipitação em 2011 (43 mm) em relação a 2010 (5,8 mm), com temperatura média amena de 14,5 e 17,8°C para 2011 e 2010, respectivamente. Assim, além da presença de inóculo na área, a condição ambiental observada em 2011 favoreceu o aparecimento da fusariose, uma vez que a doença manifesta-se com maior intensidade em regiões com excesso de chuva e temperatura amena, durante o período de floração e maturação do grão (DEL PONTE et al., 2004).

Conforme apresentado na Figura 3A, 37,5% (30/80) das amostras analisadas em 2010 e 2011 apresentaram contaminação por DON acima do limite máximo tolerado (LMT), considerando o grão obtido no experimento como trigo integral ou farinha de trigo integral (grão moído a 30 *mesh*), com LMT de 2000 $\mu\text{g kg}^{-1}$, conforme estabelecido pela Resolução – RDC nº 7 de 18 de fevereiro de 2011 (BRASIL, 2011). Entretanto, conforme disposto na resolução, em 2014 entrará em vigor uma nova medida com LMT de 3000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para trigo destinado ao processamento. Assim, conforme apresentado na Figura 3B, 10% e 32,5% das amostras de 2010 e 2011 respectivamente, apresentariam contaminação superior ao LMT previsto.

O nível mais elevado do LMT para DON em grão de trigo destinado ao processamento deve-se aos possíveis efeitos que as etapas de processamento e preparo para consumo possam ter sobre a micotoxina. Israel-Roming e Avram (2010), analisando o efeito da moagem e temperatura durante a panificação sobre a contaminação natural de grãos por DON (1111 $\mu\text{g kg}^{-1}$; 100%), observaram que com o processo de moagem houve diminuição (70%) da concentração de DON na farinha de trigo obtida (<50 *mesh*, 780 $\mu\text{g kg}^{-1}$). Além disso, observaram que o uso de 230 °C no processo de panificação reduziu em 7,6% (720 $\mu\text{g kg}^{-1}$) o teor de DON encontrado na farinha após a moagem do grão. Segundo os autores, o processo de moagem não reduz a contaminação por micotoxina, mas promove uma redistribuição entre os produtos obtidos pelo processo.

Os níveis de contaminação por DON observados em Ponta Grossa (2010 e 2011) foram superiores aos relatados por Santos et al. (2011a). Os autores, avaliando trigo em grão (21 amostras) da região Norte (Londrina e Sertãoópolis) e Sudeste (Dois Vizinhos) do Estado do Paraná, observaram contaminação por DON variando entre 93 e 610 $\mu\text{g kg}^{-1}$, em 14 amostras positivas (66,6%). Entretanto, a comparação entre os resultados é complexa, devido à influência de fatores como cultivar (suscetibilidade), região (precipitação e temperatura), entre outros. Além disso, segundo Whitaker et al., (2000), a variabilidade associada com cada etapa da determinação de micotoxina, amostragem (CV = 6,3%), preparo de amostra (CV = 10%) e método de análise (CV = 6,3%), contribui para a variabilidade total dos resultados, tornando difícil estimar a concentração da toxina com elevado grau de confiança.

Figura 3. Distribuição dos níveis de DON em amostras (n=80) de trigo (*Triticum aestivum* L. BRS Tangará) da Região Centro Sul do Estado do Paraná (Ponta Grossa, 2010 e 2011) baseando-se no limite máximo tolerado (LMT) vigente a partir de: A) 2012 ($2000 \mu\text{g kg}^{-1}$) – Trigo integral, trigo para quibe, farinha de trigo integral e farelo de trigo; B) 2014 ($3000 \mu\text{g kg}^{-1}$) – Trigo em grão para posterior processamento.



Fonte: Elaboração dos autores.

Conclusões

A inoculação de sementes com *Azospirillum brasilense* e a aplicação de doses crescentes de nitrogênio em cobertura resultaram no aumento do teor de proteína nos grãos de trigo produzidos em 2010 e 2011 ($p < 0,01$). A inoculação de sementes e adubação nitrogenada também resultaram em alterações significativas na atividade de água,

umidade e contaminação dos grãos por DON ($p < 0,05$). Entretanto, os resultados obtidos diferiram nos anos avaliados, indicando dependência das respostas a fatores climáticos.

Devido às diferenças climáticas ocorridas durante o desenvolvimento dos experimentos, novos estudos são necessários para avaliar se a inoculação de sementes com *Azospirillum brasilense* e o

manejo de nitrogênio no solo seriam procedimentos adicionais, que possibilitariam o aumento da produtividade e da qualidade dos grãos de trigo.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico Tecnológico (CNPq) em associação com o MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), ao UGF Fundo Paraná-SETI e a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) – Projeto Nanobiotecnologia (nº 23) pelo suporte financeiro.

