



**THIAGO LUCAS DE OLIVEIRA**

**ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS EM  
SEMENTES DE MILHO SUBMETIDAS A DIFERENTES  
TRATAMENTOS QUÍMICOS E ARMAZENAMENTO**

**LAVRAS-MG  
2019**

**THIAGO LUCAS DE OLIVEIRA**

**ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS EM SEMENTES DE MILHO  
SUBMETIDAS A DIFERENTES TRATAMENTOS QUÍMICOS E  
ARMAZENAMENTO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Renzo Garcia Von Pinho  
Orientador

Prof. Dr. João Almir Oliveira  
Coorientador

**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).

Oliveira, Thiago Lucas de.

Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de milho  
submetidas a diferentes tratamentos químicos e armazenamento /  
Thiago Lucas de Oliveira. - 2019.

56 p. : il.

Orientador(a): Renzo Garcia Von Pinho.

Coorientador(a): João Almir Oliveira.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de  
Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. Zea mays. 2. Tratamento de sementes. 3. Enzimas. I. Von  
Pinho, Renzo Garcia. II. Oliveira, João Almir. III. Título.

**THIAGO LUCAS DE OLIVEIRA**

**ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS EM SEMENTES DE MILHO  
SUBMETIDAS A DIFERENTES TRATAMENTOS QUÍMICOS E  
ARMAZENAMENTO**

**PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL CHANGES IN MAIZE SEEDS  
SUBMITTED TO DIFFERENT CHEMICAL TREATMENTS AND STORAGE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 29 de maio de 2019.

Dr. André Delly Veiga                      IFSULDEMINAS

Dra. Heloisa Oliveira dos Santos      UFLA

Prof. Dr. Renzo Garcia Von Pinho  
Orientador

Prof. Dr. João Almir Oliveira  
Coorientador

**LAVRAS-MG  
2019**

*Aos meus pais, Aparecida e Antônio (in memoriam), por todo o amor, carinho e apoio, e por serem meus maiores exemplos de vida.*

*Dedico*

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, 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 Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, pela oportunidade concedida de realizar o mestrado.

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

Ao meu orientador, professor Dr. Renzo Garcia Von Pinho, pelos valiosos conselhos, incentivos e confiança em mim depositada. É para mim, um exemplo de profissional e pessoa.

Ao meu coorientador, professor Dr. João Almir Oliveira, pelos conselhos e contribuição no trabalho.

À professora Dra. Heloísa Oliveira Santos, pela amizade, carinho, apoio, e por ter me guiado durante toda a execução deste trabalho.

À empresa Helix Sementes, pela doação das sementes utilizadas no trabalho.

Aos servidores e pós-doutorandos lotados no Setor de Sementes da Universidade, pelo auxílio na realização das análises. Agradeço principalmente à Jaqueline, Geraldo, Diego e Vander.

À Marli dos Santos Túlio, secretária do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, por toda a paciência, auxílio e amizade.

Aos amigos e colegas do Grupo do Milho, pela ótima convivência e auxílio na realização das análises e coleta dos dados.

Aos colegas de Pós-Graduação, e amigos feitos durante esse período, em especial à Jessica, Luiz Antônio, Priscila, Rafaela e Thaísa.

Aos amigos de república, pela amizade, companheirismo, e por tornar toda essa jornada mais agradável. Aqui cito os amigos Eliseu, Gilmar, Henrique, José Emanuel, Matheus, Otávio, Rafael e Victor.

O presente trabalho foi realizado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

A 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 químico de sementes de milho é prática amplamente adotada para proteção das lavouras em fase inicial. No entanto, algumas moléculas têm interferido na qualidade de sementes, sobretudo aquelas armazenadas, acelerando sua deterioração. O objetivo deste trabalho foi investigar a influência de tratamentos inseticidas sobre a expressão enzimática e qualidade de sementes de milho, submetidas ao armazenamento, determinando quais sistemas enzimáticos podem ser afetados em uma possível ação fitotóxica dos produtos. Sementes dos híbridos 2B647PW e SHS4070 foram tratadas com quatro diferentes tratamentos químicos (tratamento padrão, padrão + clotianidina, padrão + tiametoxam e padrão + fipronil) e armazenadas por diferentes períodos (0, 3, 6 e 9 meses). Os testes de qualidade fisiológica realizados foram primeira contagem de germinação, germinação, teste do frio sem solo e emergência em bandeja. A análise da expressão das enzimas  $\alpha$ -amilase, esterase, superóxido dismutase, catalase e malato desidrogenase e álcool desidrogenase foi feita pela técnica de eletroforese em gel. Reduções nos parâmetros primeira contagem de germinação e emergência foram observadas para os dois híbridos estudados no decorrer do período de armazenamento. Tratamentos das sementes com tiametoxam levaram à maior redução da qualidade fisiológica das sementes do híbrido 2B647PW durante o período estudado. De modo geral, houve redução da expressão enzimática nas sementes aos 9 meses de armazenamento. As análises enzimáticas consistem em prática mais sensível para a detecção do estado de deterioração de sementes. Conclui-se que a qualidade de sementes de milho tratadas com inseticidas, e armazenadas, varia conforme o produto utilizado, o período de armazenamento e o híbrido. O tratamento com os inseticidas clotianidina, tiametoxam e fipronil reduz a qualidade fisiológica das sementes do híbrido 2B647PW aos nove meses de armazenamento. O tratamento das sementes com os inseticidas clotianidina, tiametoxam e fipronil reduz a expressão das enzimas  $\alpha$ -amilase, superóxido dismutase e catalase aos nove meses de armazenamento. As enzimas  $\alpha$ -amilase, superóxido dismutase, catalase e álcool desidrogenase são bons marcadores da qualidade de sementes híbridas de milho.

**Palavras-chave:** *Zea mays*. Tratamento de sementes. Enzimas.

## ABSTRACT

The chemical treatment of maize seeds is a widely adopted practice for the protection of crops in early stage. However, some molecules have interfered in the quality of seeds, especially those stored, accelerating their deterioration. The objective of this work was to investigate the influence of insecticide treatments on the enzymatic expression and quality of maize seeds submitted to storage, determining which enzymatic systems may be affected in a possible phytotoxic action of the products. Seeds of the 2B647PW and SHS4070 hybrids were treated with four different chemical treatments (standard treatment, standard + clothianidin, standard + thiamethoxam and standard + fipronil) and stored for different periods (0, 3, 6 and 9 months). The physiological quality tests performed were germination first counting, germination, cold test and emergence. The analysis of the expression of  $\alpha$ -amylase, esterase, superoxide dismutase, catalase and malate dehydrogenase and alcohol dehydrogenase enzymes was performed by the gel electrophoresis technique. Reductions in the first germination and emergence counts were observed for the two hybrids studied over the storage period. Thiamethoxam seed treatments led to a greater reduction in the physiological quality of the seeds of the 2B647PW hybrid during the study period. In general, there was a reduction of the enzymatic expression in the seeds at nine months of storage. The enzymatic analyzes are a more sensitive practice for detecting the state of seed deterioration. It is concluded that the quality of maize seeds treated with insecticides and stored varies according to the product used, storage period and hybrid. The treatment with the insecticides clothianidin, thiamethoxam and fipronil reduces the physiological quality of the seeds of hybrid 2B647PW at nine months of storage. The treatment of seeds with the insecticides clothianidin, thiamethoxam and fipronil reduces the expression of the  $\alpha$ -amylase, superoxide dismutase and catalase enzymes at nine months of storage. The enzymes  $\alpha$ -amylase, superoxide dismutase, catalase and alcohol dehydrogenase are good markers of the quality of hybrid corn seeds.

**Keywords:** *Zea mays*. Seed Treatment. Enzymes.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Fórmulas estruturais da nicotina, nitiazina e seus derivados de primeira e segunda geração. ....	21
Figura 2 -	Fórmula estrutural do inseticida fipronil.....	22
Figura 3 -	Expressão da enzima $\alpha$ -amilase em sementes do híbrido 2B647PW, tratadas com diferentes produtos e armazenadas por diferentes períodos (0, 3, 6 e 9 meses). ....	37
Figura 4 -	Expressão da enzima $\alpha$ -amilase em sementes do híbrido SHS4070, tratadas com diferentes produtos e armazenadas por diferentes períodos (0, 3, 6 e 9 meses). ....	38
Figura 5 -	Expressão da enzima esterase em sementes do híbrido 2B647PW, tratadas com diferentes produtos e armazenadas por diferentes períodos (0, 3, 6 e 9 meses). ....	39
Figura 6 -	Expressão da enzima esterase em sementes do híbrido SHS4070, tratadas com diferentes produtos e armazenadas por diferentes períodos (0, 3, 6 e 9 meses). ....	39
Figura 7 -	Expressão da enzima superóxido dismutase em sementes do híbrido 2B647PW, tratadas com diferentes produtos e armazenadas por diferentes períodos (0, 3, 6 e 9 meses).....	40
Figura 8 -	Expressão da enzima catalase em sementes do híbrido 2B647PW, tratadas com diferentes produtos e armazenadas por diferentes períodos (0, 3, 6 e 9 meses). ....	41
Figura 9 -	Expressão da enzima superóxido dismutase em sementes do híbrido SHS4070, tratadas com diferentes produtos e armazenadas por diferentes períodos (0, 3, 6 e 9 meses).....	42
Figura 10 -	Expressão da enzima catalase em sementes do híbrido SHS4070, tratadas com diferentes produtos e armazenadas por diferentes períodos (0, 3, 6 e 9 meses). ....	43
Figura 11 -	Expressão da enzima malato desidrogenase em sementes do híbrido 2B647PW, tratadas com diferentes produtos e armazenadas por diferentes períodos (0, 3, 6 e 9 meses).....	44

Figura 12 -	Expressão da enzima malato desidrogenase em sementes do híbrido SHS4070, tratadas com diferentes produtos e armazenadas por diferentes períodos (0, 3, 6 e 9 meses).....	44
Figura 13 -	Expressão da enzima álcool desidrogenase em sementes do híbrido 2B647PW, tratadas com diferentes produtos e armazenadas por diferentes períodos (0, 3, 6 e 9 meses).....	45
Figura 14 -	Expressão da enzima álcool desidrogenase em sementes do híbrido SHS4070, tratadas com diferentes produtos e armazenadas por diferentes períodos (0, 3, 6 e 9 meses).....	46

### **LISTA DE QUADROS**

Quadro 1 -	Composição da calda padrão utilizada pela empresa para tratamento de sementes de milho.....	27
Quadro 2 -	Composição dos tratamentos experimentais e detalhes sobre inseticidas utilizados.....	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. 32
- Tabela 2 - Valores da primeira contagem da germinação (PCG) em sementes dos híbridos de milho 2B647PW e SHS4070, submetidas a diferentes tratamentos químicos e períodos de armazenamento.....33
- Tabela 3 - Valores de germinação (GE) em sementes dos híbridos de milho 2B647PW e SHS4070, submetidas a diferentes tratamentos químicos e períodos de armazenamento. .... 34
- Tabela 4 - Valores para teste de frio sem solo (TF) em sementes dos híbridos de milho 2B647PW e SHS4070, submetidas a diferentes tratamentos químicos e períodos de armazenamento.....35
- Tabela 5 - Valores médios percentuais da incidência de fungos encontrados em sementes dos híbridos de milho 2B647PW (H1) e SHS4070 (H2), submetidas a diferentes tratamentos químicos e períodos de armazenamento.....36

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 - Valores médios de temperatura e umidade relativa do ambiente de armazenamento, coletados durante o período de condução do experimento....29
- Gráfico 2 - Valores de emergência para os híbridos de milho 2B647PW e SHS4070 submetidos a diferentes períodos de armazenamento.....35

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>15</b>
<b>2.1</b>	<b>Cultura do milho.....</b>	<b>15</b>
<b>2.2</b>	<b>Deterioração e armazenamento de sementes .....</b>	<b>16</b>
<b>2.3</b>	<b>Tratamento químico de sementes.....</b>	<b>18</b>
<b>2.4</b>	<b>Enzimas como marcadores da qualidade de sementes.....</b>	<b>24</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>27</b>
<b>3.1</b>	<b>Detalhes experimentais.....</b>	<b>27</b>
<b>3.2</b>	<b>Análises de qualidade fisiológica e sanitária das sementes .....</b>	<b>29</b>
<b>3.3</b>	<b>Análises bioquímicas das sementes .....</b>	<b>30</b>
<b>3.4</b>	<b>Estatística e interpretação dos dados.....</b>	<b>31</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>32</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>47</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>48</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é considerado uma das mais importantes culturas agrícolas do mundo, sendo responsável por cerca de 40% da produção mundial de grãos (USDA, 2019). O Brasil se destaca na cadeia produtiva de milho, com uma produção em torno de 82 milhões de toneladas, o país tem o posto de terceiro maior produtor mundial do grão (CONAB, 2019). Essa posição de destaque é consequência do avanço tecnológico observado no setor, ao longo dos anos, proporcionado principalmente pelo aprimoramento do manejo fitotécnico da cultura, desenvolvimento de híbridos com genética superior e uso de sementes de boa qualidade.

Com o estabelecimento do sistema de plantio direto e aumento da área semeada com milho na segunda safra, algumas pragas, antes consideradas secundárias, têm ganhado destaque no sistema de produção, atacando principalmente a fase inicial da cultura. Como consequências do ataque destas pragas, tem-se a redução do estande de plantas e a transmissão de doenças, prejudicando a manifestação do potencial produtivo da lavoura.

Uma das práticas disponíveis para proteção inicial dos plantios, o tratamento de sementes se destaca pela eficiência, economia e menor impacto ambiental. O tratamento de sementes refere-se à aplicação de processos e substâncias que preservem ou aperfeiçoem o desempenho das sementes, permitindo que estas expressem todo seu potencial genético. Dentre as substâncias mais utilizadas estão os fungicidas e inseticidas.

O tratamento químico com fungicidas e inseticidas em sementes de milho já é amplamente realizado, sendo feito em sua maioria na indústria, antes do armazenamento. No entanto, algumas moléculas interferem na viabilidade de sementes armazenadas, acelerando sua deterioração (DAN et al., 2010; DEUNER et al., 2014). A exposição dos tecidos vegetais a estes produtos pode gerar estresse oxidativo, potencializando a formação de espécies reativas de oxigênio nas células, degradando membranas e macromoléculas como proteínas e DNA (BASHIR; SIDDIQI; IQBAL 2007). Estes danos refletem na redução da qualidade de sementes. Dentre as implicações de se usar sementes de baixa qualidade estão a redução da produtividade, aumento do custo de produção e menor rentabilidade da atividade.

Para diagnóstico da qualidade de sementes, normalmente são utilizados testes como germinação, emergência, teste do tetrazólio, envelhecimento acelerado, teste do frio, dentre outros. Além destes testes padrões de germinação e vigor, tem-se utilizado as alterações na atividade e expressão de algumas enzimas como parâmetros para a avaliação da qualidade de sementes (CARVALHO et al., 2014, GALVÃO et al., 2014). Além de indicativo da condição

das sementes, o uso de análises enzimáticas também pode auxiliar na descoberta das causas de um reduzido vigor ou viabilidade.

Sabendo do potencial informativo que as análises enzimáticas possuem, objetivou-se com este trabalho, investigar a influência de tratamentos inseticidas sobre a expressão enzimática em sementes de milho submetidas ao armazenamento, determinando quais sistemas enzimáticos podem ser afetados em uma possível ação fitotóxica dos produtos, esclarecendo uma eventual redução da qualidade das sementes.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Cultura do milho

O milho (*Zea mays* L.) é uma espécie pertencente à família Poaceae, de ampla adaptação a diferentes condições ambientais. É classificada como de ciclo anual, monoica, alógama, anemófila e possui metabolismo C4. É considerada a cultura agrícola com origem nas Américas de maior importância no mundo. Essa relevância do cereal é devida a seus diversos usos, sendo importante na alimentação animal, humana e indústrias (fabricação de polímeros e biocombustíveis) (MÔRO; FRITSCHÉ-NETO, 2017). Além de seu grande valor para o agronegócio, o milho também é uma das culturas mais cultivadas pela agricultura familiar, tanto para a subsistência quanto como uma fonte de renda.

A semente do milho é classificada botanicamente como cariopse, fruto em que o pericarpo está fundido com o tegumento propriamente dito. É formada por três partes principais: pericarpo, endosperma e embrião. O pericarpo é uma camada fina e resistente, constituindo a parte mais externa da semente. O endosperma, constituído em grande parte por amido, é a parte de maior volume da semente e está envolvido pelo pericarpo. A parte mais externa do endosperma, que está em contato com o pericarpo, é denominada camada de aleurona, a qual é rica em proteínas e enzimas cujo papel no processo de germinação é determinante. O embrião, ao lado do endosperma, possui primórdios de todos os órgãos da planta desenvolvida.

