



**JOÃO LUCAS DIAS SOUZA**

**EXPRESSÃO ENZIMÁTICA E QUALIDADE DE SEMENTES  
DE MILHO TRATADAS E ARMAZENADAS**

**LAVRAS – MG  
2019**

**JOÃO LUCAS DIAS SOUZA**

**EXPRESSÃO ENZIMÁTICA E QUALIDADE DE SEMENTES DE MILHO  
TRATADAS E ARMAZENADAS**

Monografia apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Agronomia, para a obtenção do título de Bacharel.

Prof. Dr. Renzo Garcia Von Pinho  
Orientador

**LAVRAS-MG  
2019**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Souza, João Lucas Dias.

EXPRESSÃO ENZIMÁTICA E QUALIDADE DE  
SEMENTES DE MILHO TRATADAS E ARMAZENADAS / João  
Lucas Dias Souza. - 2019.

34 p. : il.

Orientador(a): Renzo Garcia Von Pinho.

TCC (graduação) - Universidade Federal de Lavras, 2019.  
Bibliografia.

1. Zea Mays. 2. Eletroforese. 3. Tratamento de sementes. I.  
Von Pinho, Renzo Garcia. II. Título.

**JOÃO LUCAS DIAS SOUZA**

**EXPRESSÃO ENZIMÁTICA E QUALIDADE DE SEMENTES DE MILHO  
TRATADAS E ARMAZENADAS**  
**ENZYMATIC EXPRESSION AND QUALITY OF TREATED AND STORED CORN  
SEEDS**

Monografia apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Agronomia, para a obtenção do título de Bacharel.

APROVADO em 21 de novembro de 2019.

Dra. Heloísa Oliveira dos Santos      UFLA

Me. Thiago Lucas de Oliveira      UFLA

Prof. Dr. Renzo Garcia Von Pinho  
Orientador

**LAVRAS-MG  
2019**

*A minha mãe Ivana por todo amor, carinho e paciência em todas as etapas e por ser o meu maior exemplo de vida.*

*Ao meu pai Nerodias pelo exemplo de amor e força nos momentos cruciais.*

*Ao meu irmão Humberto por ser meu guia nas adversidades.*

*Dedico*

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais e meu irmão, pelo amor, carinho e apoio durante essa trajetória. Apesar de todas as dificuldades, sempre fizeram de tudo para que eu atingisse meus objetivos.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Agricultura, pela oportunidade concedida de realizar meus experimentos.

Ao Laboratório de Sementes e a todos os servidores responsáveis pelo setor e pós-graduandos que ajudaram na realização deste trabalho.

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

À empresa Helix Sementes, pela doação do material para a realização do trabalho.

Ao meu orientador professor Dr. Renzo Garcia Von Pinho, pela confiança e a liberdade para gerar conhecimento. Para mim, é um grande exemplo de profissional e pessoa.

À professora Dr. Heloísa Oliveira dos Santos, pela amizade, confiança, carinho e apoio não só na realização deste trabalho, mas como em diversos momentos da minha trajetória acadêmica.

Ao Doutorando Thiago Lucas de Oliveira, por ser uma base sólida e um exemplo de pessoa durante a realização deste trabalho, onde eu pude me espelhar e concluir esta etapa da minha vida.

Aos amigos e colegas do Grupo do Milho, pelos momentos de descontração e realização das análises e coletas de dados.

Aos amigos de República ViraCopos, pela amizade, companheirismo, e por tornar toda essa jornada mais agradável. Desde os ex-moradores mais antigos, até os calouros mais recentes, obrigado por fazerem parte da minha história.

A todos os meus companheiros acadêmicos que de alguma forma fizeram parte das minhas escolhas e me ajudaram a traçar o caminho que hoje me torna uma pessoa mais feliz.

À minha companheira de jornada, Bruna, por todo amor construído e carinho gerado em momentos que se faziam impossíveis de superar o estresse e a dor.

Aos meus familiares, companheiros de jornada, amigos da minha cidade natal e todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

**MUITO OBRIGADO!**

*“Os que se encantam com a prática sem a ciência são como os timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu destino.”*

*(Leonardo Da Vinci)*

## RESUMO

O tratamento de sementes de milho é medida necessária para proteção inicial dos cultivos, protegendo todo o potencial da semente. Embora seus benefícios sejam indiscutíveis, algumas moléculas têm interferido na qualidade de sementes armazenadas, acelerando sua deterioração. Objetivou-se avaliar o efeito de tratamentos inseticidas sobre a qualidade fisiológica e a expressão enzimática de sementes de milho ao longo do armazenamento. O experimento foi conduzido na Universidade Federal de Lavras (Lavras, MG), sendo as análises fisiológicas e enzimáticas realizadas no Laboratório Central de Análise de Sementes, da mesma instituição. Sementes dos híbridos 2B647 PW e SHS4070 foram tratadas e armazenadas por nove meses. Os tratamentos químicos consistiram na combinação de uma calda padrão, adotada pela empresa de sementes, com os inseticidas clotianidina, tiametoxam e fipronil, em doses recomendadas pelos fabricantes. Para avaliar a qualidade fisiológica das sementes foram utilizados os testes de germinação e o teste do frio sem solo. A expressão da enzima catalase foi observada através da técnica de eletroforese em gel. Amostras de sementes foram coletadas aos zero e nove meses de armazenamento para realização dos testes. Houve queda na germinação de sementes do híbrido 2B647 PW aos nove meses de armazenamento para aqueles tratamentos com adição de inseticidas. Essa queda no desempenho germinativo do híbrido ao fim do armazenamento também se repetiu no teste do frio. O híbrido SHS 4070, por sua vez, não teve sua performance prejudicada pelos produtos químicos e armazenamento, de acordo com os testes de qualidade fisiológica. A expressão da enzima catalase nos dois híbridos foi maior no início do armazenamento para aqueles tratamentos com adição de inseticidas. Aos nove meses de armazenamento, houve uma redução da expressão dessa enzima. O inseticida tiametoxam prejudica a qualidade fisiológica de sementes do híbrido 2B647 PW de forma mais acentuada que os demais tratamentos ao final do período de armazenamento. Os inseticidas testados interferem na expressão da enzima catalase nos híbridos 2B647 PW e SHS 4070. Não foi possível afirmar que a catalase é uma boa marcadora de qualidade fisiológica de sementes de milho tratadas e armazenadas ao longo de nove meses, havendo uma necessidade de mais estudos relacionados ao tema.

Palavras-chave: *Zea mays*; Eletroforese; Tratamento de sementes.