Referências

- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. Official methods of analysis. 16. ed. Washington: AOAC, 1995. v. 2, 1298 p.
- BASSOI, M. C.; RIEDE, C. R.; CAMPOS, L. A. C.; FOLONI, J. S. S. *Cultivares de trigo – Embrapa e Iapar*. Londrina: Embrapa Soja, 2012. 52 p.
- BLANDINO, M.; HAIDUKOWSKI, M.; PASCALE, M.; PLIZZARI, L.; SCUDELLARI, D.; REYNERI, A. Integrated strategies for the control of *Fusarium* head blight and deoxynivalenol contamination in winter wheat. *Field Crops Research*, Amsterdam, v. 133, p. 139-149, 2012.
- BRADY, N. C. *Natureza e propriedades dos solos*. 7. ed. Rio de Janeiro: Freitas Bastos, 1989. 39 p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011. Regulamento técnico sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, 9 mar. 2011. n. 46. Seção 1, p. 66-69.
- BRAZ, A. J. B. P.; SILVEIRA, P. M.; KLIEMANN, H. J.; ZIMMERMANN, F. J. P. Adução nitrogenada em cobertura na cultura do trigo em sistema plantio direto após diferentes culturas. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 30, n. 2, p. 193-198, 2006.
- CASA, R. T.; REIS, E. M.; BLUM, M. M. C.; BOGO, A.; SCHEER, O.; ZANATA, T. Danos causados pela infecção de *Gibberella zeae* em trigo. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 29, n. 3, p. 289-293, 2004.
- CAVIGLIONE, J. H.; KIIHL, L. R. B.; CARAMORI, P. H.; OLIVEIRA, D. *Cartas climáticas do Paraná*. Londrina: IAPAR, 2000. CD-ROM.
- CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION – FAO/WHO. Proposed draft maximum levels for deoxynivalenol in cereals and cereal-based products and associated sampling plans, 2013 (CX/CF 13/7/7). Moscou: FAO/WHO, 2013.
- COMPANIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB. *Acompanhamento de safra brasileira: grãos, quinto levantamento*. Brasília: Conab, 2013.
- DEL PONTE, E. M.; FERNANDES, J. M. C.; PIEROBOM, C. R.; BERGS TROM, G. C. Giberela do trigo – aspectos epidemiológicos e modelos de previsão. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 29, n. 6, p. 587-606, 2004.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. Sistema brasileiro de classificação de solos. 2. ed. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2006. 306 p.
- FORNASIERI FILHO, D. *Manual da cultura do trigo*. Jaboticabal: Funep, 2008. 338 p.
- FRONZA, V.; CAMPOS, L. A. C.; RIEDE, C. R. (Org.). *Informações técnicas para a safra 2008: trigo e triticale*. Londrina: Embrapa Soja, 2008. 147 p. (Documentos, 301).
- FUERTES-MENDIZÁBAL, T.; AIZPURUA, A.; GONZÁLEZ-MORO, M. B.; ESTAVILLO, J. M. Improving wheat breadmaking quality by splitting the n fertilizer rate. *European Journal of Agronomy*, Montpellier, v. 33, n. 1, p. 52-61, 2010.
- GONELI, A. L. D.; CORRÊA, P. C.; RESENDE, O.; REIS NETO, S. A. D. Estudo da difusão de umidade em grãos de trigo durante a secagem. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 27, n. 1, p. 135-140, 2007.
- HAZELTON, P. A.; MURPHY, B. W. *Interpreting soil test results: what do all the numbers mean?* Melbourne: CSIRO Publishing, 2007. 160 p.
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER – IARC. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene (summary of data reported and evaluation). Lyon: World Health Organization, 2002. v. 82, 590 p.
- ISRAEL-ROMING, F.; AVRAM, M. Deoxynivalenol stability during wheat processing. *Romanian Biotechnological Letters*, Bucharest, v. 15, n. 3, p. 47-50, 2010.