Com produção aproximada de 1,1 bilhão de toneladas, o milho é o grão mais produzido no mundo (FAO, 2019). O Brasil ocupa o posto de terceiro maior produtor mundial, com um montante produzido de 82 milhões de toneladas de grãos, perdendo em produção apenas para os EUA e China, com produções de 371 e 259 milhões de toneladas, respectivamente (USDA, 2019). No país, o cereal é cultivado em todos os estados, apresentando uma produtividade média próxima de 4700 kg/ha. O estado de maior produção é o Mato Grosso, seguido do Paraná, Goiás e Mato Grosso do Sul (CONAB, 2019).

O milho é cultivado no Brasil em duas épocas, primeira safra e segunda safra. A primeira safra ou safra de verão, tem a semeadura efetuada de agosto a dezembro. O milho desta época possui menores empecilhos para obtenção de alta produtividade, em razão das boas condições climáticas observadas. A segunda safra, semeada de janeiro a março, era inicialmente chamada de safrinha, pelas baixas produtividades dos primeiros cultivos e os menores investimentos em insumos. Hoje, é a principal safra do milho no país, com produção

bastante superior à da primeira época. No último ano agrícola, de 2017/18, a produção de milho no Brasil fechou em 82 milhões de toneladas, sendo a segunda safra responsável por cerca de 2/3 desse total (CONAB, 2019).

As condições climáticas inerentes a segunda safra são um tanto desfavoráveis para o pleno rendimento da cultura, entretanto, o avanço tecnológico em múltiplas áreas tem permitido o aumento da produtividade do milho durante esta época do ano. A obtenção e uso de sementes de boa qualidade está entre os principais motivos pelo sucesso da segunda safra no país, permitindo um adequado estabelecimento dos cultivos e alcance de elevados rendimentos.

## **2.2 Deterioração e armazenamento de sementes**

O armazenamento de sementes tem por objetivo preservar a qualidade das sementes durante todo o tempo em que estiverem armazenadas, até o plantio da próxima safra. Embora condições apropriadas de armazenamento não aumentem a qualidade das sementes, elas podem deter ou diminuir a redução desta, pela inibição do desenvolvimento de microrganismos prejudiciais e retardando a deterioração fisiológica (BEWLEY et al., 2006).

A deterioração ocorre pelo processo natural de envelhecimento das sementes e envolve uma série de alterações fisiológicas, bioquímicas e físicas, que, eventualmente, causam a morte do propágulo (MARCOS FILHO, 2015). Embora seja um processo natural, a deterioração de sementes pode ser intensificada devido a condições ambientais e de armazenamento, como a temperatura, umidade e tipo de embalagem.

Com o aumento do período de armazenamento é esperada uma redução em parâmetros fisiológicos como a germinação e vigor de plântulas, em decorrência da deterioração. Trabalhando com milho, Coradi et al. (2015) observaram decréscimo na germinação dos materiais, com maior intensidade para condições não controladas de armazenamento, se comparado com o armazenamento refrigerado. Uma menor temperatura ocasiona diminuição na velocidade de reações bioquímicas em sementes, reduzindo o consumo de reservas e permitindo a manutenção das características iniciais de armazenamento por períodos mais longos (AGUIAR et al., 2012). Carvalho e Nakagawa (2012) afirmam que para o armazenamento de sementes de milho, as condições ideais são temperatura de 10-11 °C e umidade relativa do ar entre 50 e 55%.

O teor de água das sementes também é fator determinante na manutenção da qualidade das sementes armazenadas. O teor de água das sementes sofre forte influência das condições

ambientais do armazém, principalmente temperatura e umidade relativa do ar. 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). É necessário considerar que algumas espécies, classificadas como recalcitrantes, não toleram dessecação e baixas temperaturas (BARBEDO; MARCOS FILHO, 1998). Neste caso, mesmo com controle do ambiente de armazenamento, a viabilidade das sementes não é mantida por longos períodos de tempo.

A aplicação de produtos estranhos à semente como fitossanitários, nutrientes, reguladores de crescimento e hormônios, aminoácidos, polímeros e corantes, aumentam os riscos de deterioração da qualidade fisiológica das sementes durante o armazenamento. Sementes de milho tratadas com os inseticidas tiametoxam e imidacloprido + tiodicarbe apresentaram redução no vigor com o prolongamento do período de armazenamento após o tratamento (LORENZETTI et al., 2014). Deuner et al. (2014) verificaram redução da germinação e do vigor de sementes de milho tratadas com fitossanitários, sendo a redução variável em função do produto e do tempo em que as sementes permaneceram armazenadas. A peletização de sementes de *Brachiaria decumbens* com areia e microcelulose prejudicou a velocidade e porcentagem de germinação, bem como a emergência de plântulas durante o armazenamento (PEREIRA et al., 2011).

O tratamento de sementes com fitossanitários é muito comum, e as condições de armazenamento podem mudar o comportamento dos produtos sobre as sementes. Magalhães (2013) verificou que a redução da temperatura de armazenamento interfere nos efeitos fitotóxicos de fitossanitários aplicados em sementes. Os efeitos danosos dos produtos sobre as sementes são percebidos na medida em que se acentua o processo de deterioração. Como este é reduzido pelas condições baixas de temperatura, os sistemas de defesa das sementes permanecem funcionais e evitam eventuais danos causados pelos produtos. O tempo de armazenamento também afeta o comportamento de produtos sobre a semente. Longos períodos de armazenamento podem levar o tiametoxam a causar efeitos prejudiciais em parâmetros fisiológicos de sementes de milho (MAGALHÃES, 2013; TONIN et al., 2014).

O tipo de embalagem em que as sementes são armazenadas também influencia em sua qualidade fisiológica, isso porque a embalagem interage com a umidade do ambiente, controlando ou não a troca de água das sementes com o meio exterior. Trabalhando com dois tipos de embalagens para armazenamento de sementes de milho, Antonello et al. (2009) verificaram que o uso de embalagens plásticas possibilitou uma melhor manutenção da

qualidade fisiológica, física e sanitária das sementes, com menor incidência de insetos e de fungos, se comparada aos sacos de algodão.

Com a ocorrência da deterioração, mudanças bioquímicas também são observadas em sementes. Copeland e McDonald (2001) destacam que para detectar o início da deterioração das sementes, as avaliações mais sensíveis são aquelas relacionadas às atividades de enzimas associadas à biossíntese de tecidos novos, uma vez que, com o processo de deterioração das sementes, as enzimas tornam-se menos eficientes para exercer a atividade catalítica.

Com o aumento do tempo de exposição das sementes a condições não controladas de armazenamento, enzimas relacionadas com a respiração celular, como é o caso da malato-desidrogenase (MDH) e álcool-desidrogenase (ADH) têm suas atividades reduzidas, sugerindo falhas em suas funções (CAIXETA et al., 2014; CARVALHO et al., 2014). A ADH é uma enzima ligada a respiração anaeróbica e atua na redução do acetaldeído, que acelera a deterioração de sementes, a etanol, composto menos tóxico que o anterior (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2005; ZHANG et al., 1999). Assim, com maior atividade da enzima, espera-se maior preservação da qualidade das sementes e, por conseguinte, uma menor deterioração.

A produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) é incrementada durante o processo deteriorativo de sementes (MCDONALD, 1999). Estes EROs promovem danos as células e tecidos, levando à redução da qualidade das sementes. Na defesa contra as EROs, existem enzimas como a superóxido dismutase e peroxidase, responsáveis pela remoção e redução destes agentes tóxicos. 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 aos efeitos deletérios das EROs, perdendo sua viabilidade (CARVALHO et al., 2014).

### **2.3 Tratamento químico de sementes**

O tratamento de sementes, no sentido amplo, é a aplicação de processos e substâncias que preservem o desempenho das sementes, permitindo a expressão máxima do potencial genético das culturas. Inclui a aplicação de pesticidas, produtos biológicos, inoculantes, bioestimulantes, micronutrientes etc. Em sentido restrito, o tratamento de sementes refere-se à aplicação de produtos químicos eficientes no controle de patógenos e pragas (MENTEN; MORAES, 2010).

O tratamento químico de sementes, além de ser econômico e de fácil execução, é também considerado seguro ao homem e ao ambiente. Devido a pequena quantidade de produtos adicionados às sementes, e estes estarem em contato direto com o sítio alvo, é um método pouco prejudicial ao ambiente, quando comparado aos sistemas convencionais de tratamento de doenças e pragas, por pulverização aérea. 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). Além disso, o tratamento ainda pode promover maior longevidade às sementes armazenadas devido a sua ação contra organismos prejudiciais que ataquem durante esta etapa.

Hoje, no Brasil, cerca de 65 produtos comerciais estão registrados para uso em tratamento de sementes de milho (BRASIL, 2019). Grande parte destes produtos possuem inseticidas em sua composição. Dentre os inseticidas mais utilizados para o tratamento de sementes estão os neonicotinoides, como o tiametoxam e a clotianidina. Outro grupo utilizado é o dos fenilpirazóis, representado principalmente pelo ingrediente ativo fipronil.

Os neonicotinoides são um grupo de inseticidas neurotóxicos, de ação sistêmica e bom efeito residual. São derivados da nicotina, um alcaloide encontrado nos tecidos de plantas do gênero *Nicotiana*, da família Solanaceae. A nicotina também apresenta atividade inseticida, embora sua alta toxicidade, caráter volátil e baixa sistemicidade, tenham provocado sua substituição por moléculas sintéticas como os neonicotinoides (TOMLIN, 2009).

Inseticidas derivados da nicotina tem como alvo o sistema nervoso central dos insetos. Atuando como agonistas da acetilcolina, se ligam de maneira irreversível aos receptores do neurotransmissor nos insetos. Esta ligação leva a uma abertura dos canais iônicos nicotínicos e a uma rápida resposta excitatória. A ligação e os estímulos contínuos dos receptores neurais resultam na morte do inseto (FISHEL, 2016; TOMIZAWA; CASIDA, 2005). Neonicotinoides têm ocupado lugar de destaque dentre os maiores grupos de inseticidas presentes no mercado. Seu uso tem aumentado com a perda da eficiência de outros grandes grupos como organofosforados e carbamatos, devido à resistência de insetos (BASS et al. 2015; JESCHKE et al., 2011).

Neonicotinoides são registrados para uso em uma ampla variedade de culturas agrícolas visando principalmente o manejo de insetos sugadores, embora tenha ação sobre alguns coleópteros e lepidópteros (FAIRBROTHER et al., 2014). Embora seu maior uso seja no tratamento de sementes, também podem ser aplicados via pulverizações foliares e no solo (BLACQUIÉRE et al., 2012; JESCHKE et al., 2011). A boa efetividade observada de neonicotinoides sobre insetos da ordem Hemiptera pode ser explicada pela presença de

receptores nicotínicos com alta afinidade a moléculas deste grupo. Em insetos de outras ordens, como dípteras e lepidópteros, estes sítios estão presentes em menor quantidade, esclarecendo a menor ação tóxica em algumas espécies destes grupos (CROSSTHWAITE et al., 2017; WIESNER; KAYSER, 2000).

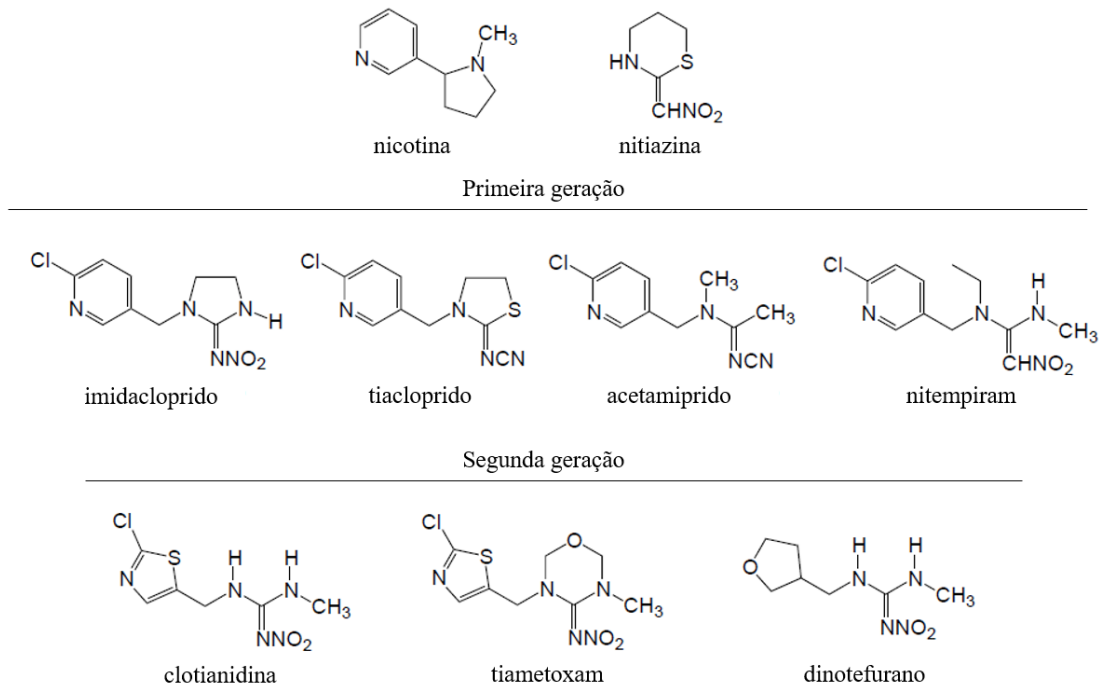
O primeiro composto do grupo dos neonicotinoides a ser sintetizado foi a nitiazina, em 1978 (YAMAMOTO; CASIDA, 1999). Possuía excelente atividade inseticida, boa ação sistêmica em plantas e baixa toxicidade à mamíferos. Entretanto, era rapidamente degradado sob a luz, e esse foi o motivo que o impediu de ser comercializado. Em 1985, da modificação da estrutura da nitiazina, surgiu o imidacloprido, o primeiro neonicotinoide a ser comercializado no mundo (KAGABU, 2011). O imidacloprido possuía atividade inseticida 12 vezes maior que a nicotina, alta sistemicidade, é pouco tóxico e fotoestável. Logo após o lançamento do imidacloprido, outros inseticidas neonicotinoides considerados de primeira geração passaram a ser comercializados, dentre eles estão o nitempiram, o acetamiprido e o tiacloprido.

Tiametoxam e clotianidina também pertencem ao grupo dos neonicotinoides, sendo considerados neonicotinoides de segunda geração. Neonicotinoides de segunda geração se diferenciam dos primeiros devido a algumas alterações em suas estruturas que melhoram suas propriedades físico-químicas e potencializam a atividade inseticida (YAMAMOTO; CASIDA, 1999). As moléculas dos inseticidas neonicotinoides de primeira e segunda geração, como as de seus precursores (nicotina e nitiazina) estão representadas na Figura 1.

O tiametoxam é um inseticida sistêmico indicado para o tratamento de sementes de milho. Além de registrado para o milho, o tiametoxam tem registro para as culturas do algodão, amendoim, arroz, cana-de-açúcar, cevada, feijão, girassol, pastagens, soja, sorgo e trigo. As pragas-alvo são o 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).

Tiametoxam ocupa o posto de neonicotinóide mais comercializado no mundo com vendas ultrapassando 37% do mercado dos neonicotinoides (CROSSTHWAITE et al., 2017). No inseto, a clivagem da molécula de tiametoxam leva a formação de clotianidina, um outro composto inseticida neonicotinoide (COULON et al., 2018). Contudo, a velocidade com que a clotianidina é formada a partir de tiametoxam ainda permite que esta última desempenhe seu papel neurotóxico no organismo do inseto (KAYSER et al., 2007; TAILLEBOIS et al., 2014).

Figura 1 - Fórmulas estruturais da nicotina, nitiiazina e seus derivados de primeira e segunda geração.



Fonte: Adaptado de Swenson (2013).

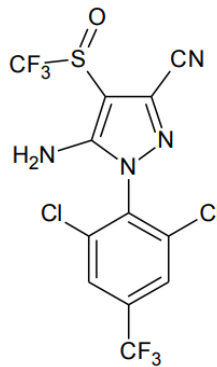
Clotianidina é outro neonicotinoide indicado para o tratamento de sementes. Possui registro para as culturas do algodão, milho e soja. No milho, é indicado para o controle do coró (*Phyllophaga cuyabana*), pulgão do milho (*Rhopalosiphum maidis*), cigarrinha do milho (*Dalbulus maidis*), tripses (*Frankniella williamsi*) e percevejo-barriga-verde (*Dichelops* spp.) (BRASIL, 2019).