## **LISTA DE FIGURAS**

- Figura 1 – Expressão da enzima catalase em sementes do híbrido 2B647PW, tratadas com diferentes produtos químicos e armazenadas por 0 e 9 meses.....27
- Figura 2 – Expressão da enzima catalase em sementes do híbrido SHS 4070, tratadas com diferentes produtos químicos e armazenadas por 0 e 9 meses.....28

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Resumo da análise de variância para os parâmetros de qualidade fisiológica mensurados em sementes dos híbridos de milho 2B647PW e SHS4070, submetidas a diferentes tratamentos químicos e períodos de armazenamento.....25
- Tabela 2 – Valores de germinação (GE) e teste de frio (TF) em sementes dos híbridos de milho 2B647PW e SHS4070, submetidas a diferentes tratamentos químicos e períodos de armazenamento.....26

## **LISTA DE QUADROS**

Quadro 1 – Detalhes sobre inseticidas utilizados no experimento.....	22
--	----

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	15
<b>2.1. Cultura do milho e sua importância</b> .....	15
<b>2.2. Tratamento de sementes</b> .....	16
<b>2.3. Armazenamento de sementes</b> .....	19
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	22
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	25
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	29
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	30

## 1. INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays L.*) representa um dos principais cereais cultivados em todo o mundo, sendo amplamente utilizado na alimentação humana e animal e como matéria-prima para indústrias. No cenário produtivo do grão, o Brasil se destaca como o terceiro maior produtor mundial e segundo maior exportador (USDA, 2019). Na safra 2018/19, a produção nacional de milho se aproximou de 100 milhões de toneladas (CONAB, 2019).

A posição de destaque do país na cadeia produtiva do milho é derivada da modernização do sistema de cultivo, caracterizada pela adoção de cultivares híbridas cada vez mais produtivas, transgenia, uso de adubos e defensivos químicos, modificação da densidade de plantas e sua distribuição no campo, além do uso de sementes de alta qualidade (GALVÃO et al., 2014b). A semente é considerada o principal veículo de transporte de tecnologia pois carrega os maiores avanços obtidos nos campos do melhoramento genético e biotecnologia. Considerando isso, é importante investir em tecnologias e processos que protejam todo esse potencial que a semente carrega. Uma prática que atua nesse sentido é o tratamento de sementes.

O tratamento químico de sementes é um processo amplamente adotado e permite a proteção das sementes contra agentes limitantes da produtividade como pragas e patógenos (BRUSTOLIN et al., 2017; FRANÇA-NETO et al., 2015). A cultura do milho é atacada por pragas durante todo seu ciclo e o tratamento das sementes com inseticidas é a opção de manejo mais recomendada para lidar com as pragas de início de ciclo. Dentre os inseticidas mais utilizados nestas situações estão os neonicotinoides, como o tiametoxam e a clotianidina. Outro inseticida eficaz contra pragas iniciais na cultura do milho é o fipronil, um fenilpirazol.

Quase que o total das sementes de milho híbrido comercializadas é tratado com fungicidas ainda na indústria. Cerca de 35% dessas sementes ainda recebem o tratamento inseticida antes de serem comercializadas, antecedendo a etapa de armazenamento (NUNES, 2016). Entretanto, sabe-se que em algumas situações, os produtos colocados sobre as sementes podem prejudicar a qualidade, acelerando sua deterioração durante o período de armazenamento (DEUNER et al. 2014; TONIN et al., 2014). Nestas situações, todo o esforço para obtenção de sementes de boa qualidade durante o processo de produção das sementes é perdido, assim como o potencial produtivo é impedido de se expressar.

Alterações bioquímicas são observadas durante o decorrer da deterioração fisiológica e podem ser estudadas através do estudo de enzimas. Estas podem servir como indicadoras do

processo deteriorativo da semente uma vez que participam em praticamente todas as reações do metabolismo e não são modificadas durante o processo (TAIZ et al., 2017). Análises enzimáticas ainda possuem a vantagem de ter um maior potencial informativo sobre o estado de qualidade da semente, e dentro deste contexto, podem ser valiosas em determinar qual evento ou rota metabólica podem estar sendo prejudicados por um produto químico.

Embora existam na literatura, trabalhos relacionando a qualidade fisiológica com a adição de produtos químicos na semente e o armazenamento, ainda há espaço para estudos quando se fala das alterações bioquímicas que podem ocorrer devido a esses fatores. Por isso, este trabalho avaliou o efeito de tratamentos inseticidas sobre a qualidade fisiológica e a expressão da enzímica catalase em sementes de milho ao longo do armazenamento. Assim, pode-se utilizar o potencial que as análises enzimáticas têm de gerar informações para poder entender a possível ação fitotóxica dos produtos sobre a redução da qualidade das sementes tratadas com os mesmos, bem como verificar o potencial de uso da catalase como marcadora do estado de qualidade das sementes nestas condições.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1. Cultura do milho e sua importância

O milho, na classificação botânica, pertence à ordem Gramineae, família Poaceae, tribu Maydeae, gênero *Zea* e espécie *Zea mays L.* Com origem no teosinto (*Zea mays ssp.*), é uma planta monoica, com inflorescência do tipo panícula (masculina) e espiga (feminina), ciclo anual, alógama (polinização cruzada), anemófila (pólen transportado pelo vento) e possui metabolismo fotossintético C4 (WERLE, et al. 2011), sendo amplamente cultivada nas Américas e tendo grande importância para o Agronegócio em relação a sua diversidade de uso, sendo explorada para alimentação humana e animal, devido às suas elevadas qualidades nutricionais, além de ser matéria prima para a indústria (MÔRO; FRITSCHÉ-NETO, 2015).

A semente de milho, quando as condições de temperatura e umidade são favoráveis, germina em cinco ou seis dias (BRASIL 2002). Esta é classificada botanicamente como cariopse, sendo formada basicamente por pericarpo, endosperma e embrião. O pericarpo é uma camada fina e resistente que reveste a parte externa da semente. O endosperma é a maior parte da semente e é revestido pelo pericarpo, sendo basicamente composto por amido e outros carboidratos, tendo grande importância no processo de germinação. Por fim o embrião, que se encontra ao lado do endosperma e possui primórdios de todos os órgãos da planta desenvolvida, ou seja, não é mais do que a própria planta em miniatura dentro da semente (FANCELLI; DOURADO NETO, 2000).

A cultura do milho é das que ocupam maior área no mundo e tem crescido cada vez mais. Isso é fruto dos avanços do melhoramento genético e adoção de alta tecnologia em diversos setores que, atreladas a novas técnicas de manejo, aperfeiçoam o sistema de produção. O milho é o grão mais produzido no mundo, com aproximadamente 1,1 bilhão de toneladas do grão (FAO, 2019). O maior produtor, a nível mundial, é o EUA com uma produção de 371 milhões de toneladas, seguido pela China com 259 milhões de toneladas e ocupando o posto de terceiro maior produtor vem o Brasil, com uma produção de 94 milhões de toneladas (USDA, 2019).

Devido a diferenças na sazonalidade climática, característica do Brasil, algumas regiões produzem apenas uma safra de milho por ano, mas ampliando a visão para um cenário geral, o milho pode ser cultivado em duas diferentes épocas do ano. A primeira safra é conhecida como safra de verão, onde compreende a semeadura entre setembro e dezembro, aproveitando as boas condições climáticas para obter altas produtividades. A segunda safra,

outrora chamada de safrinha devido a baixas produtividades e menores investimentos empregados graças às incertezas climáticas, é semeada de janeiro a março e hoje é a principal safra do Brasil, atingindo produtividades muito superiores as da primeira safra. Na safra de 2018/19, o Brasil teve a segunda safra como responsável por cerca de 2/3 do total de sua produção total do cereal, confirmando a importância da mesma para o cultivo do milho (CONAB, 2019).

