

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

**Armazenabilidade de sementes de milho-doce: alterações físicas, fisiológicas,
bioquímicas e classificação por espectroscopia no infravermelho próximo**

Joyce de Oliveira Araujo
Doctor Scientiae

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2024**

JOYCE DE OLIVEIRA ARAUJO

Armazenabilidade de sementes de milho-doce: alterações físicas, fisiológicas, bioquímicas e classificação por espectroscopia no infravermelho próximo

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientadora: Denise C. F. dos Santos
Dias

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2024**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

A663a
2024
Araújo, Joyce de Oliveira, 1991-
Armazenabilidade de sementes de milho-doce: alterações físicas, fisiológicas, bioquímicas e classificação por espectroscopia no infravermelho próximo / Joyce de Oliveira Araújo. – Viçosa, MG, 2024.
1 tese eletrônica (107 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Agronomia, 2024.

Referências bibliográficas: f. 94-107.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2025.094>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Milho-doce - Armazenamento. 2. Sementes - Fisiologia.
3. Antioxidantes. 4. Análise espectral. I. Dias, Denise Cunha
Fernandes dos Santos, 1958-. II. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Agronomia. Doutorado em Fitotecnia.
III. Título.

CDD 22. ed. 633.1568

JOYCE DE OLIVEIRA ARAUJO

Armazenabilidade de sementes de milho-doce: alterações físicas, fisiológicas, bioquímicas e classificação por espectroscopia no infravermelho próximo

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 10 de dezembro de 2024.

Assentimento:

Joyce de Oliveira Araujo
Autora

Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias
Orientadora

Essa tese foi assinada digitalmente pela autora em 28/02/2025 às 09:15:16 e pela orientadora em 28/02/2025 às 10:07:19. As assinaturas têm validade legal, conforme o disposto na Medida Provisória 2.200-2/2001 e na Resolução nº 37/2012 do CONARQ. Para conferir a autenticidade, acesse <https://siadoc.ufv.br/validar-documento>. No campo 'Código de registro', informe o código **NKF5.JYO6.NQ5M** e clique no botão 'Validar documento'.

Aos meus pais amados, por seus ensinamentos de vida.
Aos meus irmãos pelo apoio e amizade.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que sempre se mostra presente em minha vida e me concede saúde, amparo, proteção e a oportunidade de conhecer pessoas maravilhosas.

Agradeço aos meus pais, Itair e Júlia, por todo amor, carinho e ensinamentos, e aos meus irmãos (Cristiano, Itair e Marilene), pelo incentivo, cumplicidade e amizade.

Aos meus sobrinhos, João Victor, Geovana, Gael e Daniel, pelos momentos de alegria, e a todos familiares, que sempre prezaram por minha felicidade e me apoiaram.

Ao meu namorado Helio Junior pelo companheirismo, paciência e carinho.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia pela oportunidade de realização do Doutorado.

À professora e pesquisadora Dra. Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias pela orientação, oportunidade, compreensão, amizade e por sua dedicação à pesquisa e ao ensino.

Ao meu coorientador professor Dr. Laércio Junio da Silva pelo auxílio e esclarecimento de dúvidas referentes ao pré-processamento de dados espectrais e modelagem.

Aos professores Dr. Guilherme da Silva Pereira e Dr. Wellington Souto Ribeiro por disponibilizarem os equipamentos necessários para as determinações bioquímicas.

Ao professor Dr. Luiz Antônio dos Santos Dias por oportunizar a infraestrutura para a coleta de dados espectrais e pelos esclarecimentos para a realização das análises estatísticas.

Ao Dr. Warley Marcos Nascimento e à Embrapa Hortaliças, pelo fornecimento das sementes utilizadas nesta pesquisa.

À Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), por viabilizar a utilização do moinho de bolas.

Aos técnicos de laboratório, Wander Pereira, José Custódio, José Maurício e Mauro pelo agradável convívio e serviço prestado.

A todos amigos do Grupo de Estudos em Sementes (GSEM) pelos conhecimentos compartilhados e por toda ajuda.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

ARAÚJO, Joyce de Oliveira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2024. **Armazenabilidade de sementes de milho-doce: alterações físicas, fisiológicas, bioquímicas e classificação por espectroscopia no infravermelho próximo.** Orientadora: Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias.