Com o estabelecimento do sistema plantio direto, e cultivo do milho em sequência à safra de soja, tem-se observado o crescimento populacional e aumento da relevância de algumas espécies de pragas que antes eram consideradas pragas secundárias no milho, podendo-se destacar os percevejos barriga-verde (*Dichelops* spp.) e o marrom (*Euschistus heros*) (QUINTELA et al., 2006). Com o aumento da pressão destas pragas sobre os cultivos de milho, os ingredientes ativos tiametoxam e clotianidina, assim como outros neonicotinoides, vem sendo empregados com frequência (ÁVILA; DUARTE, 2012). Trabalhando com a integração do tratamento de sementes com estes inseticidas associados a pulverizações em pós-emergência do milho, tem-se alcançado boa eficiência de controle de populações do percevejo barriga-verde (BRUSTOLIN et al., 2011).

Outro grupo de inseticidas utilizado no tratamento de sementes para controle de pragas iniciais é o dos fenilpirazóis. Estes inseticidas que atuam como antagonistas do GABA (ácido

gama-aminobutírico), ligando aos seus receptores, suprimindo o fluxo de cloro (Cl<sup>-</sup>) para o interior da célula do axônio. Este bloqueio interfere na neuromodulação, provocando uma atividade neural excessiva que acaba na morte do inseto por hiperexcitação (LI; AKK, 2008). O fipronil (FIGURA 2), representante deste grupo de inseticidas, é recomendado para o controle de coró (*Phyllophaga cuyabana*) e lagarta-elasma (*Elasmopalpus lignosellus*) na cultura do milho (BRASIL, 2019).

Figura 2 - Fórmula estrutural do inseticida fipronil.



Fonte: Gomes Junior (2017).

O fipronil foi descoberto em 1987, e teve seu registro obtido em 1996, nos Estados Unidos (BOBÉ et al., 1998). Assim como os neonicotinoides, também é utilizado como alternativa de manejo em casos onde os insetos desenvolveram resistência a outros grupos de inseticidas como piretroides, organofosforados e carbamatos (JESCHKE et al., 2011). É sistêmico e possui boa lipofilicidade, facilitando sua absorção pela planta e ação sobre insetos-praga (GUNASEKARA et al., 2007). Sua menor toxicidade a mamíferos, se comparada com grupos antigos como fosforados e carbamatos, é devido ao fato de que os canais de glutamato-cloro (GluCl), sobre os quais se dá sua ação, estarem ausentes nos referidos organismos (NARAHASHI et al., 2010).

Além da ação sobre pragas e patógenos, moléculas inseticidas também podem interagir com as plantas, modificando o metabolismo e a morfologia vegetal, podendo gerar benefícios ou prejuízos ao desenvolvimento das plantas (CASTRO et al., 2007). Imidacloprido, tiametoxam, clotianidina e outros inseticidas neonicotinoides contribuem na indução a tolerância a seca e resistência a patógenos em plantas, embora as vias em que atuam e de que formas eles agem, não tenham sido completamente elucidadas (FORD et al., 2010; THIELERT; METZLAFF; DE BLOCK, 2006). Estudos com tiametoxam evidenciaram sua atividade benéfica no metabolismo de espécies vegetais, contribuindo com o aumento do

vigor de sementes de milho e soja (HORII et al., 2007) e produtividade do feijoeiro (CALAFIORI; BARBIERI, 2001). Apesar dos benefícios observados, a mistura do tiametoxam com outros ingredientes ativos na cultura da soja, pode prejudicar a germinação das sementes e desenvolvimento inicial das plântulas (CUNHA et al., 2015).

Embora seja recomendado para uso na cultura do milho, o fipronil aplicado na forma de tratamento de sementes pode ocasionar fitotoxidez, aumentando as porcentagens de plântulas anormais e mortas, menor comprimento de raiz, da parte aérea de plântulas e menor massa seca das plântulas (ESPÍNDOLA et al., 2018; SILVEIRA et al., 2001). DAN et al. (2010) observaram efeitos negativos no comprimento das raízes quando sementes de soja foram tratadas com fipronil. Por outro lado, em situações específicas, o fipronil pode promover efeitos fisiológicos benéficos em plantas como desenvolvimento radicular e de parte aérea (CAIXETA et al., 2010). Inseticidas que atuam em canais iônicos, como é o caso do fipronil (canais de cloro), estão associados com aumento da tolerância de plantas aos estresses bióticos e abióticos. Isso porque esses íons atuam na regulação estomática e, conseqüentemente, na regulação ao déficit hídrico (KLEIN et al., 2004).

Os prejuízos causados na performance de sementes e plantas pela presença de inseticidas, estão relacionados a um estresse oxidativo causado pela formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) (BASHIR; SIDDIQI; IQBAL, 2007; SHAKIR et al., 2018). Aumento da produção de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e sinais de peroxidação de membranas são observados em tecidos vegetais expostos a diferentes concentrações de inseticidas (AKSAKAL, 2018; SHAKIR et al., 2018).

O aumento da expressão e atividade de algumas enzimas pode ser observado quando há exposição da planta à inseticidas (YÜCEL et al., 2018). Esse comportamento consiste em uma tentativa da planta de remover produtos tóxicos formados naquele momento. Quando os sistemas de proteção da planta já não conseguem deter a formação e ação destes radicais livres, pode ocorrer decréscimo na atividade enzimática e metabolismo em função dos danos estruturais causados (BASHIR; SIDDIQI; IQBAL, 2007). Neste ponto, a semente apresenta reduzida viabilidade, com baixa germinação e vigor (COSKUN et al., 2015; KILIC et al., 2015). Esta situação é particularmente comum em sementes tratadas armazenadas por grandes períodos de tempo (DEUNER et al., 2014; TONIN et al., 2014).

## 2.4 Enzimas como marcadores da qualidade de sementes

A perda na qualidade de sementes durante o armazenamento se deve a uma série de lesões em nível celular e molecular, como danos na integridade de cadeias de DNA, proteínas e membranas (BAILLY, 2004; MCDONALD, 1999; SHABAN, 2013). Em estudos sobre deterioração, os sistemas enzimáticos mais considerados são aqueles envolvidos no processo de respiração, os de metabolismo de reservas, enzimas ligadas a defesas contra estresse oxidativo e desestruturação do sistema de membranas (CARVALHO et al., 2000).

As lesões de nível celular e molecular que ocorrem nas sementes ao longo do armazenamento são propiciadas por reações de deterioração, como as hidrolíticas, oxidativas e peroxidativas. Reações oxidativas e peroxidativas estão relacionadas com a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) (BEWLEY; BLACK; HALMER, 2006). Estas EROs são altamente reativas e podem danificar tecidos, organelas, ácidos nucleicos, proteínas e lipídios (SMITH et al., 2009). A intensidade em que o processo de deterioração ocorre, depende da capacidade das sementes em resistir às reações de deterioração, devido a seus mecanismos de proteção (MOHAMMADI et al., 2012; SHABAN, 2013).

Os danos causados pelas EROs podem ser evitados ou amenizados por mecanismos detoxificantes enzimáticos e não enzimáticos. As principais enzimas com essa função em plantas são as superóxido-dismutases, catalases e peroxidases. Tais enzimas evitam a formação de radicais livres, sequestram estes, ou promovem sua degradação, prevenindo a ocorrência de danos às células vegetais (SERKEDJIEVA, 2010).

A superóxido dismutase (EC 1.15.1.1) é uma metalo-enzima considerada como a primeira linha de defesa contra as EROs, catalisando a conversão de superóxidos ( $O_2^-$ ) a oxigênio e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), considerado um composto menos reativo (CARNEIRO et al., 2011). Por esta razão, o aumento na atividade da superóxido dismutase pode contribuir para uma maior tolerância da planta ao estresse oxidativo (JALEEL et al., 2007; SHAKIR et al., 2018). As SODs podem ocorrer sob três isoformas, dependendo do metal associado a mesma. Geralmente as plantas possuem Cu/Zn-SOD no citosol, Cu/Zn e Fe-SOD nos cloroplastos e Mn-SOD nas mitocôndrias (DINAKAR; DJILIANOV; BARTELS, 2012; DUBEY, 2010). É comum ocorrer queda na expressão e atividade da enzima em sementes com avançado grau de deterioração (ABREU et al., 2013). Sendo assim, a mesma pode ser utilizada como marcador do estado de qualidade da semente.

A catalase (EC 1.11.1.6) é uma heme-enzima que atua sobre os EROs, catalisando a redução de  $H_2O_2$  em  $H_2O$  e  $O_2$ . A atividade da catalase é efetiva em concentrações

milimolares de  $H_2O_2$ , sendo 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 aumento na atividade desta enzima, em uma tentativa de proteção contra a formação de radicais livres (YILDIZTEKIN et al., 2019). Bashir, Siddiqi e Iqbal (2007) observaram uma redução na atividade da enzima em sementes tratadas com o inseticida deltametrina. Neste caso, os autores apontam como possíveis causas, a inibição da síntese da enzima e danos estruturais causados pela ação dos radicais livres.

Enzimas amilases estão ligadas diretamente à qualidade fisiológica de sementes de milho (LOPES et al., 2017). Durante o processo de germinação, o embrião produz giberelina (GA3) que é transportada até a camada de aleurona, induzindo a síntese de enzimas hidrolíticas como a  $\alpha$ -amilase (EC 3.2.1.1) (CHEN et al., 2013). Estas enzimas degradam o amido contido no endosperma, liberando energia necessária para o desenvolvimento do embrião. A enzima  $\alpha$ -amilase tem função fundamental na mobilização de reservas em sementes de milho, sendo responsável por 90% da atividade amilolítica (LI; BLANCO; JAY-LIN, 2007). Com a deterioração de sementes, decréscimo na atividade da  $\alpha$ -amilase é observado, o que impacta o potencial germinativo dos materiais (MUNIZ et al., 2007; WATTANAKULPAKIN et al. 2012).

A esterase (EC 3.1.1) é uma enzima envolvida no metabolismo de lipídios e reações de hidrólise de ésteres (PESKE; VILLELA; MENEGHELLO, 2012). Ácidos graxos, produtos das reações de hidrólise em que a esterase atua, podem ser convertidos em fonte de energia para diversos processos metabólicos. Assim como outras enzimas de grande importância metabólica, a esterase tem sua expressão prejudicada com o avanço da deterioração de sementes (DUBAL et al., 2016). Em alguns casos, a análise da expressão desta enzima deve ser feita em conjunto com dados de sanidade de sementes, pois algumas espécies de fungos associados a sementes produzem grandes quantidades desta enzima (MÄKELÄ et al., 2016).

Enzimas que atuam em processos respiratórios possuem grande importância na avaliação da qualidade de lotes de sementes armazenados. A enzima álcool desidrogenase (EC 1.1.1.1) está principalmente associada com o metabolismo anaeróbico, reduzindo acetaldeído a etanol e oxidando NADH a  $NAD^+$  (BRAY et al., 2000). A conversão de acetaldeído para etanol é benéfica para a célula, pois este último composto é menos tóxico do que o primeiro e possui melhor difusão (VEIGA et al., 2010). A relação desta enzima com a qualidade de sementes é comprovada em literatura, sendo suas maiores expressão e atividade

indicativos de aumento na respiração celular e aceleração da deterioração das sementes (GALVÃO et al., 2014; MARINI et al., 2013).

A malato desidrogenase (EC 1.1.1.37) é outra enzima relacionada com a respiração celular. A enzima catalisa a oxidação do malato em oxaloacetato no ciclo de Krebs, gerando poder redutor na forma de NADH. Está presente na mitocôndria, atuando no ciclo de Krebs e também no citoplasma, envolvida no metabolismo de ácidos graxos (TAIZ; ZEIGER, 2013). Possui função determinante na geração de energia para as etapas de germinação e crescimento de plântulas. Sua atividade tem relação com a qualidade de sementes, um aumento da sua expressão indica aumento da respiração e consumo de reservas, comprometendo a longevidade da semente.

Eventos deteriorativos que precedem a perda da capacidade germinativa de sementes envolvem mudanças na expressão ou atividade enzimática (MARINI et al., 2013). Desse modo, o estudo de enzimas pode ser útil em trabalhos sobre a deterioração de sementes.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Detalhes experimentais

O experimento foi conduzido nas dependências do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (Lavras, MG), sendo as análises fisiológicas e bioquímicas realizadas no Laboratório Central de Análise de Sementes, da mesma instituição. Foram utilizadas como material experimental, sementes do híbrido simples de milho 2B647PW e híbrido duplo SHS4070, classificadas em peneira CH20/64, cedidas pela empresa Helix Sementes. As sementes são provenientes da safra 2015/2016, produzidas no período de inverno, no município de Paracatu, MG, e beneficiadas na cidade de Patos de Minas, MG.

No início do experimento, as sementes foram tratadas com diferentes produtos químicos, de forma manual, através de sacos plásticos, buscando misturar as sementes e os produtos de forma homogênea. Os tratamentos consistem em uma calda padrão adotada pela empresa que comercializa as sementes, associada a diferentes inseticidas recomendados para o tratamento de sementes de milho. A calda padrão é composta pelos ingredientes Carbendazim + Tiram (Derosal Plus<sup>®</sup>), Deltametrina (Actellic<sup>®</sup>), Pirimifós metílico (K-obiol<sup>®</sup>) e água. Mais detalhes sobre a composição da calda padrão estão expostos no Quadro 1.

Quadro 1 - Composição da calda padrão utilizada pela empresa para tratamento de sementes de milho.

Produto comercial	Participação na calda	Ingrediente ativo	Classe	Dose do princípio ativo
Derosal Plus <sup>®</sup>	17%	Carbendazim	Fungicida	2,04 g p.a./100 kg de semente
		Tiram	Fungicida	4,76 g p.a./100 kg de semente
K-obiol <sup>®</sup>	1%	Deltametrina	Inseticida	0,02 g p.a./100 kg de semente
Actellic <sup>®</sup>	1%	Pirimifós metílico	Inseticida	0,04 g p.a./100 kg de semente
Água	81%			

Fonte: Do autor (2019).

Os inseticidas utilizados em associação à calda padrão para a composição dos tratamentos experimentais foram a Clotianidina (Poncho<sup>®</sup>), Tiametoxam (Cruiser<sup>®</sup> 350 FS) e

Fipronil (Shelter<sup>®</sup>). Detalhes dos tratamentos são exibidos no Quadro 2. As doses utilizadas dos inseticidas estão dentro daquelas recomendadas pelos seus fabricantes.

Quadro 2 - Composição dos tratamentos experimentais e detalhes sobre inseticidas utilizados.

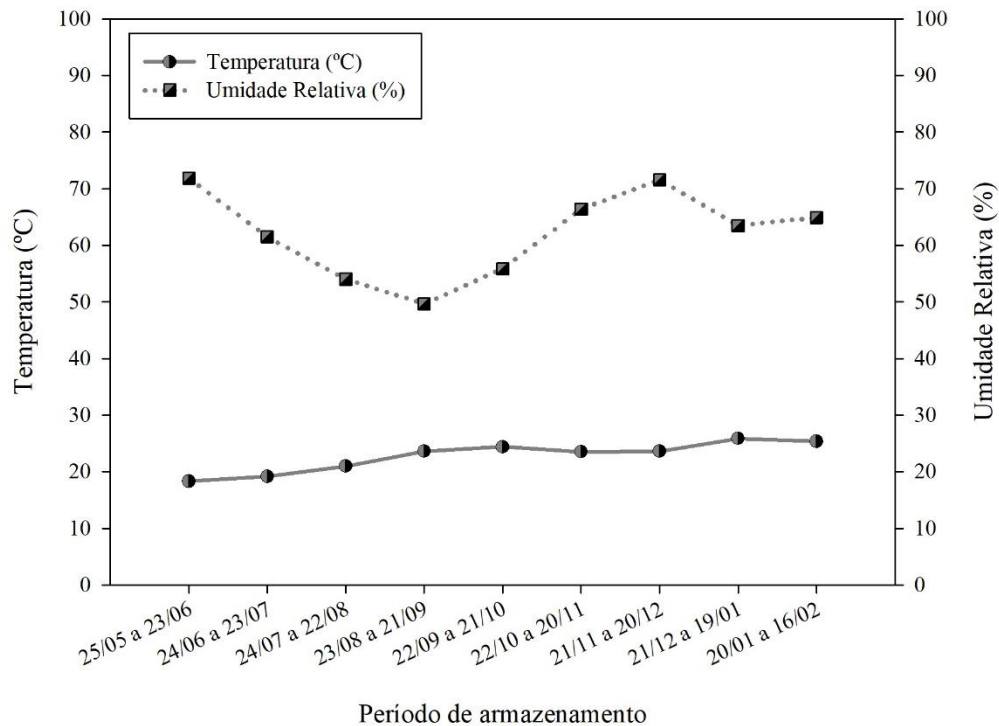
<b>Identificação do tratamento</b>	<b>Composição do tratamento</b>	<b>Dose do princípio ativo</b>	<b>% do princípio ativo no produto comercial</b>
P	Calda padrão	-	-
PC	Calda padrão + Clotianidina	210 g p.a./100 kg de semente	60%
PT	Calda padrão + Tiametoxam	210 g p.a./100 kg de semente	35%
PF	Calda padrão + Fipronil	62,5 g p.a./100 kg de semente	25%

Fonte: Do autor (2019).