A segunda safra possui condições climáticas incertas e um tanto desfavoráveis para a cultura. Graças à adoção de alta tecnologia em diversos setores e em um número maior de áreas, o sucesso da alta produtividade de milho na segunda safra tem se consolidado cada vez mais. Grande parte deste mérito está relacionado com a obtenção e uso de sementes de boa qualidade, já que a semente é o principal insumo agrícola, servindo como veículo de tecnologia gerada e permitindo um adequado estabelecimento dos cultivos e propiciando uma renda elevada ao produtor.

## **2.2. Tratamento de sementes**

Na cultura do milho são comuns os tratamentos químicos como medida fitossanitária. O tratamento de semente, por ser aplicado diretamente na semente e em pouca quantidade, se faz econômico, de fácil aplicação, menos prejudicial ao ambiente e mais seguro ao homem, quando comparado com o uso tradicional de aplicação de produtos na forma de pulverização foliar. Além disso, o tratamento químico de sementes é considerado uma das medidas mais eficientes no controle de pragas e patógenos que afetam a emergência de plântulas e o seu desenvolvimento inicial (ALBUQUERQUE et al., 2006), o que aumentará a garantia de um bom estado de plantas na área cultivada.

De forma geral, o tratamento de sementes é a aplicação de diferentes processos e substâncias que preservem o desempenho das sementes, permitindo a expressão máxima do potencial genético das culturas. Em sentido restrito, o tratamento de sementes refere-se à aplicação de produtos químicos eficientes no controle de patógenos e pragas (MENTEN; MORAES, 2010).

Dentre os diferentes produtos para tratamento de sementes estão os fungicidas e os inseticidas. Hoje, no Brasil, cerca de sessenta e cinco produtos comerciais estão registrados para uso em tratamento de sementes de milho (BRASIL, 2019). Os inseticidas, como já citado anteriormente, são de extrema importância para o controle das pragas que afetam o desenvolvimento inicial e a emergência das plântulas. Dentre os inseticidas mais utilizados

para o tratamento de sementes estão os neonicotinoides, como o tiametoxam e a clotianidina, e os fenilpirazóis, como o fipronil.

Os neonicotinoides são um grupo de inseticidas que atuam sobre o sistema nervoso do inseto como agonistas da acetilcolina, possuem ação sistêmica e bom efeito residual (TOMLIN, 2009). Tiametoxam e clotianidina são neonicotinoides registrados para uso na cultura do milho, recomendados para controle de pragas iniciais como coró (*Liogenys fuscus*), cigarrinha do milho (*Dalbulus maidis*), cigarrinha das pastagens (*Deois flavopicta*), lagarta-elasma (*Elasmopalpus lignosellus*) e percevejo-barriga-verde (*Dichelops spp.*) (BRASIL, 2019).

O sistema de produção agrícola tem sofrido mudanças ao longo do tempo. Assim pode se observar o crescimento populacional de pragas antes chamadas de secundárias, exemplos são os percevejos barriga-verde (*Dichelops spp.*) e o marrom (*Euschistus heros*) (QUINTELA et al., 2006). Com o crescimento da relevância destas pragas, alguns neonicotinoides como o tiametoxam e clotianidina, passaram a serem mais utilizados (ÁVILA; DUARTE, 2012). A boa eficiência de controle de populações de percevejos pode ser relacionada com o tratamento de sementes com estes produtos, também associado à aplicação em pós-emergência (BRUSTOLIN et al., 2012).

O fipronil é um inseticida neurotóxico, que assim como os neonicotinoides, é indicado para o milho. Ele funciona como antagonistas do GABA (ácido gama-aminobutírico) ao atingirem os insetos. Este vem sendo utilizado em manejos alternativos para a resistência de insetos à organofosforados, piretróides e carbamatos. Tem efeito sistêmico, é facilmente absorvido pela planta, tem boa ação sobre os insetos e boa lipofilicidade (GUNASEKARA et al., 2007), sendo bem recomendado para o controlar o coró (*Phyllophaga cuyabana*) e lagarta-elasma (*Elasmopalpus lignosellus*) na cultura do milho (BRASIL, 2019).

O tratamento de sementes de milho com produtos químicos, como moléculas fungicidas e inseticidas, já é amplamente adotado, sendo feito de forma industrial em sua maioria, antes das sementes passarem para o armazenamento. No entanto, alguns ingredientes ativos têm interferido na qualidade das sementes, podendo levar ao aumento de sua deterioração (DEUNER et al. 2014; TONIN et al., 2014). Assim, a redução da qualidade das sementes pode acarretar perda de produtividade e por consequência um menor lucro com a atividade.

Embora recomendado para o tratamento de sementes, o inseticida fipronil pode causar fitotoxidez no milho e acarretar aumentos percentuais de plântulas anormais e mortas, raízes menores, menor tamanho da parte aérea de plântulas e uma quantidade de massa seca também

reduzida (ESPÍNDOLA et al., 2018; SILVEIRA et al., 2001). O tratamento com o fipronil também trouxe efeitos negativos para plantas de soja, como a redução no tamanho das raízes (DAN et al., 2010). Misturas de produtos são comuns, porém, no caso de neonicotinoides em soja, ao serem misturados com outros ingredientes ativos, prejudicou tanto a germinação quanto o desenvolvimento da fase inicial da cultura (CUNHA et al., 2015).

O mau desempenho da cultura relacionado ao tratamento com inseticidas provém de um estresse oxidativo, graças a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) (SHAKIR et al., 2018; BASHIR et al., 2007). Uma pequena quantidade do oxigênio consumido (2 a 5%) é reduzido, produzindo uma variedade de substâncias químicas altamente reativas, sendo estas denominadas EROs (DAMASCENO et al., 2002; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). As ERO podem provocar injúria tecidual e, em altas concentrações, danificar organelas celulares, ácidos nucleicos, lipídeos e proteínas (VALKO et al., 2007), causando um incremento ao processo deteriorativo das sementes (MCDONALD, 1999). A elevada produção de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e os sinais da peroxidação de membranas podem ser observados em tecidos de plantas expostos aos inseticidas em variadas concentrações (AKSAKAL, 2018; SHAKIR et al., 2018).

Nem sempre as sementes são produzidas e logo em seguida utilizadas, necessitando do armazenamento das mesmas. Neste caso, deve-se ter uma maior atenção ao armazenamento das sementes tratadas por períodos de tempo extenso. Assim as condições de armazenamento das sementes podem alterar o comportamento do produto utilizado para o tratamento sobre as sementes (DEUNER et al., 2014; MAGALHÃES, 2013).

A qualidade das sementes pode ser aferida de diferentes formas. Testes comuns de germinação e vigor podem ser utilizados para entender a expressão e a atividade de enzimas (CARVALHO et al. 2014). Levando em consideração o potencial informativo, as análises enzimáticas oferecem uma maior segurança quanto ao estado de qualidade da semente, sendo assim, a possibilidade de se elucidar diferentes rotas metabólicas e processos enzimáticos, pode ajudar a correlacionar os níveis de fitotoxidez com a perda de qualidade das sementes (GALVÃO et al. 2014).