Estudos sobre as alterações durante a deterioração de sementes de milho-doce são necessários para o fornecimento de informações que auxiliem na definição de estratégias adequadas para conservação da sua qualidade até o momento do plantio. Além disso, técnicas que englobam algoritmos de aprendizado de máquina podem possibilitar a avaliação da qualidade dessas sementes no decorrer do envelhecimento de forma rápida e menos subjetiva. Sendo assim, os objetivos do presente trabalho foram: i) avaliar e associar as alterações físicas, fisiológicas e bioquímicas em sementes de milho-doce submetidas ao envelhecimento natural (armazenamento) e artificial; ii) analisar o potencial da espectroscopia FT-NIR para classificar as sementes quanto à germinação e ao vigor. Sementes das cultivares Doce Cristal e Superdoce foram analisadas aos 0, 3, 6, 9 e 12 meses de armazenamento, em câmara fria (CF; $10\text{ °C} \pm 2,6$ e $56\% \pm 5,3$ de UR) e ambiente não controlado (AMB; $23,5\text{ °C} \pm 1,8$ e $64\% \pm 6,2$ de UR) (ensaio I), e após serem submetidas ao envelhecimento artificial (EA; 41 °C e 100% de UR) por 24, 48, 72 e 96 horas (ensaio II). Foram avaliadas a qualidade física e fisiológica das sementes e as alterações bioquímicas. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado. Os dados do ensaio I foram analisados em esquema de parcelas subdivididas. As médias obtidas durante o armazenamento foram comparadas com as das sementes não armazenadas pelo teste de Dunnett. Os dados referentes aos períodos de envelhecimento natural (ensaio I) e artificial (ensaio II) foram submetidos à análise de regressão. Realizou-se a análise de agrupamento hierárquico a partir das distâncias generalizadas de Mahalanobis entre as porcentagens de germinação obtidas durante diferentes períodos de armazenamento em CF e AMB e após o EA. Ainda, foi realizada a análise de componentes principais com os dados obtidos no estudo das alterações físicas, fisiológicas e bioquímicas. Também foram coletados os dados espectrais no FT-NIR. Os espectros foram obtidos de sementes individuais que, posteriormente, foram submetidas a testes de germinação e vigor para sua distinção em classes de qualidade fisiológica. No estudo da classificação da qualidade das sementes por meio de FT-NIR, os dados obtidos no ensaio I e II foram analisados juntos. Os espectros foram rotulados de acordo com as classes definidas e nomeadas em ordem decrescente aos níveis de germinação e vigor das sementes. Os

modelos preditivos foram obtidos com o classificador PLS-DA. Previamente à construção dos modelos de classificação, os espectros foram submetidos ao pré-processamento pela primeira e segunda derivada de Savitzky-Golay. Verificou-se reduções na qualidade fisiológica, nas atividades das enzimas antioxidantes, bem como nos teores de proteína e açúcares solúveis totais durante o envelhecimento natural e artificial. Houve diferença entre os ambientes de armazenamento, CF e AMB, em relação à germinação e ao vigor, aos 12 e a partir dos seis meses, respectivamente. O armazenamento em AMB provocou maiores alterações fisiológicas e bioquímicas nas sementes, evidenciando que esse ambiente é inadequado para acondicionar sementes de milho-doce por longo prazo. Porém, não ocorreram diferenças expressivas nas alterações físicas das sementes entre ambos os ambientes de armazenamento. A predição da armazenabilidade das sementes de milho-doce em condição de CF pode ser realizada com base no EA (41°C e 100% de UR) por 24 horas, sendo a germinação das sementes obtidas nesse tratamento similar as encontradas nos primeiros nove meses de armazenamento. Por sua vez, a germinação das sementes armazenadas em AMB por nove meses pode ser estimada com base no EA por 48 horas. A atividade das enzimas peroxidases (APX e POX) está associada com o vigor das sementes de milho-doce. Os modelos construídos para avaliação da qualidade das sementes por meio da espectroscopia FT-NIR alcançaram altas métricas de desempenho. Assim, essa técnica apresenta potencial para classificar sementes de milho-doce quanto à germinação e ao vigor.

Palavras-chave: análise bioquímica; deterioração; espectroscopia FT-NIR; vigor

ABSTRACT

ARAÚJO, Joyce de Oliveira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December, 2024. **Storability of sweet corn seeds: physical, physiological, biochemical changes and classification by near-infrared spectroscopy.** Adviser: Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias.