Após o tratamento, as sementes foram acondicionadas em sacos de papel multifoliado, semipermeáveis, colocados sobre estrado de madeira e armazenados em ambiente não controlado (armazém convencional). O ambiente em questão é um galpão coberto com telhas de aço galvanizado localizado no Setor de Grandes Culturas da Universidade Federal de Lavras. As sementes ficaram armazenadas por quatro épocas diferentes (0, 3, 6 e 9 meses). O período de armazenamento começou na data de 25/05/2016 e encontrou seu término no dia 16/02/2017. As condições climáticas (temperatura e umidade relativa do ar) do ambiente foram monitoradas durante todo o período de armazenamento e estão apresentadas no Gráfico 1.

A cada três meses de armazenamento (0, 3, 6 e 9 meses), amostras de sementes referentes a cada época de avaliação foram coletadas para realização das análises fisiológicas 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 °C, até a realização das determinações.

Gráfico 1 - Valores médios de temperatura e umidade relativa do ambiente de armazenamento, coletados durante o período de condução do experimento.



Fonte: Do autor (2019).

### 3.2 Análises de qualidade fisiológica e sanitária das sementes

Os testes utilizados para avaliar a qualidade das sementes estão descritos a seguir:

- Germinação: realizado utilizando papel germitest umedecido com água proporcional a 2,5 vezes seu peso seco, com quatro repetições de 50 sementes, em germinador a 25 °C. A primeira contagem da germinação foi realizada aos 4 dias após a confecção do teste e a última contagem feita aos 7 dias. As plântulas foram classificadas em normais, anormais e sementes mortas e o resultado foi expresso em porcentagem de plântulas normais (BRASIL, 2009b).
- Teste do frio sem solo: realizado utilizando-se como substrato o papel germitest umedecido com água equivalente a 2,5 vezes seu peso seco, com quatro repetições de 50 sementes em forma de rolos, semelhantes ao do teste de germinação. Os rolos foram acondicionados em sacos plásticos e mantidos em câmara fria regulada a 10 °C, durante sete dias. Após este período, os rolos foram retirados dos sacos plásticos e acondicionados em germinador regulado para 25 °C, durante quatro dias (BARROS et al., 1999). Em seguida, foi feita a avaliação das plântulas considerando-se somente plântulas normais, segundo os critérios adotados para o teste de germinação.

- c) Emergência sob condições controladas: a semeadura foi realizada em bandejas plásticas contendo substrato areia + solo na proporção 2:1. Foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes por tratamento. Após a semeadura, as bandejas foram colocadas e mantidas em câmara de crescimento vegetal com a temperatura regulada à 25 °C e fotoperíodo de 12 horas. A partir da emergência da primeira plântula, foram realizadas avaliações diárias, computando-se o número de plântulas emergidas até a estabilização do estande. Os resultados foram expressos na forma de porcentagem de emergência de plântulas normais (EM).
- d) Teste de sanidade: a qualidade sanitária das sementes foi determinada pelo método da incubação em substrato de papel *blotter test*, seguindo a metodologia do Manual de Análise Sanitária de Sementes (BRASIL, 2009a). Foram utilizadas oito repetições de 50 sementes por tratamento. As sementes foram colocadas sobre três folhas de papel filtro, previamente esterilizadas e umedecidas, em placas de Petri, transparentes e com tampa. As amostras foram submetidas ao resfriamento em freezer por 24h. Após as 24 horas, as amostras foram incubadas à 20±2 °C, por um período de dez dias em um fotoperíodo de 12 horas. Finalizado esse período, as sementes foram examinadas individualmente com auxílio de um estereomicroscópio, verificando a ocorrência de frutificações típicas do crescimento de fungos. Os resultados foram expressos em porcentagem de ocorrência dos fungos.

### 3.3 Análises bioquímicas das sementes

Foram realizadas análises de expressão das enzimas  $\alpha$ -amilase, catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), álcool desidrogenase (ADH), malato desidrogenase (MDH) e esterase (EST). Para as análises, amostras de 100 gramas de cada tratamento foram trituradas com o uso de PVP e nitrogênio líquido e, posteriormente, armazenadas à temperatura de -86 °C. A análise da expressão enzimática foi feita por meio da técnica de eletroforese. Para a extração das enzimas CAT, SOD, ADH, MDH e EST, foi utilizado o tampão Tris-HCl 0,2M pH 8,0 + 0,1%  $\beta$ -Mercaptoetanol, na proporção de 250 $\mu$ L por 100mg de sementes. O material foi homogeneizado em vortex e mantido *overnight* em geladeira, seguido de centrifugação a 14.000 rpm por 60 minutos em temperatura de 4 °C.

Para extração da enzima  $\alpha$ -amilase, as sementes foram pré-germinadas em rolo de papel por um período de 70 horas. Após esse período, as raízes e plúmulas foram descartadas e o restante triturado na presença de antioxidante PVP e nitrogênio líquido. Para extração,

foram utilizados 200 mg do macerado das sementes germinadas em 600  $\mu$ L do tampão de extração (Tris-HCl 0.2 M, pH 8.0 + 0.4% PVP).

Os géis foram preparados para cada enzima segundo metodologias propostas por Alfenas (2006). A corrida eletroforética foi feita em géis de poliacrilamida a 7,5% (gel separador) e 4,5% (gel concentrador) e, para  $\alpha$ -amilase, foi acrescentado 0,5% de amido. O sistema gel/eletrodo utilizado foi o Tris-glicina pH 8,9. Foram aplicados 50  $\mu$ L do sobrenadante das amostras no gel e a corrida eletroforética foi efetuada em voltagem de 150 V por 6 horas.

### **3.4 Estatística e interpretação dos dados**

A análise dos resultados dos testes de avaliação da qualidade fisiológica foi feita considerando um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x4x4, sendo dois híbridos, quatro tratamentos químicos e quatro períodos de armazenamento. Os dados referentes à qualidade fisiológica das sementes foram submetidos à análise de variância e suas médias comparadas a 5% de probabilidade pelo teste Tukey. Dados quantitativos de período de armazenamento foram submetidos a análise por regressão. A análise estatística foi realizada por meio do software Sisvar (FERREIRA, 2011). Para confecção dos gráficos foi utilizado o software SigmaPlot<sup>®</sup> (2014).

Os dados de expressão enzimática foram interpretados com base na análise qualitativa dos géis de eletroforese, levando-se em consideração a presença/ausência e intensidade de cada uma das bandas eletroforéticas. Como auxílio para interpretação dos resultados dos géis, foi utilizado o software de análise de imagens ImageJ<sup>®</sup> (SCHNEIDER et al., 2012).

#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O resumo da análise de variância para os testes de qualidade fisiológica realizados no trabalho se encontra na Tabela 1. Foi observada interação tripla entre híbridos, tempo de armazenamento e tratamentos químicos para as variáveis primeira contagem da germinação (PCG), germinação (GE), teste do frio sem solo (TF) e envelhecimento acelerado (EA). Para emergência de plântulas em ambiente controlado (EM), houve interação significativa entre híbridos e tempo de armazenamento.

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.

FV	GL	QM			
		PCG <sup>1</sup>	GE	TF	EM
HÍBRIDO	1	1835,17**	422,92**	3923,50**	210,12**
TEMPO	3	6534,42**	139,36**	502,54**	44,54**
TRAT.	3	825,29**	3,82 <sup>NS</sup>	207,37**	3,87 <sup>NS</sup>
H x TEMPO	3	207,02**	100,58**	468,77**	25,04*
H x TRAT	3	119,86**	5,60 <sup>NS</sup>	153,58**	11,20 <sup>NS</sup>
TEMPO x TRAT	9	304,39**	10,07*	103,24**	7,18 <sup>NS</sup>
H x TEMPO x TRAT	9	238,48**	9,48*	87,53**	13,12 <sup>NS</sup>
Erro	96	19,03	4,51	12,08	7,31
Total	127				
Média		85,56	96,43	91,06	96,84
CV (%)		5,10	2,20	3,82	2,79

<sup>1</sup>PCG: primeira contagem da germinação; GE: germinação final; TF: teste do frio sem solo; EM: emergência em ambiente controlado.

<sup>NS</sup> não significativo; \* significativo a 1%; \*\* significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

Fonte: Do autor (2019).

Analisando a primeira contagem da germinação (TABELA 2), observa-se redução das médias ao longo do armazenamento para os dois híbridos testados, com menores valores observados a partir dos seis meses de armazenamento. Esta queda nas médias ao longo do tempo corrobora com os resultados obtidos por Deuner et al. (2014), que observaram uma intensa redução na primeira contagem de germinação de sementes de milho a partir dos 120 dias de armazenamento. Com o aumento do período de armazenamento é esperada uma redução na qualidade fisiológica de sementes em decorrência da deterioração (CORADI et al., 2015).

Para o híbrido 2B647PW, o tratamento com tiametoxam se difere estatisticamente dos demais tratamentos a partir do terceiro mês de armazenamento, levando às menores médias

observadas. O tratamento com tiametoxam também foi responsável pelo menor desempenho germinativo das sementes do híbrido SHS4070 aos seis meses de armazenamento. Alguns trabalhos comprovam o efeito deletério do tiametoxam em sementes armazenadas por longos períodos (DEUNER et al., 2014; TONIN et al., 2014). Os efeitos danosos de inseticidas sobre as sementes são percebidos na medida em que se acentua o processo de deterioração, devido a ocorrência de falhas nos mecanismos de defesas das plantas (BASHIR et al., 2007).

No nono mês, a clotianidina se equiparou ao tratamento com tiametoxam, rendendo as menores médias observadas para o híbrido 2B647PW durante o período. Antes disso, os tratamentos com clotianidina não apresentaram desempenho pior ao das testemunhas, concordando com os resultados obtidos por Delian et al. (2016), que avaliando a germinação de sementes de milho tratadas com clotianidina e armazenadas por 90 dias, não observaram efeito fitotóxico do ingrediente ativo.

Os tratamentos com fipronil nas sementes dos híbridos 2B647PW e SHS4070 não diferiram da testemunha ao longo do tempo de armazenamento.

Tabela 2 - Valores da primeira contagem da germinação (PCG) em sementes dos híbridos de milho 2B647PW e SHS4070, submetidas a diferentes tratamentos químicos e períodos de armazenamento.

Híbrido	Tratamento	Tempo de armazenamento (meses)			
		0	3	6	9
2B647PW	P <sup>1</sup>	97 aA	87 bA	60 cA	90 abA
	PC	99 aA	91 aA	67 bA	71 bC
	PT	98 aA	81 bB	51 cB	78 bBC
	PF	99 aA	93 aA	61 cA	83 bAB
SHS 4070	P	99 aA	99 aA	87 bA	93 abA
	PC	98 aA	94 aA	70 bB	91 aA
	PT	97 aA	94 abA	40 cC	88 bA
	PF	99 aA	96 aA	87 bA	94 abA

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

<sup>1</sup>P: tratamento padrão; PC: tratamento padrão + clotianidina; PT: tratamento padrão + tiametoxam; PF: tratamento padrão + fipronil.

Fonte: Do autor (2019).

Observa-se para as sementes do híbrido 2B647PW, redução da capacidade germinativa ao longo do armazenamento, sendo que os tratamentos com os inseticidas clotianidina (PC) e fipronil (PF), diferiram da testemunha, propiciando os menores valores de germinação aos nove meses (TABELA 3). Mesmo assim, os valores não são menores do que o limite permitido para a comercialização de sementes híbridas de milho no país, que é de 85% de germinação (BRASIL, 2013). Espíndola et al. (2018), investigando a influência de

diferentes inseticidas sobre a qualidade fisiológica e crescimento de plântulas de milho, obtiveram a menor porcentagem de germinação do estudo para aquelas sementes tratadas com fipronil.

Como observado por Lorenzetti et al. (2014), inseticidas adicionados às sementes podem ocasionar efeitos latentes desfavoráveis à qualidade das mesmas e estes efeitos se intensificam com o prolongamento do tempo de armazenamento. O híbrido SHS 4070 não apresentou mudanças no comportamento germinativo, mantendo valores semelhantes àqueles observados no início do armazenamento. Assim como neste presente trabalho, Tonin et al. (2014) também observaram respostas diferentes entre híbridos de milhos, e concluíram que a qualidade das sementes de milho tratadas com inseticidas e armazenadas é influenciada não só pelo produto químico utilizado e condições de armazenamento, mas também pelo híbrido.

Tabela 3 - Valores de germinação (GE) em sementes dos híbridos de milho 2B647PW e SHS4070, submetidas a diferentes tratamentos químicos e períodos de armazenamento.

Híbrido	Tratamento	Tempo de armazenamento (meses)			
		0	3	6	9
2B647PW	P <sup>1</sup>	97 aA	95 abA	92 bA	94 abA
	PC	99 aA	97 aA	92 bA	86 cC
	PT	98 aA	98 aA	93 bA	91 bAB
	PF	99 aA	97 abA	95 bA	89 cBC
SHS 4070	P	100 aA	98 aA	98 aA	98 aA
	PC	99 aA	98 aA	98 aA	98 aA
	PT	97 aA	98 aA	98 aA	98 aA
	PF	100 aA	98 aA	98 aA	98 aA

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

<sup>1</sup>P: tratamento padrão; PC: tratamento padrão + clotianidina; PT: tratamento padrão + tiametoxam; PF: tratamento padrão + fipronil.

Fonte: Do autor (2019).

Mudanças no vigor das sementes do híbrido 2B647PW também foram observadas através do teste de frio sem solo (TABELA 4). As menores médias são encontradas a partir do sexto mês de armazenamento, assim como observadas para a primeira contagem da germinação. Esta redução aos seis meses, seguida de um aumento nas médias aos nove meses, pode ser explicada pelo comportamento da enzima  $\alpha$ -amilase. Conforme observado a partir dos perfis eletroforéticos da enzima (FIGURAS 3 e 4), aos seis meses há aumento de sua expressão, estimulada possivelmente pelo aumento da umidade relativa no ambiente em que as sementes estavam armazenadas (GRÁFICO 1). Com o aumento na expressão da enzima se espera um acréscimo na atividade amilolítica, levando ao aumento da capacidade germinativa.

Tabela 4 - Valores para teste de frio sem solo (TF) em sementes dos híbridos de milho 2B647PW e SHS4070, submetidas a diferentes tratamentos químicos e períodos de armazenamento.

Híbrido	Tratamento	Tempo de armazenamento (meses)			
		0	3	6	9
2B647PW	P <sup>1</sup>	93 aA	95 aA	89 aA	82 bB
	PC	95 aA	86 bB	79 cB	95 aA
	PT	95 aA	89 aAB	70 bC	75 bC
	PF	92 aA	91 aAB	73 bBC	67 bD
SHS 4070	P	97 aA	97 aA	95 aA	96 aA
	PC	99 aA	94 aA	97 aA	98 aA
	PT	99 aA	98 aA	97 aA	98 aA
	PF	94 aA	93 aA	95 aA	95 aA

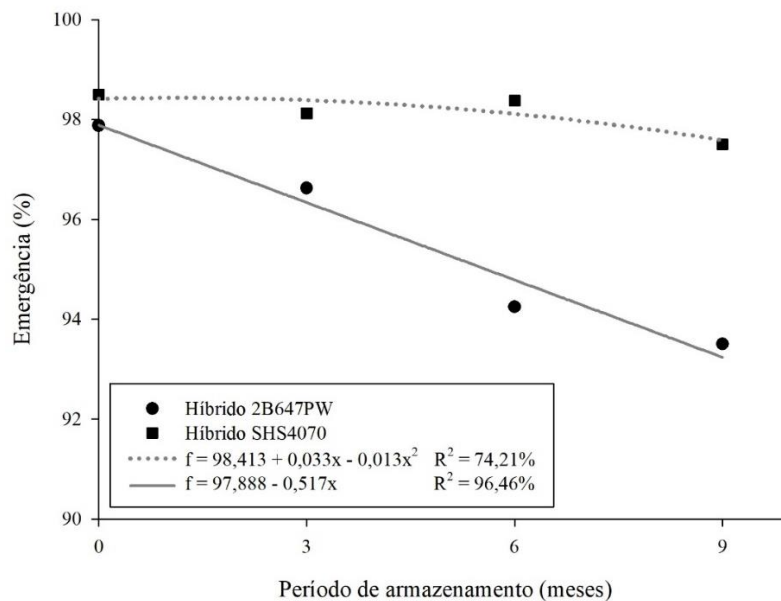
Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha, dentro de cada um dos híbridos, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

<sup>1</sup>P: tratamento padrão; PC: tratamento padrão + clotianidina; PT: tratamento padrão + tiametoxam; PF: tratamento padrão + fipronil.