Diferentes enzimas podem ser avaliadas e relacionadas à qualidade da semente, incluindo a catalase. As enzimas peroxidase e catalase são importantes removedoras de radicais livres, atuam na desintoxicação celular e auxiliam na redução de danos oxidativos (LEHNINGER, 2006). A catalase (EC 1.11.1.6) é uma metaloproteína que catalisa a decomposição do  $H_2O_2$ , formado nas células, em  $H_2O$  e  $O_2$  ( $2H_2O_2$ –catalase–  $2H_2O + O_2$ ), ou seja, é uma enzima que atua sobre as EROs, catalisando a redução de  $H_2O_2$  em água e  $O_2$ ,

sendo assim, atividade da catalase é indispensável para a desintoxicação das EROs em condições de estresse severo (BARBOSA et al., 2014; DUBEY, 2010). Em casos onde há estresse de tecidos vegetais expostos a produtos, como inseticidas, pode ser observado um aumento na atividade desta enzima, em uma tentativa de proteção contra a formação de radicais livres (YILDIZTEKIN et al., 2019). Autores observaram uma redução na atividade da enzima em sementes tratadas com deltametrina, um inseticida piretroide, onde as causas mais prováveis são inibição da síntese da enzima e danos estruturais causados pela ação dos radicais livres (BASHIR et al., 2007).

O tratamento químico como uma medida de segurança da qualidade da semente é algo constatado pela ciência. Existe uma grande gama de produtos químicos registrados para o tratamento de sementes de milho, por isso, estudos que promovem o entendimento da ação destes produtos sobre a qualidade das sementes se mostram mais do que necessários. Assim, a validação de técnicas que permitam estes estudos, como testes com isoenzimas, são de grande interesse e têm sido apresentados como promissores, ajudando a entender as causas da perda de qualidade das sementes tratadas.

### **2.3. Armazenamento de sementes**

O armazenamento tem como função principal preservar as qualidades iniciais de um determinado produto, evitando sua deterioração. Em outras palavras, manter a qualidade das sementes enquanto as mesmas estiverem sob armazenamento. Condições adequadas de armazenamento não melhoram a qualidade da semente, mas é uma técnica que propicia retardar a perda de qualidade, pela inibição do desenvolvimento de microrganismos prejudiciais e retardando a deterioração fisiológica (BEWLEY et al., 2006).

O armazenamento é uma etapa tão importante quanto todo o resto da cadeia produtiva, pois as sementes não se restringem apenas a um insumo, mas sim um pacote tecnológico de alto valor agregado. Acredita-se que as condições ideais para a conservação de sementes de milho são aquelas que combinam temperaturas abaixo de 20°C e teor de água das sementes em torno de 12% (MAEDA et al., 1987). Como a tecnologia vem sendo aprimorada cada dia mais, os estudos quanto a condições de armazenamento de sementes devem sempre continuar.

A deterioração das sementes inicia-se a partir da maturidade fisiológica e culmina com a perda da capacidade germinativa, graças a diversas alterações naturais físicas, bioquímicas e fisiológicas, culminando em um envelhecimento e eventualmente na morte da semente (MARCOS FILHO, 2015), fato que é agravado quando as condições de armazenamento são

duvidosas. Atualmente, a identificação precoce de processos degenerativos em sementes é um dos principais objetivos da tecnologia de sementes, pois vários fatores podem acelerar a deterioração como a umidade, temperatura, tipo de embalagem e o tempo de armazenamento. Testes tradicionais para determinação da germinação e vigor têm buscado encontrar novas características que possibilitem a detecção da deterioração em seus primórdios.

Conforme o período de armazenamento aumenta é esperada uma redução em qualidade fisiológica da semente, observados através da germinação e teste de vigor. As condições não controladas em sementes de milho causam maior deterioração do que em condições de refrigeração (HEBERLE et al., 2019). Temperaturas menores ocasionam uma melhor manutenção das qualidades iniciais da semente graças a uma redução da velocidade metabólica e diminuindo o gasto das reservas, permitindo que as sementes sejam preservadas por mais tempo (AGUIAR et al., 2012).

O teor de água das sementes está diretamente relacionado com as condições ambientais em que são armazenadas, como a temperatura e umidade relativa do ar. Considerando a água como um fator de extrema importância, um teor elevado de água, combinado a elevadas temperaturas, além de favorecer processos respiratórios das sementes, também estimula atividade de microrganismos e de insetos-praga (VILLELA; MENEZES, 2009).

Mesmo havendo riscos a integridade das sementes faz-se aplicação de produtos antes do armazenamento, pois os produtos fitossanitários podem preservar a integridade da semente contra fungos e insetos ao longo do tempo de armazenamento. Sementes de milho tratadas e armazenadas por longos períodos podem levar o tiametoxam e imidacloprido + tiodi-carbe a causarem perda de parâmetros fisiológicos, como a redução no vigor (TONIN et al., 2014; LORENZETTI et al., 2014; MAGALHÃES, 2013). A redução da germinação também pode ser observada, apresentando variação em função do produto e do tempo em que as sementes permaneceram armazenadas (DEUNER et al., 2014).

Conforma a semente vai perdendo qualidade fisiológica, devido ao processo de deterioração, alterações bioquímicas também podem ser observadas. Logo, processos bioquímicos de deterioração podem ser observados mesmo antes do início da perda de qualidade fisiológica, mostrando que a avaliação da atividade enzimática relacionada a biossíntese de tecidos novos são avaliações mais sensíveis para se detectar o início do processo de deterioração (COPELAND; MCDONALD, 2001), já que as enzimas perdem eficiência catalítica durante a deterioração.

O tempo de exposição das sementes e as condições ambientais do armazenamento, se não forem adequados, podem acentuar a deterioração, levando a uma redução das atividades de enzimas relacionadas à respiração celular, causando problemas em seu funcionamento (CAIXETA et al., 2014). Assim, a correlação das enzimas com o processo de deterioração pode nos mostrar o parecer inverso, quando há uma maior atividade enzimática espera-se uma menor taxa de deterioração da semente, por consequência, uma conservação de sua qualidade fisiológica.

O oxigênio é essencial para a oxidação de compostos orgânicos e produção de energia para o metabolismo celular (COMHAIR; ERZURUM, 2002), mas a presença do oxigênio reduzido forma os conhecidos EROs. Para combater estes EROs existem agentes antioxidantes enzimáticos, como a superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT), já descrita no tópico anterior. Com o prolongamento da exposição de sementes a condições não ideais de armazenamento, pode-se ter redução na atividade destas enzimas antioxidantes, tornando as sementes mais suscetíveis a deterioração pelas espécies reativas de oxigênio, perdendo sua viabilidade (CARVALHO et al., 2014). Assim, faz-se importante a junção de bons fatores de armazenamento para a boa manutenção da qualidade da semente.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi conduzido nas dependências do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (Lavras, MG), sendo as análises fisiológicas e enzimáticas realizadas no Laboratório Central de Análise de Sementes, da mesma instituição. A empresa Helix Sementes cedeu para uso como material experimental, sementes do híbrido simples de milho 2B647PW e híbrido duplo SHS4070, classificadas em peneira CH20/64.