- KAWAMURA, O. Production of monoclonal antibodies against deoxynivalenol and development of a high sensitive ELISA using enzyme amplification. *Technical Bulletin of Faculty of Agriculture (Kagawa University)*, Kagawa, v. 57, p. 27-33, 2005.
- KINDRED, D. R.; VERHOEVEN, T. M. O.; WEIGHTMAN, R. M.; SWANSTON, J. S.; AGU, R. C.; BROSNAN, J. M.; SYLVESTER-BRADLEY, R. Effects of variety and fertilizer nitrogen on alcohol yield, grain yield, starch and protein content, and protein composition of winter wheat. *Journal of Cereal Science*, London, v. 48, n. 1, p. 46-57, 2008.
- LARGE, E. C. Growth stages in cereals illustration of the feekes scale. *Plant Pathology*, Chichester, v. 3, n. 4, p. 128-129, 1954.
- MA, B. L.; SUBEDI, K. D.; XUE, A. G.; VOLDENG, H. D. Crop management effects on fusarium head blight, fusarium-damaged kernels and deoxynivalenol concentration of spring wheat. *Journal of Plant Nutrition*, Philadelphia, v. 36, n. 5, p. 717-730, 2013.
- MCKEVITH, B. Nutritional aspects of cereals. *Nutrition Bulletin*, London, v. 29, n. 2, p. 111-142, 2004.
- MOSSE, J. Nitrogen-to-protein conversion factor for ten cereals and six legumes or oilseeds. A reappraisal of its definition and determination. Variation according to species and to seed protein content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v. 38, n. 1, p. 18-24, 1990.
- NORMAS ANALÍTICAS DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ – IAL. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 4 ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.
- PESTKA, J. J. Deoxynivalenol: toxicity, mechanisms and animal health risks. *Animal Feed Science and Technology*, Amsterdam, v. 137, n. 3, p. 283-298, 2007.
- PICCININ, G. G.; BRACCINI, A. L.; DAN, L. G.; SCAPIM, C. A.; RICCI, T. T.; BAZO, G. L. Efficiency of seed inoculation with *Azospirillum brasilense* on agronomic characteristics and yield of wheat. *Industrial Crops and Products*, Amsterdam, v. 43, p. 393-397, 2013.
- PRANDO, A. M.; ZUCARELI, C.; FRONZA, V.; BASSOI, M. C.; DE OLIVEIRA, F. A. Formas de ureia e doses de nitrogênio em cobertura no desempenho agrônomo de genótipos de trigo. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 33, n. 2, p. 621-632, 2012.
- RONQUIM, C. C. *Conceitos de fertilidade do solo e manejo adequado para as regiões tropicais*. Campinas: Embrapa Monitoramento por Satélite, 2010. v. 8, 26 p.
- SALANTUR, A.; OZTURK, R.; AKTEN, S. Growth and yield response of spring wheat (*Triticum aestivum* L.) to inoculation with rhizobacteria. *Plant, Soil and Environment*, Praga, v. 52, n. 6, p. 111-118, 2006.
- SANTOS, J. S.; OLIVEIRA, T. M.; MARTINS, L. M.; HASHIMOTO, E. H.; BASSOI, M. C.; PIRES, J. L. F.; MIRANDA, M. Z.; GARCIA, S.; ITANO, E. N.; ONO, E. Y. S.; KAWAMURA, O.; HIROOKA, E. Y. Monitoramento e nível de ingestão de desoxinivalenol por trigo. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 32, n. 4, p. 1439-1450, 2011a.
- SANTOS, J. S.; TAKABAYASHI, C. R.; ONO, E. Y. S.; ITANO, E. N.; MALLMANN, C. A.; KAWAMURA, O.; HIROOKA, E. Y. Immunoassay based on monoclonal antibodies versus LC-MS: deoxynivalenol in wheat and flour in Southern Brazil. *Food Additives and Contaminants*, Oxford, v. 28, n. 8, p. 1083-1090, 2011b.
- SAUBIDET, M. I.; FATTA, N.; BARNEIX, A. J. The effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* on growth and nitrogen utilization by wheat plants. *Plant and Soil*, The Hague, v. 245, n. 2, p. 215-222, 2002.
- SCHEUER, P. M.; FRANCISCO, A.; MIRANDA, M. Z.; LIMBERG, V. M. Trigo: características e utilização na panificação. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, Campina Grande, v. 13, n. 2, p. 211-222, 2011.
- SOARES, L. V. *Curso básico de instrumentação para analistas de alimentos e fármacos*. Barueri: Manole, 2006. 337 p.
- TEIXEIRA FILHO, M. C. M.; BUZZETTI, S.; ALVAREZ, R. C. F.; FREITAS, J. G.; ARF, O.; SÁ, M. E. Resposta de cultivares de trigo irrigados por aspersão ao nitrogênio em cobertura na região do Cerrado. *Acta Scientiarum Agronomy*, Maringá, v. 29, n. 3, p. 421-425, 2007.
- VILLAR, D.; CARSON, D. L. Trichothecene mycotoxins. In: PUMLEE, K. H. (Ed.). *Clinical veterinary toxicology*. Mosby: St. Louis, 2004. p. 270-275.
- WHITAKER, T. B.; HAGLER, W. M.; GIESBRECHT, F. G.; JOHANSSON, A. S. Sampling, sample preparation, and analytical variability associated with testing wheat for deoxynivalenol. *Journal of AOAC International*, Gaithersburg, v. 83, n. 5, p. 1285-1292, 2000.
- 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*, Oxford, v. 57, n. 2, p. 391-399, 2006.
- WRIGLEY, C. W. Wheat: a unique grain for the world. In: KHAN, K.; SHEWRY, P. R. (Ed.). *Wheat: chemistry and technology*. 4. ed. Saint Paul: AACC, 2009. 17 p.