Fonte: Do autor (2019).

Para o híbrido 2B647PW, constatou-se redução linear da emergência ao longo do período de armazenamento (GRÁFICO 2). Para o híbrido SHS4070, a tendência também foi de redução da emergência durante o armazenamento. Estes resultados estão de acordo com os observados para os demais testes de qualidade fisiológica realizados no trabalho. O aumento no tempo em que as sementes ficam armazenadas leva à redução da qualidade fisiológica destas, devido aos eventos deteriorativos (DAN et al., 2010; DEUNER et al., 2014).

Gráfico 2 - Valores de emergência para os híbridos de milho 2B647PW e SHS4070 submetidos a diferentes períodos de armazenamento.



Fonte: Do autor (2019).

O crescimento de fungos nas sementes dos dois híbridos não foi completamente inibido pelos fungicidas presentes na calda padrão dos tratamentos (TABELA 5). Além disso, não se observou influência dos inseticidas adicionados à calda sobre a eficiência de controle dos fungicidas.

Tabela 5 - Valores médios percentuais da incidência de fungos encontrados em sementes dos híbridos de milho 2B647PW (H1) e SHS4070 (H2), submetidas a diferentes tratamentos químicos e períodos de armazenamento.

Período (meses)	Tratamento	Fungo (%)					
		<i>Fusarium</i> spp.		<i>Penicillium</i> spp.		<i>Aspergillus</i> spp.	
		H1	H2	H1	H2	H1	H2
0	P <sup>1</sup>	71,5	56,5	21,0	19,5	3,5	11,0
	PC	57,0	53,5	17,5	5,5	1,0	20,0
	PT	44,5	29,0	12,0	7,5	1,0	22,5
	PF	42,0	54,0	25,0	13,0	4,5	19,5
3	P	95,0	23,5	28,0	15,0	2,5	28,5
	PC	86,0	13,0	41,0	12,0	1,5	17,0
	PT	78,0	15,0	23,0	11,5	4,0	24,5
	PF	97,5	97,0	88,0	46,0	4,0	19,0
6	P	0,5	0,0	6,0	8,5	8,0	5,0
	PC	0,0	0,0	0,0	6,0	6,0	10,0
	PT	0,0	0,0	5,0	11,5	2,5	15,0
	PF	0,0	0,0	6,5	1,0	2,5	9,5
9	P	0,0	0,0	1,5	0,5	2,5	7,0
	PC	0,5	0,0	0,0	0,5	0,0	2,5
	PT	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5	8,0
	PF	2,0	0,0	0,0	2,0	0,0	11,5

<sup>1</sup>P: tratamento padrão; PC: tratamento padrão + clotianidina; PT: tratamento padrão + tiametoxam; PF: tratamento padrão + fipronil.

Fonte: Do autor (2019).

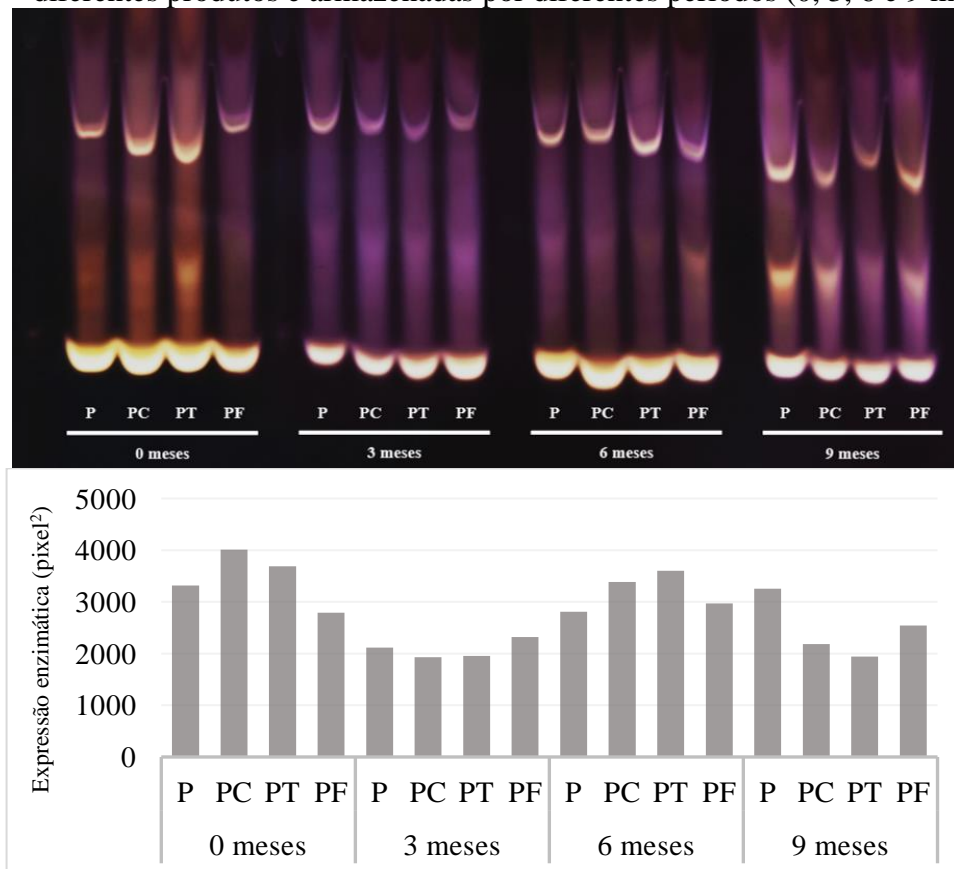
Uma alta incidência de microrganismos nas sementes foi verificada durante os três primeiros meses de armazenamento, com destaque para *Fusarium* spp. que chegou a apresentar incidência de 97,5%. *Fusarium* spp. é um gênero de fungos com crescimento rápido e agressivo, afetam a qualidade de sementes podendo causar a morte antes mesmo da germinação (MENTEN, 1995). Embora sejam transmitidos para as sementes, são considerados fungos de campo, levam à redução do estande de plantas por afetar a germinação e crescimento de plântulas (KUHNEM JÚNIOR et al., 2013).

Antonello et al. (2009), trabalhando com sementes de milho, notaram uma crescente incidência de *Fusarium* spp. até o sexto mês de armazenamento. Para este mesmo período, também foi observado aumento da incidência de fungos do gênero *Aspergillus* spp. *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. são considerados fungos de armazenamento, sendo

utilizados como indicadores da deterioração em sementes e grãos, pois podem causar alterações na composição química e perda de matéria seca dos materiais (MALLMANN et al., 1994). Neste trabalho, os fungos *Penicillium* spp. e *Aspergillus* spp. permaneceram por mais tempo nas sementes em comparação ao *Fusarium* spp. Essa variação na incidência fúngica é justamente devido ao fato de os primeiros serem classificados como fungos de armazenamento, sobrevivendo e desenvolvendo sob condições de armazenamento (PEZZINI et al., 2005).

Em relação ao efeito do armazenamento pós-tratamento de sementes de milho, houve redução na expressão da enzima  $\alpha$ -amilase para os dois híbridos aos nove meses de armazenamento (FIGURAS 3 e 4). Esta enzima atua na hidrólise do amido contido no endosperma, liberando energia necessária para processos como a germinação. A redução em sua expressão ao nono mês de armazenamento é condizente com os resultados de germinação obtidos para esse mesmo período de tempo, onde também houve redução na qualidade (TABELAS 2 e 3).

Figura 3 - Expressão da enzima  $\alpha$ -amilase em sementes do híbrido 2B647PW, tratadas com diferentes produtos e armazenadas por diferentes períodos (0, 3, 6 e 9 meses).

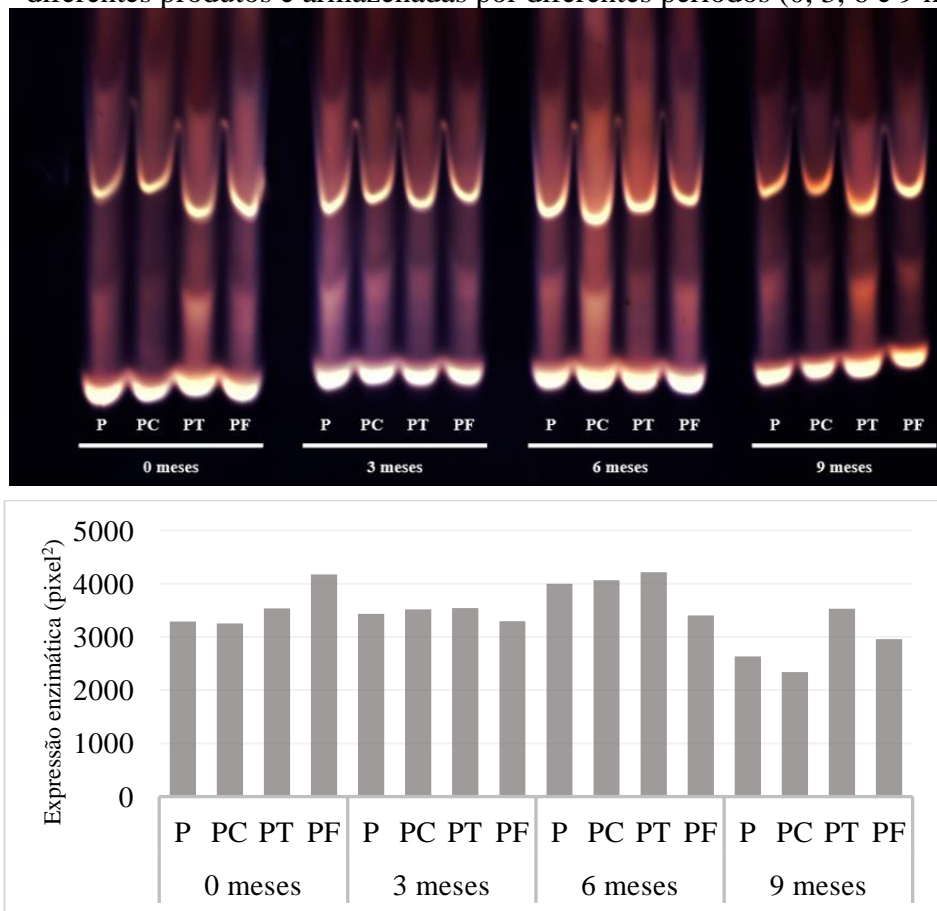


Legenda: P: tratamento padrão; PC: padrão + clotianidina; PT: padrão + tiametoxam; PF: padrão + fipronil).

Fonte: do autor (2019).

Pesquisas comprovam que a  $\alpha$ -amilase está diretamente ligada à qualidade fisiológica de sementes de milho. Assim como neste trabalho, Oliveira et al. (2013) observaram reduzida expressão da enzima em sementes de milho de menor qualidade fisiológica. Essa situação também foi observada por Timóteo e Marcos-Filho (2013), em sementes de diferentes híbridos. Dentre as mudanças que ocorrem com o avanço da deterioração, estão alterações na camada de aleurona, levando à redução da síntese de  $\alpha$ -amilase (GANGULI; SENMANDI, 1993).

Figura 4 - Expressão da enzima  $\alpha$ -amilase em sementes do híbrido SHS4070, tratadas com diferentes produtos e armazenadas por diferentes períodos (0, 3, 6 e 9 meses).



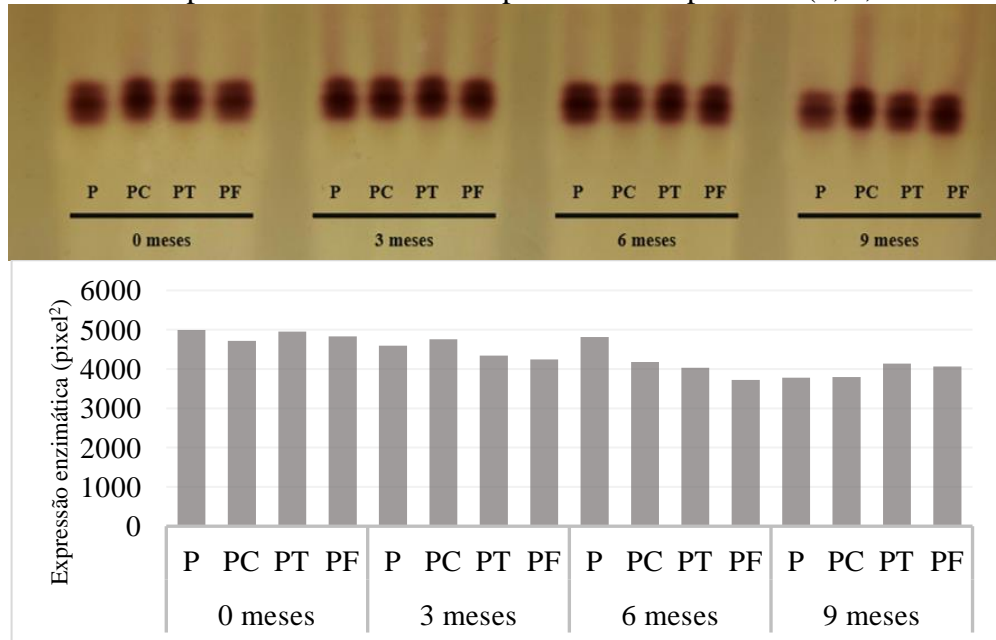
Legenda: P: tratamento padrão; PC: padrão + clotianidina; PT: padrão + tiametoxam; PF: padrão + fipronil).

Fonte: do autor (2019).

De modo geral, não houve mudanças na expressão da enzima esterase para os dois híbridos estudados (FIGURAS 5 e 6). Em contraste a estes resultados, Ferreira et al. (2015) observaram acréscimo na expressão da enzima em sementes de milho com maior grau de deterioração. Por sua função na hidrólise de ésteres e metabolismo de lipídios, um aumento

em sua expressão pode promover desestabilização de membranas através da ação nas camadas lipídicas, o que acelera o processo de deterioração (VIEIRA et al., 2006).

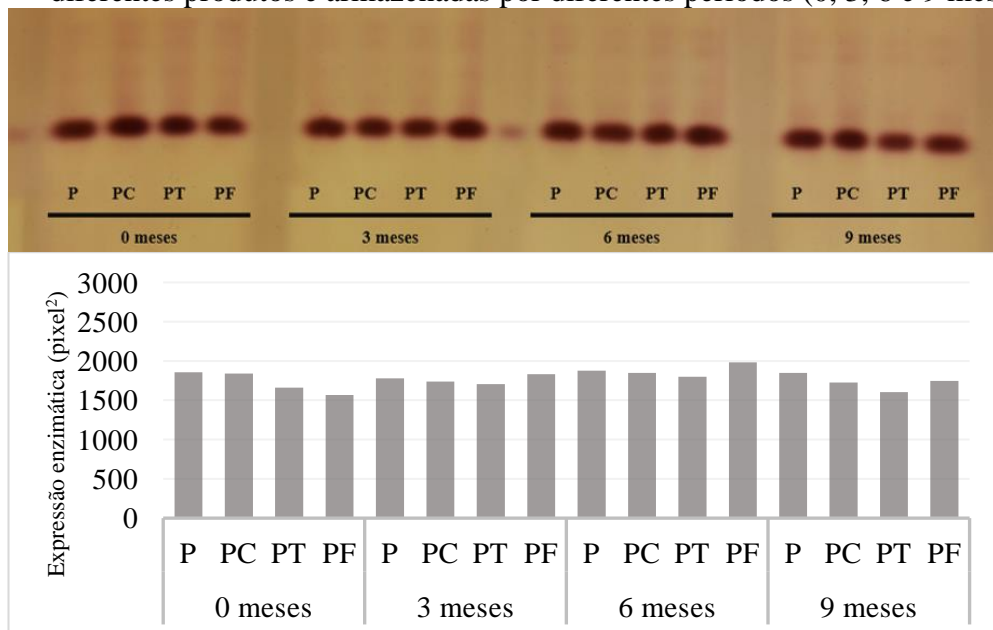
Figura 5 - Expressão da enzima esterase em sementes do híbrido 2B647PW, tratadas com diferentes produtos e armazenadas por diferentes períodos (0, 3, 6 e 9 meses).