Os tratamentos consistiram em uma calda padrão adotada pela Helix Sementes associada a diferentes inseticidas recomendados para o tratamento de sementes de milho. A calda padrão é composta por 81% de água, 17% de Carbendazim + Thiram, 1% de Pirimifós-metílico e 1% de Deltametrina. Estes produtos foram incorporados a semente de forma manual, utilizando sacos plásticos.

Quadro 1 – Detalhes sobre inseticidas utilizados no experimento.

<b>Ingrediente ativo (i.a.)</b>	<b>Grupo químico</b>	<b>Dose recomendada do i.a.</b>	<b>% do i.a. no produto comercial</b>
Clotianidina	Neonicotinoide	210 g i.a./100 kg de semente	60%
Tiametoxam	Neonicotinoide	210 g i.a./100 kg de semente	35%
Fipronil	Fenilpirazol	62,5 g i.a./100 kg de semente	25%

Fonte: Do autor (2019).

Os inseticidas utilizados em associação à calda padrão para composição dos tratamentos experimentais foram a Clotianidina (Poncho<sup>®</sup>), Tiametoxam (Cruiser<sup>®</sup> 350 FS) e Fipronil (Shelter<sup>®</sup>). Deste modo, foram quatro os tratamentos avaliados: Calda Padrão (CPa), Calda Padrão + Clotianidina (CPo), Calda Padrão + Tiametoxam (CCr) e Calda Padrão + Fipronil (CSh). Detalhes dos inseticidas utilizados são exibidos no Quadro 1. As doses utilizadas dos inseticidas estão dentro daquelas recomendadas pelos seus fabricantes.

Após o tratamento, as sementes foram acondicionadas em sacos de papel multifoliado semipermeáveis, colocados sobre estrado de madeira em um armazém convencional, sem controle de condições ambientais. O armazém em questão é um galpão coberto com telhas de aço galvanizado localizado no Setor de Grandes Culturas da Universidade Federal de Lavras.

Parte das sementes tratadas permaneceu armazenada por nove meses. A outra parte não passou pelo armazenamento, sendo logo utilizada para os testes de qualidade fisiológica.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado e disposto em esquema fatorial 2x2x4, considerando dois híbridos, dois períodos de armazenamento (zero e nove meses) e quatro tratamentos químicos. Aos zero e nove meses de armazenamento, amostras de sementes referentes a cada época de avaliação foram coletadas para realização das análises de qualidade fisiológica e análises enzimáticas. Para as análises enzimáticas, que foram realizadas em conjunto, para todos os tratamentos, ao final do experimento, as sementes foram armazenadas em *Deep Freezer* a  $-86^{\circ}\text{C}$ , até a realização das determinações.

Os testes utilizados para avaliar a qualidade fisiológica das sementes foram o teste de germinação e o teste do frio sem solo.

O teste de germinação foi realizado utilizando papel germitest umedecido com água em proporção de 2,5 vezes a sua massa. Foram realizadas quatro repetições de 50 sementes, em germinador regulado em temperatura de  $25^{\circ}\text{C}$ . A contagem da germinação foi realizada após 7 dias. As plântulas foram classificadas em normais, anormais e sementes mortas e o resultado foi expresso em porcentagem de plântulas normais (BRASIL, 2009).

Para o teste do frio sem solo foi utilizado o papel germitest umedecido com água, assim como foi feito para o teste de germinação. Também foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes. Os rolos foram colocados em sacos plásticos e mantidos em câmara fria regulada a  $10^{\circ}\text{C}$ , durante sete dias. Após este período, os rolos foram retirados dos sacos plásticos e levados para germinador regulado à  $25^{\circ}\text{C}$ , durante quatro dias (CÍCERO; VIEIRA, 1994). Em seguida foi feita a avaliação das plântulas considerando-se somente plântulas normais.

A análise da expressão da enzima catalase também foi realizada, utilizando-se da técnica de eletroforese. Amostras de 100 gramas de cada tratamento foram trituradas com o uso de PVP e nitrogênio líquido e, posteriormente, armazenadas à temperatura de  $-86^{\circ}\text{C}$ . Para a extração da enzima foi utilizado o tampão Tris-HCl 0,2M 8 pH 8,0 + 0,1%  $\beta$ -Mercaptoetanol, na proporção de 250 $\mu\text{L}$  para 100mg de sementes. O material foi homogeneizado em vortex e mantido por 12 horas em geladeira, seguido de centrifugação a 14.000 rpm por 60 minutos em temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$ . Os géis foram preparados de acordo com metodologia propostas por Alfenas (2006). A corrida eletroforética foi feita em géis de poli(acrilamida) a 7,5% (gel separador) e 4,5% (gel concentrador). Foram aplicados 50  $\mu\text{L}$  do sobrenadante das amostras no gel e efetuou-se a corrida em voltagem de 150V por 6 horas.

Os dados obtidos pelos testes de qualidade fisiológica passaram por análise de variância e suas médias comparadas a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. A estatística foi realizada por meio do software Sisvar (FERREIRA, 2011). Os dados de expressão enzimática foram interpretados com base na análise qualitativa dos géis, levando em consideração a presença/ausência e intensidade das bandas eletroforéticas. Como auxílio para interpretação dos géis utilizou-se o software ImageJ® (SCHNEIDER et al., 2012).

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve interação significativa entre os fatores Híbridos, Armazenamento, Híbrido x Armazenamento, Armazenamento x Tratamento e Híbrido x Armazenamento x Tratamento para as variáveis germinação (GE) e teste do frio (TF), sendo que o fator Tratamento químico e Híbrido x Tratamento só apontou significância para o teste a frio (TF) (Tabela 1). Essa interação também é observada em outros trabalhos na literatura. Alterações na qualidade fisiológica de sementes de milho dependem do híbrido avaliado, período ou condições de armazenamento e produto aplicado (TONIN et al., 2014).

Tabela 1 – Resumo da análise de variância para os parâmetros de qualidade fisiológica mensurados em sementes dos híbridos de milho 2B647PW e SHS4070, submetidas a diferentes tratamentos químicos e períodos de armazenamento.

Fontes de variação	GL	QM	
		GE	TF
Híbrido	1	317,998 **	1736,076 **
Período de armazenamento	1	354,663 **	821,753 **
Tratamento	3	9,064 <sup>NS</sup>	236,705 **
Híbrido x Armazen.	1	220,003 **	738,005 **
Híbrido x Tratamento	3	7,288 <sup>NS</sup>	95,451 **
Armazen. x Tratamento	3	19,509 **	100,007 **
Híbrido x Armazen. x Trat.	3	21,286 **	133,146 **
Resíduo	48	6,694 **	13,472 **
Total	63		
Média		96	92
CV %		2,69	3,99

<sup>NS</sup> não significativo; \*\* significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

Fonte: do autor (2019).

Há redução da germinação de sementes do híbrido 2B647 PW aos nove meses de armazenamento para aqueles tratamentos com adição de inseticidas (Tabela 2). Para esse híbrido, os inseticidas Tiametoxan e Clotianidina levaram a um desempenho germinativo menor do que Fipronil e tratamento padrão. A germinação após o teste do frio também foi menor para aquelas sementes armazenadas por nove meses. Nesta situação, o tratamento com Tiametoxan levou ao pior desempenho dos tratamentos químicos avaliados.