Legenda: P: tratamento padrão; PC: padrão + clotianidina; PT: padrão + tiametoxam; PF: padrão + fipronil).

Fonte: do autor (2019).

Figura 6 - Expressão da enzima esterase em sementes do híbrido SHS4070, tratadas com diferentes produtos e armazenadas por diferentes períodos (0, 3, 6 e 9 meses).

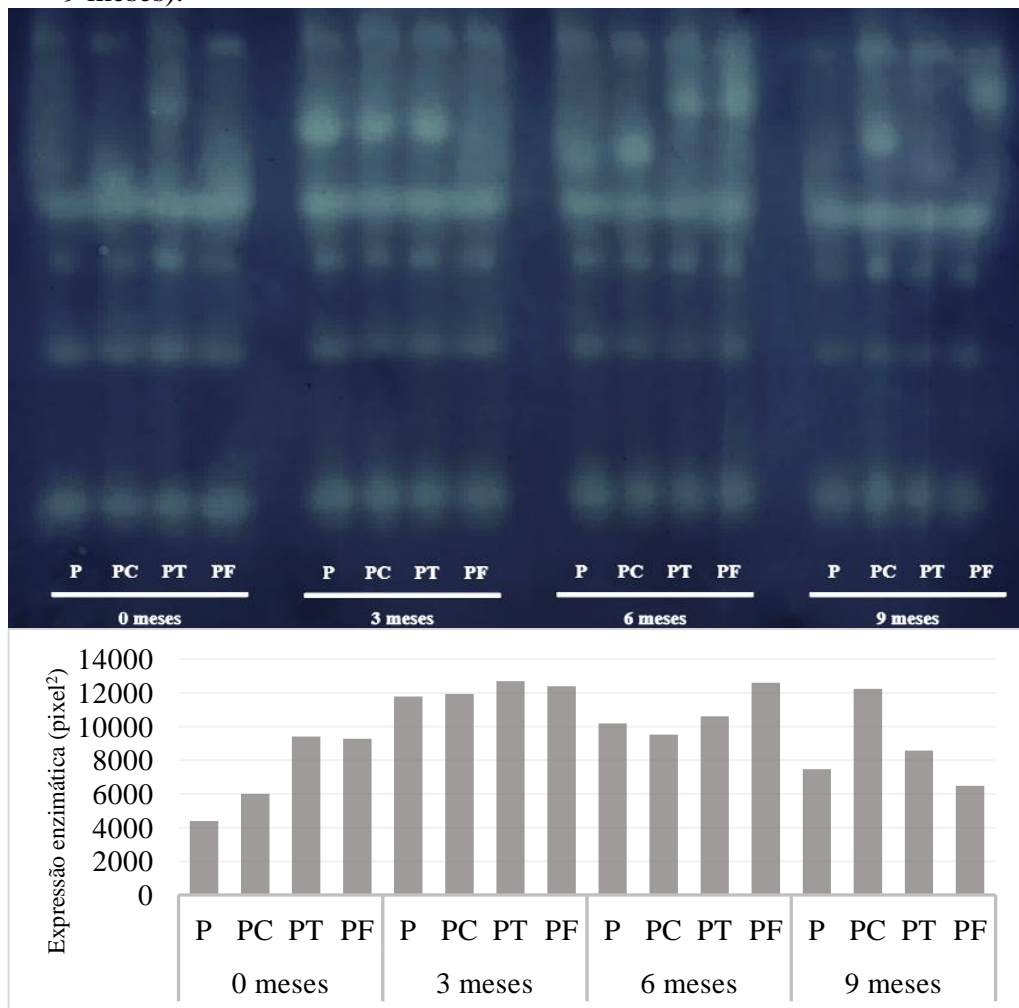


Legenda: P: tratamento padrão; PC: padrão + clotianidina; PT: padrão + tiametoxam; PF: padrão + fipronil).

Fonte: do autor (2019).

Para o híbrido 2B647PW, no início do armazenamento há aumento da expressão da enzima superóxido dismutase (SOD) para os tratamentos com adição de inseticidas (FIGURA 7). Esse comportamento do híbrido também é notado para a enzima catalase (CAT) (FIGURA 8), ambas são enzimas relacionadas com o estresse oxidativo e atuam protegendo as células contra a ação de espécies reativas de oxigênio (SERKEDJIEVA, 2010). A expressão dessas enzimas se manteve alta até os 6 meses de armazenamento, e pode ser interpretada como uma tentativa de defesa das células contra os radicais livres e moléculas formados devido a exposição aos inseticidas e deterioração fisiológica. Quando expostos a inseticidas, tecidos vegetais podem responder com incremento na produção de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e outras espécies reativas de oxigênio (BASHIR et al., 2007; SHAKIR et al., 2018).

Figura 7 - Expressão da enzima superóxido dismutase em sementes do híbrido 2B647PW, tratadas com diferentes produtos e armazenadas por diferentes períodos (0, 3, 6 e 9 meses).



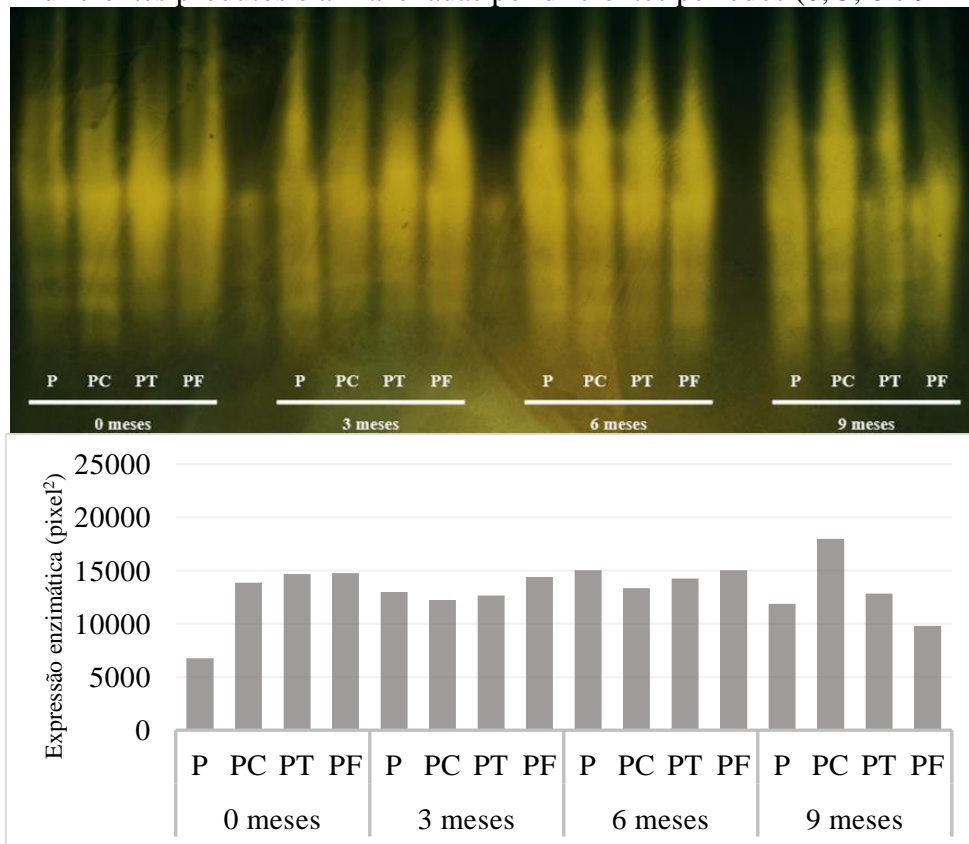
Legenda: P: tratamento padrão; PC: padrão + clotianidina; PT: padrão + tiametoxam; PF: padrão + fipronil).

Fonte: do autor (2019).

Aos nove meses, de modo geral, pode ser observada uma queda na expressão das enzimas, o que pode ser respondido pelo avanço da deterioração das sementes. Quando os sistemas de proteção da planta já não conseguem deter a formação e ação de compostos tóxicos, é comum observar decréscimo na atividade enzimática e inativação de enzimas devido aos danos estruturais causados (BASHIR et al., 2007). Este comportamento está de acordo com aquele encontrado por Abreu et al. (2013) que observaram queda na expressão da enzima SOD em sementes com estado deteriorativo avançado. Ao tratar sementes de soja com o inseticida deltametrina, Bashir et al. (2007) observaram queda na atividade da enzima catalase.

Os padrões eletroforéticos obtidos reforçam os resultados encontrados nos testes de qualidade fisiológica para o híbrido 2B647PW, sugerindo 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 em questão.

Figura 8 - Expressão da enzima catalase em sementes do híbrido 2B647PW, tratadas com diferentes produtos e armazenadas por diferentes períodos (0, 3, 6 e 9 meses).

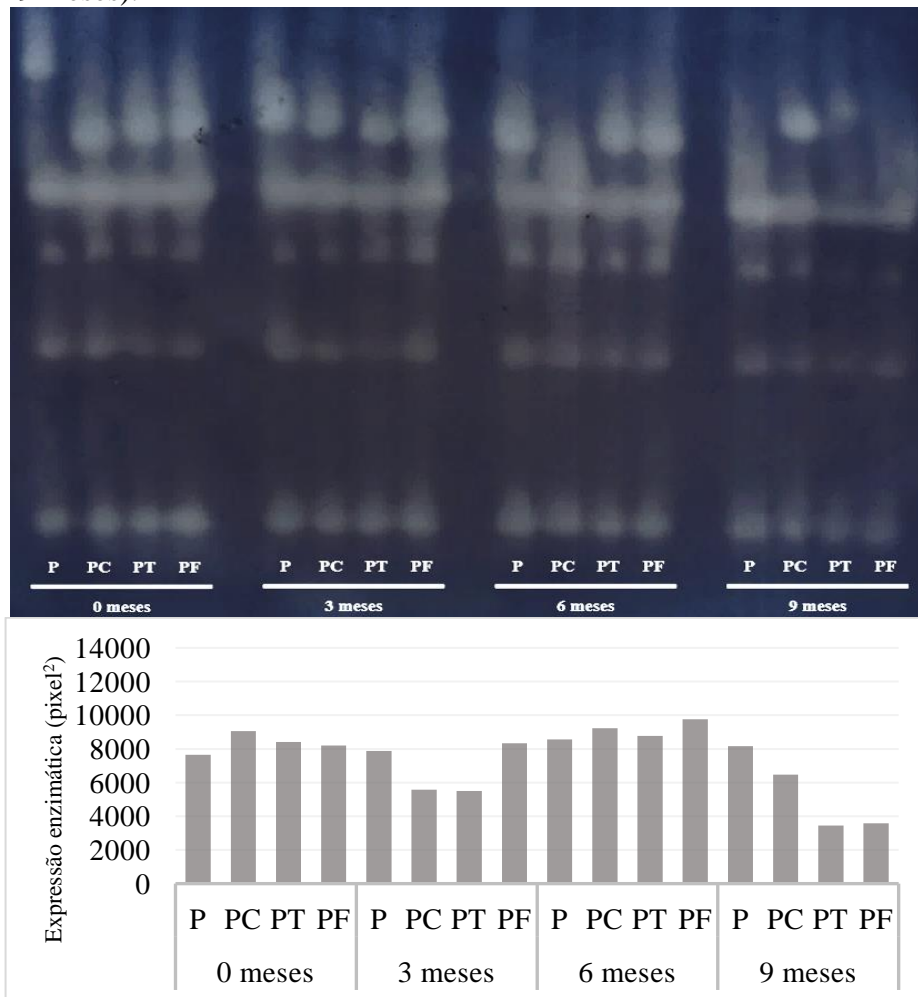


Legenda: P: tratamento padrão; PC: padrão + clotianidina; PT: padrão + tiametoxam; PF: padrão + fipronil).

Fonte: do autor (2019).

Para o híbrido SHS4070, também houve redução na expressão das enzimas SOD e CAT aos nove meses de armazenamento (FIGURAS 9 e 10). Neste caso, o observado contraria os resultados encontrados para germinação (GE) e teste do frio (TF), onde o híbrido manteve comportamento semelhante ao longo 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 visualizar decréscimos em parâmetros como germinação e vigor (MARCOS-FILHO, 2015). Spinola et al. (2000) concluíram que alterações eletroforéticas em algumas das isoenzimas estudadas, foram mais efetivas em indicar o estado deteriorativo das sementes do que os testes de qualidade fisiológica utilizados. Essa maior sensibilidade à deterioração credencia as enzimas como bons marcadores moleculares para monitorar e caracterizar a qualidade de sementes.

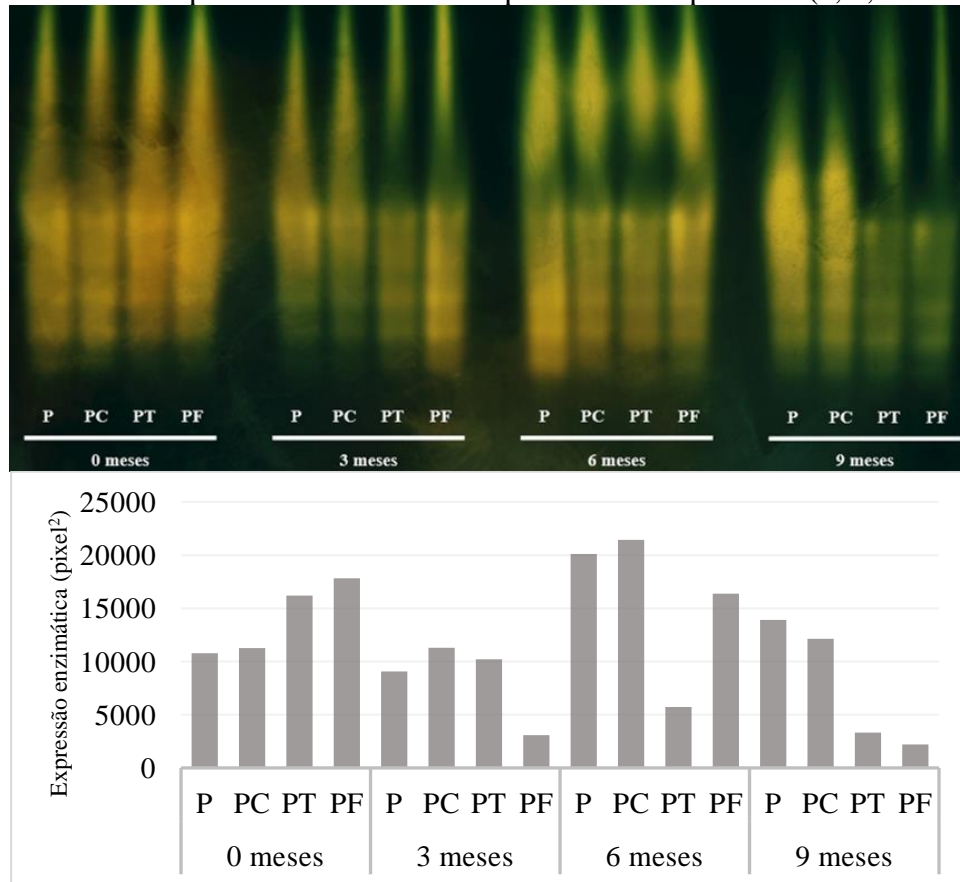
Figura 9 - Expressão da enzima superóxido dismutase em sementes do híbrido SHS4070, tratadas com diferentes produtos e armazenadas por diferentes períodos (0, 3, 6 e 9 meses).



Legenda: P: tratamento padrão; PC: padrão + clotianidina; PT: padrão + tiametoxam; PF: padrão + fipronil).

Fonte: do autor (2019).

Figura 10 - Expressão da enzima catalase em sementes do híbrido SHS4070, tratadas com diferentes produtos e armazenadas por diferentes períodos (0, 3, 6 e 9 meses).



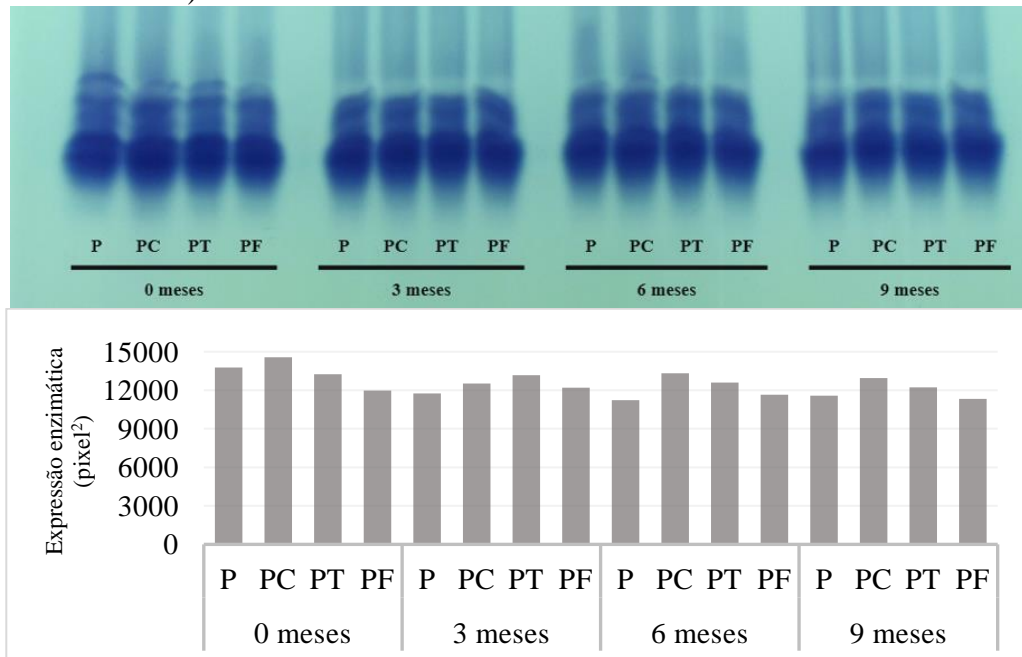
Legenda: P: tratamento padrão; PC: padrão + clotianidina; PT: padrão + tiametoxam; PF: padrão + fipronil).

Fonte: do autor (2019).

Não foram observadas mudanças no perfil eletroforético da enzima malato desidrogenase para os híbridos testados (FIGURAS 11 e 12). Esta enzima está presente em abundância nas mitocôndrias e citoplasma, participando do ciclo de Krebs e movimento do malato entre compartimentos celulares (TAIZ; ZEIGER, 2013). Geralmente é de natureza constitutiva com atividade não limitante em todas as organelas e citoplasma, o que pode dificultar a visualização de diferenças em sua expressão. Spinola et al. (2000) observaram que em sementes de milho, a atividade da enzima malato desidrogenase foi a menos afetada pelo envelhecimento artificial realizado.

Um eventual aumento em sua expressão está associado ao aumento da respiração, comportamento comum em sementes de baixa qualidade (FERREIRA et al., 2015; TUNES et al., 2014). Ao passo que a deterioração avança e os danos em membranas e organelas se tornam graves, sua atividade pode ser reduzida e sua síntese prejudicada (CAIXETA et al., 2014; CARVALHO et al., 2014).

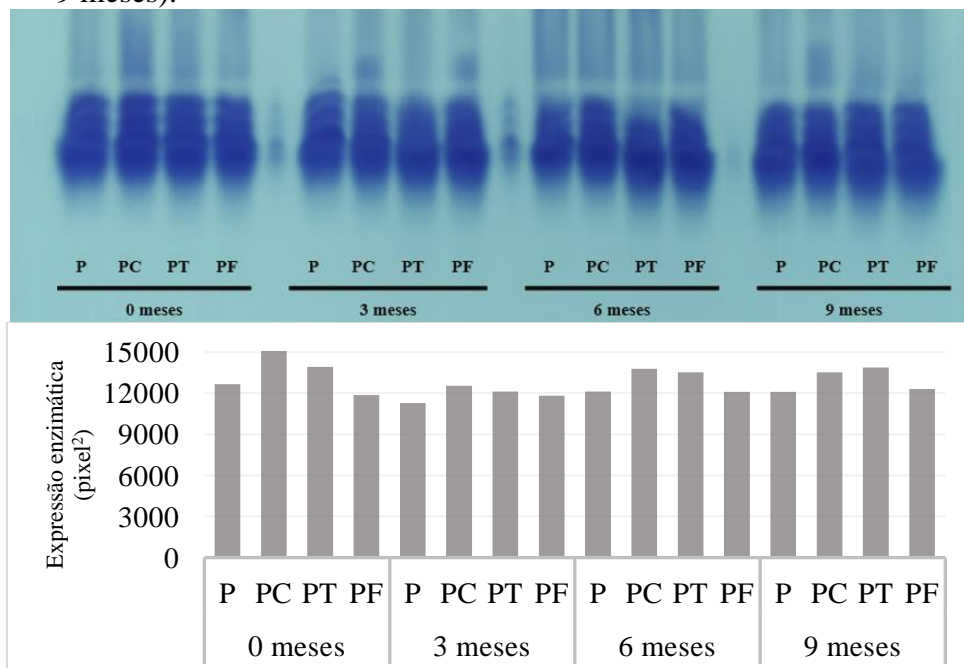
Figura 11 - Expressão da enzima malato desidrogenase em sementes do híbrido 2B647PW, tratadas com diferentes produtos e armazenadas por diferentes períodos (0, 3, 6 e 9 meses).



Legenda: P: tratamento padrão; PC: padrão + clotianidina; PT: padrão + tiametoxam; PF: padrão + fipronil).

Fonte: do autor (2019).

Figura 12 - Expressão da enzima malato desidrogenase em sementes do híbrido SHS4070, tratadas com diferentes produtos e armazenadas por diferentes períodos (0, 3, 6 e 9 meses).

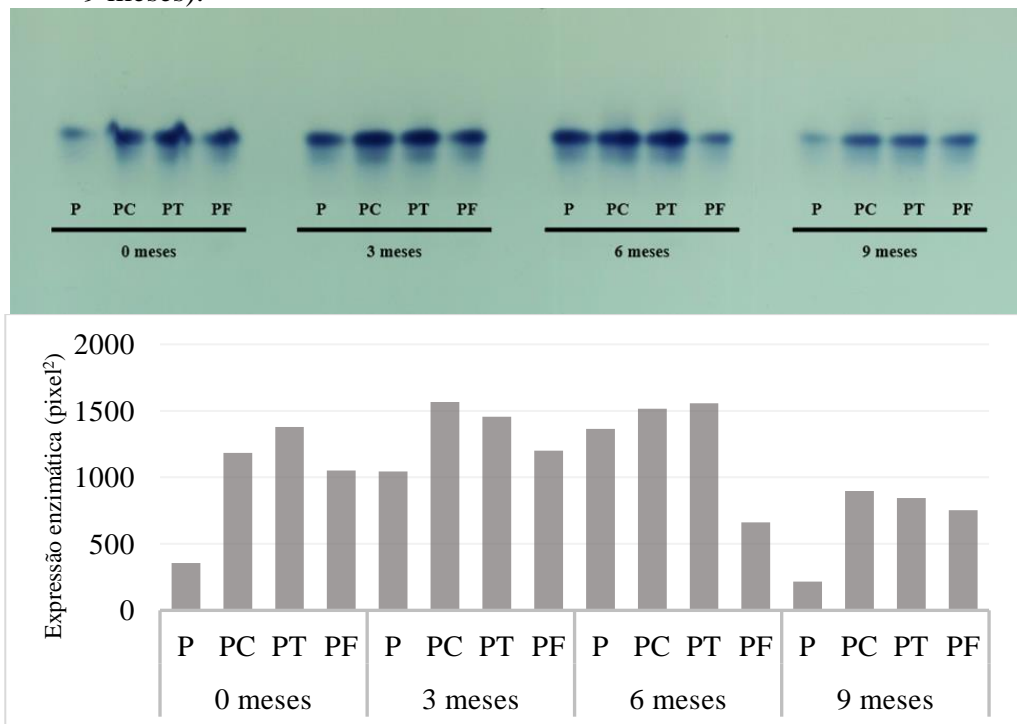


Legenda: P: tratamento padrão; PC: padrão + clotianidina; PT: padrão + tiametoxam; PF: padrão + fipronil).

Fonte: do autor (2019).

A enzima álcool desidrogenase (ADH) apresentou maior intensidade das bandas para aqueles tratamentos com adição do inseticida clotianidina, em todos os tempos de armazenamento (FIGURAS 13 e 14). Esta condição é melhor observada para o híbrido SHS4070. Uma possível explicação para tal comportamento seria um maior efeito tóxico desse inseticida às sementes em comparação aos demais, acelerando a deterioração, o que aumentou a respiração das mesmas. Trabalhos demonstram que enzimas respiratórias como a ADH são ativadas com maior intensidade em sementes de baixa qualidade pelo aumento da respiração (GALVÃO et al. 2014; SANTOS et al., 2005).

Figura 13 - Expressão da enzima álcool desidrogenase em sementes do híbrido 2B647PW, tratadas com diferentes produtos e armazenadas por diferentes períodos (0, 3, 6 e 9 meses).

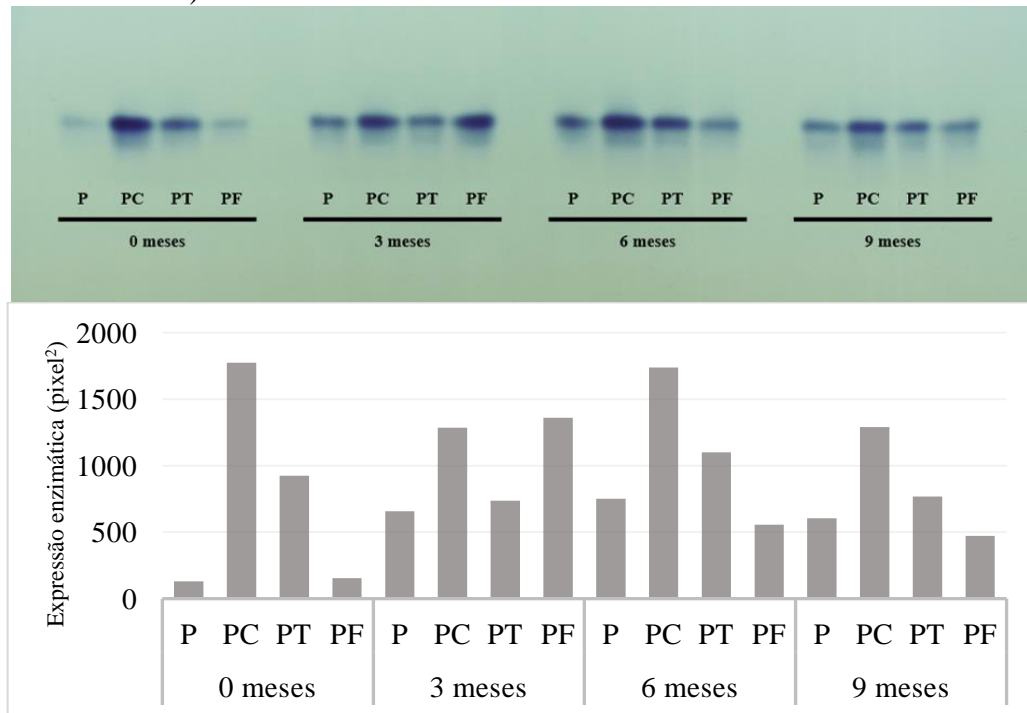


Legenda: P: tratamento padrão; PC: padrão + clotianidina; PT: padrão + tiametoxam; PF: padrão + fipronil).

Fonte: do autor (2019).

Em determinadas situações, a atividade da ADH também pode ser interpretada como benéfica à longevidade de sementes, já que esta possui função na conversão de acetaldeído em etanol, um composto menos tóxico do que o primeiro, reduzindo eventos deteriorativos (VEIGA et al., 2010). Trabalhando com soja, Carvalho et al. (2014) relacionaram a maior expressão da enzima, com melhor conservação da qualidade fisiológica das sementes.

Figura 14 - Expressão da enzima álcool desidrogenase em sementes do híbrido SHS4070, tratadas com diferentes produtos e armazenadas por diferentes períodos (0, 3, 6 e 9 meses).



Legenda: P: tratamento padrão; PC: padrão + clotianidina; PT: padrão + tiametoxam; PF: padrão + fipronil).

Fonte: do autor (2019).

Assim como observado para as enzimas  $\alpha$ -amilase, superóxido dismutase e catalase, também houve redução evidente da expressão da ADH no nono mês de armazenamento, para todos os tratamentos químicos e híbridos. Assim como discutido para as outras enzimas, pode-se associar essa redução ao avanço da deterioração fisiológica das sementes. A queda na expressão destas enzimas está em consonância com os resultados obtidos pelos testes de qualidade fisiológica, indicando a possibilidade de uso de análises enzimáticas para estudo do estado de qualidade de sementes.

## 5 CONCLUSÕES

A qualidade de sementes de milho tratadas com inseticidas e armazenadas varia conforme produto utilizado, período de armazenamento e híbrido.

O tratamento com tiametoxam reduz a qualidade fisiológica de sementes dos híbridos avaliados a partir dos três meses de armazenamento.

O tratamento com os inseticidas clotianidina, tiametoxam e fipronil reduz a qualidade fisiológica das sementes do híbrido 2B647PW aos nove meses de armazenamento.

O tratamento das sementes com os inseticidas clotianidina, tiametoxam e fipronil reduz a expressão das enzimas  $\alpha$ -amilase, superóxido dismutase, catalase aos nove meses de armazenamento.

As enzimas  $\alpha$ -amilase, superóxido dismutase, catalase e álcool desidrogenase são bons marcadores do estado de qualidade de sementes híbridas de milho durante o armazenamento.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, L.A.D.S.; CARVALHO, M.L.M.D.; PINTO, C.A.G.; KATAOKA, V.Y.; SILVA, T. T.D.A. Deterioration of sunflower seeds during storage. **Journal of Seed Science**, [s.l.], v. 35, n. 2, p. 240-247, 2013.
- 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. Viçosa: UFV, 2006. p. 627.
- ANTONELLO, L.M.; MUNIZ, M.B.; BRAND, S.C.; VIDA, M.D.; GARCIA, D.; RIBEIRO, L.; SANTOS, V. Qualidade de sementes de milho armazenadas em diferentes embalagens. **Ciência Rural**, [s.l.], v.39, n.7, p. 2191-2194, 2009.
- 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.
- BAILLY, C. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. **Seed Science Research**, [s.l.], v. 14, n. 2, p. 93-107, 2004.
- BARBEDO, C.J.; MARCOS FILHO, J. Tolerância à dessecação em sementes. **Acta Botanica Brasilica**, [s.l.], v. 12, n. 2, p. 145-164, 1998.
- 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.
- BARROS, A.S.R. Teste de frio. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. (Ed.) **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. p. 5.1-5.12.
- 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.

BASS, C.; DENHOLM, I.; WILLIAMSON, M.S.; NAUEN, R. The global status of insect resistance to neonicotinoid insecticides. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, [s.l.], v. 121, p. 78-87, 2015.

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

BLACQUIERE, T.; SMAGGHE, G.; VAN GESTEL, C.A.; MOMMAERTS, V. Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. **Ecotoxicology**, [s.l.], v. 21, n. 4, p. 973-992, 2012.

BOBÉ, A.; COOPER, J.F.; COSTE, C.M.; MULLER, M.A. Behavior of Fipronil in Soil under Sahelian Plain Field Conditions. **Pestic Sci.**, [s.l.], v.52, p.275-281, 1998.

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 fev. 2019.

\_\_\_\_\_. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução normativa nº 45, de 17 de setembro de 2013**. Diário Oficial da União, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, DF, 18 set. 2013, Seção I, p.13.

\_\_\_\_\_. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de Análise Sanitária de Sementes**. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: MAPA, SDA, ACS, 2009a. 200 p.

\_\_\_\_\_. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para Análise de Sementes**. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: MAPA, SDA, ACS, 2009b, 395 p.

BRAY, E.A.; BAILEY-SERRES, J.; WERETILNYK, E. Responses to abiotic stresses. In: BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W. In: BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. (Ed.). **Biochemistry and molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. p.1158-1203.

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.

BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2015. 1264 p.

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.