O híbrido SHS 4070 não foi sensível aos efeitos dos produtos químicos e armazenamento. Não foram observadas diferenças significativas entre as médias encontradas (Tabela 2).

Tabela 2 – Valores de germinação (GE) e teste de frio (TF) em sementes dos híbridos de milho 2B647PW e SHS4070, submetidas a diferentes tratamentos químicos e períodos de armazenamento.

Híbrido	Tratamento	GE		TF	
		Período de armazenamento (meses)			
		0	9	0	9
2B647PW	CPa <sup>1</sup>	97 Aa	94 Aa	93 Aa	82 Bb
	CPo	99 Aa	86 Bb	95 Aa	95 Aa
	CCr	99 Aa	89 Bb	93 Aa	68 Cb
	CSh	98 Aa	91 ABb	95 Aa	76 Bb
SHS 4070	CPa	100 Aa	98 Aa	97 Aa	96 Aa
	CPo	99 Aa	98 Aa	100 Aa	99 Aa
	CCr	100 Aa	98 Aa	95 Aa	96 Aa
	CSh	97 Aa	98 Aa	99 Aa	99 Aa

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha, para cada híbrido, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

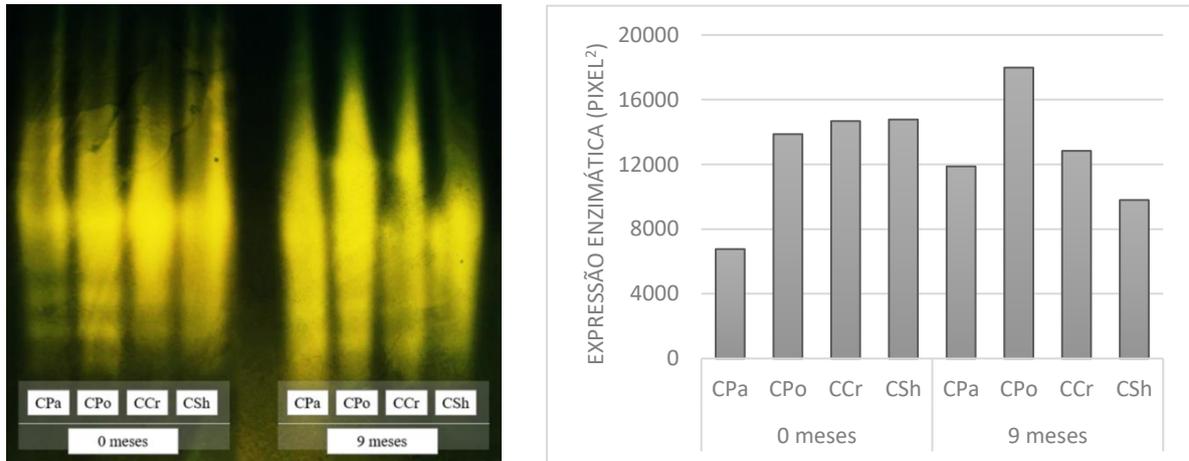
<sup>1</sup>CPa =calda padrão; CPo =calda padrão + Poncho®; CCr =calda padrão + Cruiser®; CSh =calda padrão + Shelter®.

Fonte: do autor (2019).

O Teste de Tukey apresenta características mais conservadoras, sendo mais rigoroso e aumentando a dificuldade de se detectar diferença entre os tratamentos. Desta forma, há um maior controle do erro Tipo I, que está relacionado à rejeição da nossa hipótese ( $H_0$ ) como sendo verdadeira.

A expressão da enzima catalase nos dois híbridos avaliados foi maior no início do armazenamento para aqueles tratamentos com adição de inseticidas (Figuras 1 e 2), sugerindo um estresse oxidativo gerado pelo contato destes com as sementes.

Figura 1 – Expressão da enzima catalase em sementes do híbrido 2B647PW, tratadas com diferentes produtos químicos e armazenadas por 0 e 9 meses.



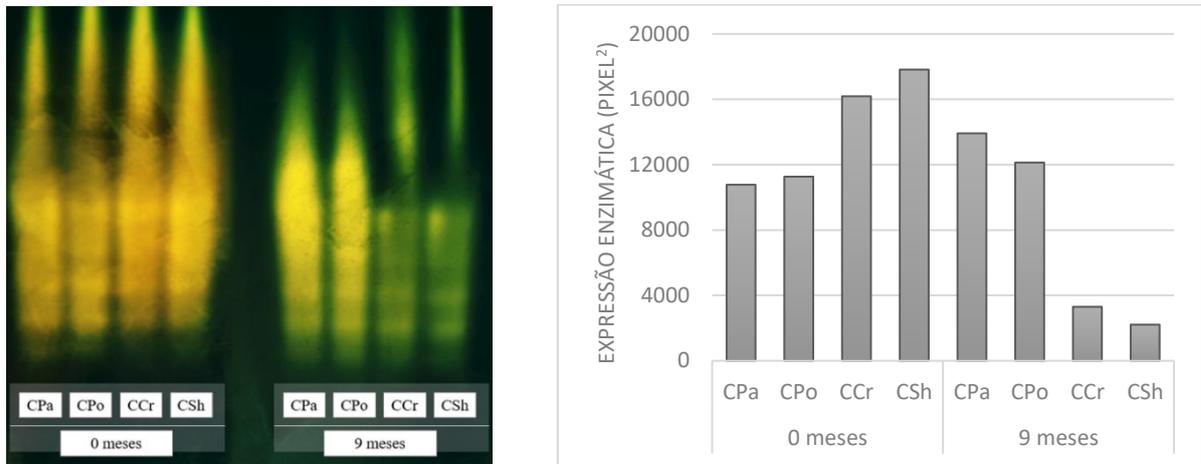
CPa = calda padrão; CPo = calda padrão + Poncho®; CCr = calda padrão + Cruiser®; CSh = calda padrão + Shelter®.

Fonte: do autor (2019).

Aos nove meses de armazenamento, há uma redução da expressão dessa enzima, o que sugere um estado avançado de deterioração das sementes. Segundo McDonald (1999), algumas das alterações ocorridas e relacionadas com a deterioração são a produção de radicais livres ou espécies reativas do oxigênio (EROs) que promovem dano na estrutura das enzimas, consequente perda de suas funções e redução da síntese de novas proteínas.

Os padrões eletroforéticos obtidos reforçam os resultados encontrados nos testes de qualidade fisiológica para o híbrido 2B647PW, indicando que a redução na expressão das enzimas está ligada a deterioração das sementes, identificada por meio da redução da germinação e vigor das sementes do híbrido ao final do armazenamento. A catalase atua na desintoxicação celular e a redução de sua expressão, ao longo do armazenamento, demonstra que houve redução da capacidade de prevenção de danos oxidativos. Heberle et al. (2019) também observaram alterações enzimáticas trabalhando com armazenamento de sementes de milho. Estes autores notaram que a atividade enzimática da peroxidase, catalase e  $\alpha$ -amilase decrescem com o aumento da deterioração fisiológica.

Figura 2 – Expressão da enzima catalase em sementes do híbrido SHS 4070, tratadas com diferentes produtos químicos e armazenadas por 0 e 9 meses.