- CAIXETA, F.; VON PINHO, E.V.D.R.; GUIMARÃES, R.M.; PEREIRA, P.H.A.R.; CATÃO, H.C.R. M.; CLEMENTE, A.D.C.S. Determinação do ponto de colheita na produção de sementes de pimenta malagueta e alterações bioquímicas durante o armazenamento e a germinação. **Científica**, [s.l.], v. 42, n. 2, p. 187-197, 2014.
- CALAFIORI, M.H.; BARBIERI, A.A. Effects of seed treatment with insecticide on the germination, nutrients, nodulation, yield and pest control in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) culture. **Ecosistema**, [s.l.], v. 26, n. 1, p. 97–104, 2001.
- CARNEIRO, C.; LIMA, M.M.; DEUNER, S.; DE OLIVEIRA, P.V.; TEIXEIRA, S.B.; SOUSA, C.P.; DE MORAES, D.M. Atividade antioxidante e viabilidade de sementes de girassol após estresse hídrico e salino. **Revista Brasileira de Sementes**, [s.l.], v. 33, n. 4, 2011.
- 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**, [s.l.], v. 49, n. 12, p. 967-976, 2014.
- CARVALHO, M.L.M.; VIEIRA, M.G.G.C.; PINHO, E.R.V. Técnicas moleculares em sementes. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 3, n. 17, p. 44-47, 2000.
- CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 5. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2012. p.329-349.
- CASTRO, P.R.C.; PITELLI, A.M.C.M.; PERES, L.E.P.; ARAMAKI, P.H. Análise da atividade reguladora de crescimento vegetal de tiametoxam através de biotestes. **Publicatio**, Ponta Grossa, v.13, p. 25-29, 2007.
- CHEN, S.; CHEN, H.; TIAN, J.; WANG, Y.; XING, L. Chemical modification, antioxidant and  $\alpha$ -amylase inhibitory activities of corn silk polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, Amsterdam, v. 98, n. 1, p.428-437, 2013.
- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Levantamento da safra de grãos**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253>>. Acesso em: 20 mar. 2019.
- COPELAND, L.O.; McDONALD, M.B. **Principles of seed science and technology**. 4 ed. New York: Chapman & Hall, 2001. 467p.
- CORADI, P.C.; MILANE, L.V.; CAMILO, L.J.; ANDRADE, M.G.D.O.; LIMA, R.E. Qualidade de grãos de milho após secagem e armazenamento em ambiente natural e resfriamento artificial. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, [s.l.], v. 14, n. 3, p. 420-432, 2015.
- COSKUN, Y.; KILIC, S.; DURAN, R.E. The effects of the insecticide pyriproxyfen on germination, development and growth responses of maize seedlings. **Fresenius Environ Bull**, [s.l.], v. 24, p. 278-284, 2015.

- COULON, M.; SCHURR, F.; MARTEL, A.C.; COUGOULE, N.; BÉGAUD, A.; MANGONI, P.; RIBIÈRE-CHABERT, M. Metabolization of thiamethoxam (a neonicotinoid pesticide) and interaction with the Chronic bee paralysis virus in honeybees. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, [s.l.], v. 144, p. 10-18, 2018.
- CROSTHWAITE, A.J.; BIGOT, A.; CAMBLIN, P.; GOODCHILD, J.; LIND, R.J.; SLATER, R.; MAIENFISCH, P. The invertebrate pharmacology of insecticides acting at nicotinic acetylcholine receptors. **Journal of Pesticide Science**, [s.l.], p. D17-019, 2017.
- 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.
- 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.
- DELIAN, E.; SĂVULESCU, E.; SĂVULESCU, I.; TEBAN, A.M. Insecticides impact on seed germination and early seedlings growth in maize (*Zea mays* L.). Scientific Papers-Series A, **Agronomy**, [s.l.], v. 59, p. 503-508, 2016.
- 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**, [s.l.], v. 36, n. 2, p. 204-212, 2014.
- DINAKAR, C.; DJILIANOV, D.; BARTELS, D. Photosynthesis in desiccation tolerant plants: energy metabolism and antioxidative stress defense. **Plant Science**, [s.l.], v. 182, p. 29-41, 2012.
- DUBAL, I.T.P.; TROYJACK, C.; KOCH, F.; AISENBERG, G.R.; SZARESKI, V.J.; PIMENTEL, J.R.; VILLELA, F.A. Effect of temperature on bean seed germination: vigor and isozyme expression. **Agric Sci Res J**, [s.l.], v. 1, n. 5, p. 0001-0009, 2016.
- 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.
- FAIRBROTHER, A.; PURDY, J.; ANDERSON, T.; FELL, R. Risks of neonicotinoid insecticides to honeybees. **Environmental Toxicology and Chemistry**, [s.l.], v. 33, n. 4, p. 719-731, 2014.
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Faostat – Crops**. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#home>>. Acesso em: 20 mar. 2019.
- FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, [s.l.], v. 35, p. 1039-1042, 2011.

FERREIRA, T.F.; FERREIRA, V.D.F.; OLIVEIRA, J.A.; CARVALHO, M.V D.; MIGUEL, L.D.S. Isoenzyme activity in maize hybrid seeds harvested with different moisture contents and treated. **Journal of Seed Science**, [s.l.], v. 37, n. 2, p. 139-146, 2015.

FISHEL, F.M. **Pesticide Toxicity Profile: Neonicotinoid Pesticides**. IFAS Extension, University of Florida, 2016.

FORD, K.A.; CASIDA, J.E.; CHANDRAN, D.; GULEVICH, A.G.; OKRENT, R.A.; DURKIN, K.A.; WILDERMUTH, M.C. Neonicotinoid insecticides induce salicylate-associated plant defense responses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s.l.], v. 107, n. 41, p. 17527-17532, 2010.

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**, [s.l.], v. 13, n. 1, p. 14-23, 2014.

GANGULI, S.; SENMANDI, S. Effects of ageing on amylase activity and scutellar cell structure during imbibition in wheat seed. **Annals of Botany**, [s.l.], v. 71, n. 5, p. 411-416, 1993.

GOMES JUNIOR, O. **Degradação fotocatalítica do inseticida Fipronil: otimização multivariada, identificação dos produtos de degradação e avaliação da toxicidade**. 2017. 108 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2017.

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.

HORII, P.A.; MCCUE, K. Enhancement of seed vigour following insecticide and phenolic elicitor treatment, **Bioresour. Technol.**, [s.l.], v. 98, p. 623–632, 2007.

JALEEL, C.A.; MANIVANNAN, P.; SANKAR, B.; KISHOREKUMAR, A.; GOPI, R.; SOMASUNDARAM, R.; PANNEERSELVAM, R. Water deficit stress mitigation by calcium chloride in *Catharanthus roseus*: Effects on oxidative stress, proline metabolism and indole alkaloid accumulation. **Colloids and surfaces B: Biointerfaces**, [s.l.], v. 60, n. 1, p. 110-116, 2007.

JESCHKE, P.; NAUEN, R.; SCHINDLER, M.; ELBERT, A. Overview of the status and global strategy for neonicotinoids. **J. Agric. Food Chem**, [s.l.], v. 59, 2897–2908, 2011.

KAGABU, S. Discovery of imidacloprid and further developments from strategic molecular designs. **J. Agric. Food Chem.**, [s.l.], 59, 2887-2896, 2011.

KAYSER, H.; WELLMANN, H.; LEE, C.; DECOCK, A.; GOMES, M.; CHEEK, B.; LIND, R.; BAUR, M.; HATTENSCHWILER, J.; MAIENFISCH, P. Thiamethoxam: high-affinity binding and unusual mode of interference with other neonicotinoids at aphid membranes. In: **ACS symposium series**. Oxford University Press, 2007. p. 67-81.

KILIC, S.; DURAN, R.E.; COSKUN, Y. Morphological and Physiological Responses of Maize (*Zea mays* L.) Seeds Grown under Increasing Concentrations of Chlorantraniliprole Insecticide. **Polish Journal of Environmental Studies**, [s.l.], v. 24, n. 3, 2015.

KLEIN, M.; GEISLER, M.; SUH, S.J.; KOLUKISA OGLU, H.U.; AZEVEDO, L.; PLAZA, S.; CURTIS, M.D.; RICHTER, A.; WEDER, B.; SCHULZ, B. Disruption of AtMRP4, a guard cell plasma membrane ABCC-type ABC transporter, leads to deregulation of stomatal opening and increased drought susceptibility. **The Plant Journal**, [s.l.], v. 39, n. 2, p. 219-236, 2004.

KUHNEM JÚNIOR, P.R.; STUMPF, R.; SPOLTI, P.; MEDEIROS DEL PONTE, E. Características patogênicas de isolados do complexo *Fusarium graminearum* e de *Fusarium verticillioides* em sementes e plântulas de milho. **Ciência Rural**, [s.l.], v. 43, n. 4, 2013.

LI, L.; BLANCO, M.; JAY-LIN, J. Physicochemical properties of endosperm and pericarp starches during maize development. **Carbohydrate Polymers**, Amsterdam, v. 67, n. 4, p. 630-639, 2007.

LI, P.; AKK, G. The insecticide fipronil and its metabolite fipronil sulphone inhibit the rat alpha1beta2gamma2L GABA(A) receptor. **Br J Pharmacol**, [s.l.], v. 155, p. 783-794, 2008.

LOPES, C.A.; CARVALHO, M.L.M.; SANTOS, H.O.; DE ANDRADE, D.B. Importance of amylases for physiological quality in maize seeds. **Biotemas**, [s.l.], v. 30, n. 3, p. 1-7, 2017.

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.

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.

MÄKELÄ, M.R.; JIMÉNEZ BARBOZA, L.A.; DE VRIES, R.P.; HILDÉN, K.S. Production of feruloyl esterases by *Aspergillus* species. **Aspergillus and Penicillium in the post-genomic era**, [s.l.], v. 129, p. 44, 2016.

MALLMANN, C.A.; SANTURIO, J.M.; WENTZ, I. Aflatoxinas-Aspectos clínicos e toxicológicos em suínos. **Ciência Rural**, [s.l.], v. 24, n. 3, p. 635-43, 1994.

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

MARCOS FILHO, J. **Teste de Envelhecimento Acelerado**. In.: KRYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J. DE B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. p.3.1-3.24.

MARINI, P.; MORAES, C.L.; LARRÉ, C.F.; LIMA, M.C.; MORAES, D.M. AMARANTE, L. Indicativo da perda de qualidade de sementes de arroz sob diferentes temperaturas através da atividade enzimática e respiratória. **Interciência**, [s.l.], v. 38, n.1, p. 54-59, 2013.

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.

MENTEN, J.O.M. **Prejuízos causados por patógenos associados às sementes**. In: MENTEN, J.O.M. Patógenos em sementes: detecção, danos e controle químico. São Paulo: Ciba Agro, 1995. Cap.3, p.115-136.

MOHAMMADI, H.; SOLTANI, A.; SADEGHIPOUR, H.R.; ZEINALI, E. Effects of seed aging on subsequent seed reserve utilization and seedling growth in soybean. **International Journal of Plant Production**, [s.l.], v. 5, n. 1, p. 65-70, 2012.

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.

MUNIZ, F.R.; CARDOSO, M.D.G.; VON PINHO, E.V.R.; VILELA, M. Qualidade fisiológica de sementes de milho, feijão, soja e alface na presença de extrato de tiririca. **Revista Brasileira de Sementes**, [s.l.], v. 29, n. 2, p. 195-204, 2007.

NARAHASHI, T.; ZHAO, X.; IKEDA, T.; SALGADO, V.L.; YEH, J.Z. Glutamate-activated chloride channels: unique fipronil targets present in insects but not in mammals. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, [s.l.], v. 97, n. 2, p. 149-152, 2010.

OLIVEIRA, G.E.; PINHO, R.G.V.; ANDRADE, T.D.; PINHO, E.V.D.R.V.; SANTOS, C. D. D.; VEIGA, A.D. Physiological quality and amylase enzyme expression in maize seeds. **Ciência e Agrotecnologia**, [s.l.], v. 37, n. 1, p. 40-48, 2013.

PEREIRA, C.E.; OLIVEIRA, J.A; ROSA, M.C.M.; KIKUTI, A.L.P. Armazenamento de sementes de braquiária peletizadas e tratadas com fungicida e inseticida. **Ciência Rural**, [s.l.], v. 41, n. 12, 2011.

PESKE, S.T.; VILLELA, F.A.; MENEGHELLO, G.E. **Sementes: fundamentos científicos e tecnológicos**. 3. ed. Pelotas: Universitária/UFPel, 2012. 573 p.

PEZZINI, V.; VALDUGA, E.; CANSIANI, R.L. Incidência de fungos e micotoxinas em grãos de milho armazenados sob diferentes condições. **Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)**, [s.l.], v. 64, n. 1, p. 91-96, 2005.

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.

SANTOS, C.M R.; MENEZES, N.L.; VILLELA, F.A. Modificações fisiológicas e bioquímicas em sementes de feijão no armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, [s.l.], v. 27, n. 1, p. 104-114, 2005.

- SERKEDJIEVA, J. Antioxidant Effects of Plant Polyphenols: A Case Study of a Polyphenol-rich Extract from *Geranium sanguineum* L. **Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Higher Plants**, [s.l.], p. 275, 2010.
- SHABAN, M. Review on physiological aspects of seed deterioration. **International Journal of Agriculture and Crop Sciences**, [s.l.], v. 6, n. 11, p. 627, 2013.
- 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.
- SCHNEIDER, C.A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature Methods**, [s.l.], v. 9, n. 7, p. 671-675, 2012.
- SIGMAPLOT. **SigmaPlot for windows**. Versão 12.0. San Jose California USA: Systat Software Inc, 2014.
- 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.
- SMITH, A.M.; COUPLAND, G.; DOLAN, L.; HARBERD, N.; JONES, J.; MARTIN, C.; SABLONSKI, R.; AMEY, A. **Plant Biology**. 1. ed. Garland Science. p. 679, 2009.
- 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.
- SWENSON, T.L. **Neonicotinoid Insecticide Metabolism and Mechanisms of Toxicity in Mammals**. 2013. 92 p. Tese. (Doctor of Philosophy) - University of California, Berkeley, 2013.
- TAILLEBOIS, E.; BELOULA, A.; QUINCHARD, S.; JAUBERT-POSSAMAI, S.; DAGUIN, A.; SERVENT, D.; TAGU, D.; THANY, S. H.; TRICOIRE-LEIGNEL, H. Neonicotinoid binding, toxicity and expression of nicotinic acetylcholine receptor subunits in the aphid *Acyrtosiphon pisum*. **PloS One**, [s.l.], v. 9, n. 5, p. e96669, 2014.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artemed, 2013. 954 p.
- THIELERT, W.; METZLAFF, M.; DE BLOCK, M. Increase of stress tolerance by application of neonicotinoids on plants engineered to be stress tolerant. U.S. **Patent Application**, n.11, p. 921-519, 29 out. 2009.
- TIMÓTEO, T.S.; MARCOS-FILHO, J. Seed performance of different corn genotypes during storage. **Journal of Seed Science**, [s.l.], v. 35, n. 2, p. 207-215, 2013.
- TOMIZAWA, M.; CASIDA, J.E. Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, [s.l.], v. 45, p. 247-268, 2005.

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**, [s.l.], v. 5, n. 1, p. 7-16, 2014.

TUNES, L.V.M.; FONSECA, D.A.R.; MENEGHELLO, G.E; REIS, B.B.; BRASIL, V.D.; RUFINO, C.A.; VILLELA, F.A. Qualidade fisiológica, sanitária e enzimática de sementes de arroz irrigado recobertas com silício. **Revista Ceres**, [s.l.], v. 61, n. 5, p. 675-685, 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 mar. 2019.

VEIGA, A.D.; VON PINHO, E.V.D.R.; VEIGA, A.D.; PEREIRA, P.H.D.A.R.; DE OLIVEIRA, K.C.; VON PINHO, R.G. Influência do potássio e da calagem na composição química, qualidade fisiológica e na atividade enzimática de sementes de soja. **Ciência e Agrotecnologia**, [s.l.], v. 34, n. 4, p. 953-960, 2010.

VIEIRA, M.G.G.C.; VON PINHO, E.V.R.; SALGADO, K.C P.C. Técnicas moleculares em sementes. **Informe Agropecuário**, [s.l.], v. 27, n. 232, p. 88-96, 2006.

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.

WATTANAKULPAKIN, P.; PHOTCHANACHAI, S.; RATANAKHANOKCHAI, K.; LAY KYU, K.; RITTHICHAJ, P.; MIYAGAWA, S. Hydropriming effects on carbohydrate metabolism, antioxidant enzyme activity and seed vigor of maize (*Zea mays* L.). **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 11, n. 15, p. 3537-3547, 2012.

WIESNER, P.; KAYSER, H. Characterization of nicotinic acetylcholine receptors from the insects *Aphis craccivora*, *Myzus persicae*, and *Locusta migratoria* by radioligand binding assays: relation to thiamethoxam action. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, [s.l.], v. 14, n. 4, p. 221-230, 2000.

YAMAMOTO, I.; CASIDA, J.E. (Eds). **Nicotinoid Insecticides and the Nicotinic Acetylcholine Receptor**. New York, NY: Springer, 1999. 300 p.

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.

YÜCEL, N.C.; HEYBET, E.H.; GOKMEN, O.O. The Antioxidant Response System in Wheat Exposed to Pesticides and its Combined-induced Oxidative Damage. **Acta Chimica Slovenica**, [s.l.], v. 65, n. 2, p. 266-270, 2018.

ZHANG, M.; MAEDA, Y.; FUTIHATA, Y.; NORAMURA, Y.; ESASHI, Y. A mechanism of seed deterioration in relation to volatile compounds evoked by dry seeds themselves. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 4, n. 1, p. 49-56, 1999.