CPa = calda padrão; CPo = calda padrão + Poncho®; CCr = calda padrão + Cruiser®; CSh = calda padrão + Shelter®.

Fonte: do autor (2019).

Para o híbrido SHS4070, a redução na expressão da enzima catalase aos nove meses de armazenamento contraria os resultados encontrados para germinação (GE) e teste do frio (TF), onde o híbrido, ao fim do armazenamento, manteve comportamento semelhante aquele constatado no início do armazenamento. Este fato é explicado pela sequência dos eventos deteriorativos que ocorrem em uma semente, onde mudanças bioquímicas podem ser observadas antes mesmo de contabilizar decréscimos em parâmetros como germinação e vigor (MARCOS-FILHO, 2015).

Spinola et al. (2000) concluíram que alterações eletroforéticas em algumas das isoenzimas estudadas por eles, foram mais efetivas em indicar o estado deteriorativo das sementes do que os testes de qualidade fisiológica comuns. Essa maior sensibilidade à deterioração credencia as enzimas como bons marcadores moleculares para monitorar e caracterizar a qualidade de sementes.

## 5. CONCLUSÕES

Diferenças na qualidade das sementes dependem de diversas variáveis como o tipo de produto, híbridos e período de armazenamento.

O inseticida Tiametoxam apresentou o pior desempenho comparado aos demais tratamentos. Porém, todos os tratamentos, de alguma forma, alteraram a qualidade fisiológica das sementes do híbrido 2B647PW ao final do armazenamento.

Os inseticidas avaliados levam ao aumento da expressão da enzima catalase para os híbridos 2B647 PW e SHS 4070, sugerindo estresse oxidativo.

Não foi possível afirmar que a enzima catalase é uma boa marcadora da qualidade de sementes de milho tratadas e armazenadas, devido ao conflito de resultados entre a perda de qualidade fisiológica e a expressão da enzima catalase nos dois híbridos testados, havendo uma necessidade de mais estudos relacionados ao tema.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, R.W.S.; BRITO, D.R.; OOTANI, M.A.; FIDELIS, R.R; PELUZIO, J.N. Efeito do dióxido do carbono, temperatura e armazenamento sobre sementes de soja e micoflora associada. **Revista Ciência Agronômica**, [s.l.], v. 43, n. 3, 2012.

AKSAKAL, O. Effects of  $\alpha$ -cypermethrin pesticide on dna stability and oxidative enzymes in maize (*Zea mays*). **Environmental Engineering & Management Journal** (EEMJ), [s.l.], v. 17, n. 2, 2018.

ALBUQUERQUE, F.A.; BORGES, L.M.; IACONO, T.D.O.; CRUBELATI, N.C.D.S.; SINGER, A.D.C. Eficiência de inseticidas aplicados em tratamento de sementes e em pulverização, no controle de pragas iniciais do milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, [s.l.], v. 5, n. 1, 2006.

ALFENAS, A.C. **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microrganismos**. 2. ed. UFV, p. 627, 2006.

ÁVILA, C.B.; DUARTE, M. Eficiência de inseticidas, aplicados nas sementes e em pulverização, no controle do percevejo barriga-verde *Dichelops melacanthus* (Dallas) (Hemiptera: Pentatomidae), na cultura do milho. **BioAssay**, [s.l.], v. 7, 2012.

BARBOSA, M.R.; SILVA, M.M.A.; WILLADINO, L.; ULISSES, C.; CAMARA, T.R. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, [s.l.], v. 44, n. 3, 2014.

BASHIR, F.; SIDDIQI, T.O.; IQBAL, M. The antioxidative response system in *Glycine max* (L.) Merr. exposed to Deltamethrin, a synthetic pyrethroid insecticide. **Environmental pollution**, [s.l.], v. 147, n. 1, p. 94-100, 2007.

BEWLEY, J.D; BLACK, M.; HALMER, P. (Ed.). **The encyclopedia of seeds: science, technology and uses**. CABI, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Agrofit**. 2019. Disponível em: <[http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em: 15 de setembro. 2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Comunicado Técnico**. 2002. Disponível em: < <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/487000/1/Com39.pdf>>. Acesso em: 08 de novembro. 2019.

BRUSTOLIN, C.; BIANCO, R.; NEVES, P.M.O.J. Inseticidas em pré e pós-emergência do milho (*Zea mays* L.), associados ao tratamento de sementes, sobre *Dichelops melacanthus* (Dallas) (Hemiptera: Pentatomidae). **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, [s.l.], v. 10, n. 3, p. 215-223, 2012.

BRUSTOLIN, C.; NEVES, P.M.O.J.; BIANCO, R.; BORTOLOTTO O.C. (2017). Tratamento de sementes de milho para controlar *Dichelops melacanthus* em diferentes tipos de solo. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 16, n. 1, p. 13-21, 2017.

CAIXETA, D.F.; FAGAN, E.B.; DE LIMA, C.P.; MARTINS, K.V.; ALVES, V.A.B.; SILVA, R.B.; GONÇALVES, L.A. Crescimento da plântula de milho à aplicação de inseticidas na semente sob diferentes disponibilidades hídricas. **Revista da FZVA**, [s.l.], v. 17, n. 1, 2010.

CARVALHO, E. R.; MAVAIEIE, D. P. R; OLIVEIRA, J. A.; DE CARVALHO, M. V.; VIEIRA, A. R. Alterações isoenzimáticas em sementes de cultivares de soja em diferentes condições de armazenamento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 49, n. 12, p. 967-976, 2014.

CÍCERO, S. M.; VIEIRA, R. D. Teste de frio. In: VIEIRA, R. D.; CARVALHO, N. M. **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP, p. 151-164, 1994.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. **Levantamento da safra de grãos**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253>>. Acesso em: 20 de setembro de 2019.

COMHAIR, S.A.A.; ERZURUM, S.C. **Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases**. American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology, v.283, p.L246-L255, 2002. Disponível em: . Acesso em: 03 de outubro de 2019.

COPELAND, L.O.; MCDONALD, M.B. **Principles of seed science and technology**. 4 ed. New York: Chapman & Hall, p. 467, 2001.

CUNHA, R.P.; CORRÊA, M.F.; SCHUCH, L.O.B.; DE OLIVEIRA, R.C.; JUNIOR, J.D.S. A.; DA SILVA, J.D.G.; DE ALMEIDA, T.L. Diferentes tratamentos de sementes sobre o desenvolvimento de plantas de soja. **Ciência Rural**, [s.l.], v. 45, n. 10, p. 1761-1767, 2015.

DAMASCENO, D.C. et al. Radicais livres, estresse oxidativo e diabetes. **Diabetes Clínica**, v.5, n.5, p.355-361, 2002.

DAN, L.G.M.; DAN, H.A.; BARROSO, A.L.L.; BRACCINI, A.L. Qualidade fisiológica de sementes de soja tratadas com inseticidas sob efeito do armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, [s.l.], v. 32, n. 2, p. 131-139, 2010.

DEUNER, C.; ROSA, K. C.; MENEGHELLO, G. E.; BORGES, C. T.; ALMEIDA, A. D. S.; BOHN, A. Physiological performance during storage of corn seed treated with insecticides and fungicide. **Journal of Seed Science**, v. 36, n. 2, p. 204-212, 2014.

DUBEY, R.S. Metal toxicity, oxidative stress and antioxidative defense system in plants. **Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Higher Plants**, p. 177-203, set. 2010.

ESPÍNDOLA, F.; LIMA, P.R.; BORSOI, A.; ECCO, M.; RAMPIM, L. Qualidade fisiológica de sementes de milho tratadas com diferentes inseticidas. **Revista Engenharia na Agricultura**, [s.l.], v. 26, n. 4, p. 306-312, 2018.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Faostat – Crops**. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#home>>. Acesso em: 20 de março de 2019.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistic analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v.35, p.1039-1042, 2011.

FRANÇA-NETO, J. B., HENNING, A. A.; KRZYZANOWSKI, F. C.; HENNING, F. A.; LORINI, I. Adoção do tratamento industrial de sementes de soja no Brasil, safra 2014/15. **Informativo ABRATES**, Londrina, v. 25, n. 1, p. 26-29, abr. 2015.

GALVÃO, J. C. C.; CONCEIÇÃO, P. M.; ARAÚJO, E. F.; KARSTEN, J.; FINGER, F. L. Alterações fisiológicas e enzimáticas em sementes de milho submetidas a diferentes épocas de colheita e métodos de debulha. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, v. 13, n. 1, p. 14-23, 2014a.

GALVÃO, J. C. C., MIRANDA, G. V., TROGELLO, E., & FRITSCHÉ-NETO, R. Sete décadas de evolução do sistema produtivo da cultura do milho. **Ceres**, v. 61, n. 7, 2014b.

GUNASEKARA, A.S.; TRUONG, T.; GOH, K.S.; SPURLOCK, F.; TJEERDEMA, R.S. Environmental fate and toxicology of fipronil. **Journal of Pesticide Science**, [s.l.], v. 32, n. 3, p. 189-199, 2007.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Lipid peroxidation: a radical chain reaction. **Free radical in biology and medicine**. New York: Oxford University. p.189- 276, 1999.

HEBERLE, E., ARAUJO, E. F., ADÍLIO, F. D. L., CECON, P. R., ARAUJO, R. F., AMARO, H. T. Qualidade fisiológica e atividade enzimática de sementes de milho durante o armazenamento. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 42, n. 3, p. 657-665, 2019.

LEHNINGER, A.L. Princípios de Bioquímica. São Paulo: **Editora Sarvier**, 4ed., 1202 p, 2006.

LORENZETTI, E.R.; RUTZEN, E.R.; NUNES, J.; CREPALLI, M.S.; LIMA, P.H.P.; MALFATO, R.A.; OLIVEIRA, W.C. Influência de inseticidas sobre a germinação e vigor de sementes de milho após armazenamento. **Cultivando o Saber**. [s.l.], v. 7, n. 1, p. 14-23, 2014.

MAEDA, J.A; LAGO, A.A.; MIRANDA, L.T. DE. & TELLA, R. Armazenamento de sementes de cultivares de milho e sorgo com resistências ambientais diferentes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, vol. 22, n. 1, p. 1-7, 1987.

MAGALHÃES, M.F. **Desempenho de sementes de milho tratadas com fungicidas, inseticida e nematicida durante o armazenamento**. 2013. 43 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2013.

MARCOS-FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. 2. ed. Londrina: ABRATES. p. 660, 2015.

MCDONALD, M.D. Seed deterioration, physiology, repair and assessment. **Seed Science and Technology**, [s.l.], v.22, n.3, p.531-539, 1999.

MENTEN, J.O.; MORAES, M.H.D. Tratamento de sementes: histórico, tipos, características e benefício. **Informativo ABRATES**, [s.l.], v. 20, n. 3, 2010.

MÔRO, G.V.; FRITSCHÉ-NETO, R. **Importância e usos do milho no Brasil**. Milho: do plantio à colheita. (Eds.). GALVÃO, J.C.C.; BORÉM, A.; PIMENTEL, M.A.G. Viçosa, MG: UFV, 2015. p.207-223.

NUNES, J.C.S. Tratamento de sementes de soja como um processo industrial no Brasil. *Seeds News*. v. 20. 2016.

QUINTELA, D.E.; FRANCISCO, A.J.; FERREIRA, B.S.; OLIVEIRA, C.F.L.; LEMES, O. C.A. **Efeito do tratamento de sementes com inseticidas químicos sobre danos de percevejos fitófagos e sobre a lagarta do cartucho no milho**. Circular técnica, 2006. 6 p.

SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to Image J: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7): 671-675, 2012.

SHAKIR, S.K.; IRFAN, S.; AKHTAR, B.; UR REHMAN, S.; DAUD, M.K.; TAIMUR, N.; AZIZULLAH, A. Pesticide-induced oxidative stress and antioxidant responses in tomato (*Solanum lycopersicum*) seedlings. *Ecotoxicology*, [s.l.]. v. 27, n. 7, p. 919-935, 2018.

SILVEIRA, R.E.; MACCARI, M.; MARQUEZI, C.F. Avaliação do efeito de inseticidas aplicados via tratamento de sementes sobre o desenvolvimento de raízes de milho, na proteção de pragas do solo. In: REUNIÃO SUL-BRASILEIRA SOBRE PRAGAS DE SOLO, 8., 2001, Londrina. *Anais...*Londrina: Embrapa Soja, 2001. p. 246-249.

SPINOLA, M.C.M.; CÍCERO, S.M.; MELO, M.D. Alterações bioquímicas e fisiológicas em sementes de milho causadas pelo envelhecimento acelerado. *Scientia Agricola*, [s.l.], v. 57, n. 2, p. 263-270, 2000.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MØLLER, I. M.; MURPHY, A. Fisiologia e desenvolvimento vegetal. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 888 p.

TOMLIN, C.D.S. **The Pesticide Manual: A World Compendium**. Thirteenth Edition. 15. ed. Hampshire, UK: British Crop Protection Council. 15, 2009. 1457 p.

TONIN, R. F. B; FILHO, O. A. L.; LABBE, L. M. B.; ROSSETTO, M. Potencial fisiológico de sementes de milho híbrido tratadas com inseticidas e armazenadas em duas condições de ambiente. *Scientia Agropecuaria*, v. 5, n. 1, p. 7-16, 2014.

USDA – United States Department of Agriculture. **Grain: World Markets and Trade**. Disponível em: < <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/grain-corn-coarsegrains.pdf> >. Acesso em: 21 de março de 2019.

VALKO M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v.39, p.44-84, 2007.

VILLELA, F.A.; MENEZES, N.L. O potencial de armazenamento de cada semente. *Seed News*, [s.l.], v. 8, n. 4, p. 22-25, 2009.

WERLE, A. J. K. Avaliação dialélica de linhagens elites e híbridos de milho. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas). Maringá: Universidade Estadual de Maringá - UEM, 2011. 70p.

YILDIZTEKIN, M.; OZLER, M.A.; NADEEM, S.; TUNA, A.L. Investigations on the effects of commonly used pesticides on tomato plant growth. **FEB - Fresenius Environmental Bulletin**, [s.l.], v. 28, n. 1 p. 376, jan. 2019.