Studies on changes during sweet corn seed deterioration are necessary to provide information that helps define appropriate strategies for preserving their quality until planting. In addition, techniques that include machine learning algorithms can enable the evaluation of the quality of these seeds during aging in a fast and less subjective way. Therefore, the objectives of this study were: i) to evaluate and associate the physical, physiological and biochemical changes in sweet corn seeds subjected to natural (storage) and artificial aging; ii) to analyze the potential of FT-NIR spectroscopy to classify seeds according to germination and vigor. Seeds of the Doce Cristal and Superdoce cultivars were analyzed at 0, 3, 6, 9 and 12 months of storage in a cold chamber (CF; $10\text{ °C} \pm 2.6$ and $56\% \pm 5.3$ RH) and uncontrolled environment (AMB; $23.5\text{ °C} \pm 1.8$ and $64\% \pm 6.2$ RH) (assay I), and after being subjected to artificial aging (EA; 41 °C and 100% RH) for 24, 48, 72 and 96 hours (assay II). The physical and physiological quality of the seeds and the biochemical changes were evaluated. A completely randomized design was used. Data from assay I were analyzed in a split-plot scheme. The means obtained during storage were compared with those of the non-stored seeds using the Dunnett test. Data related to the natural (assay I) and artificial (assay II) aging periods were subjected to regression analysis. Hierarchical cluster analysis was performed based on the generalized Mahalanobis distances between the germination percentages obtained during different storage periods in CF and AMB and after EA. Principal component analysis was also performed with the data obtained in the study of physical, physiological and biochemical changes. Spectral data were also collected using FT-NIR. Spectra were obtained from individual seeds that were subsequently subjected to germination and vigor tests to distinguish them into physiological quality classes. In the study of seed quality classification by FT-NIR, data obtained in assay I and II were analyzed together. Spectra were labeled according to the defined classes and named in decreasing order according to seed germination and vigor levels. Predictive models were obtained using the PLS-DA classifier. Prior to the construction of the classification models, the spectra were subjected to pre-processing using the first and second derivatives of Savitzky-Golay. Reductions in physiological quality, antioxidant enzyme activities, and total protein and soluble sugar contents were observed

during natural and artificial aging. There were differences between the storage environments, CF and AMB, in relation to germination and vigor, at 12 and after six months, respectively. Storage in AMB caused greater physiological and biochemical changes in the seeds, evidencing that this environment is inadequate for long-term storage of sweet corn seeds. However, there were no significant differences in the physical changes of the seeds between both storage environments. The prediction of the storability of sweet corn seeds under CF conditions can be performed based on the EA (41°C and 100% RH) for 24 hours, and the germination of the seeds obtained in this treatment was similar to that found in the first nine months of storage. In turn, the germination of seeds stored in AMB for nine months can be estimated based on the EA for 48 hours. The activity of peroxidase enzymes (APX and POX) is associated with the vigor of sweet corn seeds. The models built to evaluate seed quality through FT-NIR spectroscopy achieved high performance metrics. Thus, this technique has the potential to classify sweet corn seeds according to germination and vigor.

Keywords: biochemical analysis; deterioration; FT-NIR spectroscopy; vigor

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Médias mensais da temperatura e umidade relativa do ar (UR) obtidas no ambiente de armazenamento não controlado durante doze meses.....32
- Figura 2. Grau de umidade (%) de sementes em duas cultivares de milho-doce durante doze meses de armazenamento em câmara fria (CF) e ambiente não controlado (AMB). Barras: desvio padrão.....43
- Figura 3. Imagens radiográficas das sementes indicando as estruturas internas (A) e danos físicos em sementes de milho-doce, cultivar Doce Cristal (B) e Superdoce (C).....44
- Figura 4. Densidade relativa (A e E), densidade integrada (B e F), germinação (C e G) e primeira contagem de germinação (D e H) em sementes de duas cultivares de milho-doce durante doze meses de armazenamento em câmara fria (CF) e ambiente não controlado (AMB). *, ns = significativo e não significativo pelo teste t a 5% de probabilidade.46
- Figura 5. Imagens radiográficas das sementes de milho-doce e seus respectivos mapas de calor e plântulas (7 dias após a semeadura), cultivar Doce Cristal (A, B e C) e Superdoce (D, E e F).
.....48
- Figura 6. Condutividade elétrica (A e D), teste de frio (B e E) e envelhecimento acelerado (C e F) em sementes de duas cultivares de milho-doce durante doze meses de armazenamento em câmara fria (CF) e ambiente não controlado (AMB). *, ns = significativo e não significativo pelo teste t a 5% de probabilidade.....51
- Figura 7. Comprimento de plântula (A e D), índice de velocidade de emergência (B e E) e emergência (C e F) em sementes de duas cultivares de milho-doce durante doze meses de armazenamento em câmara fria (CF) e ambiente não controlado (AMB). *, ns = significativo e não significativo pelo teste t a 5% de probabilidade.54
- Figura 8. Grau de umidade (%) de sementes em duas cultivares de milho-doce submetidas a diferentes períodos de envelhecimento artificial. Barras: desvio padrão.56
- Figura 9. Densidade relativa (A e E), densidade integrada (B e F), germinação (C e G) e primeira contagem de germinação (D e H) em sementes de duas cultivares de milho-doce submetidas a

diferentes períodos de envelhecimento artificial. *, ns = significativo e não significativo pelo teste t a 5% de probabilidade.....	57
Figura 10. Condutividade elétrica (A e D), teste de frio (B e E) e envelhecimento acelerado (C e F) em sementes de duas cultivares de milho-doce submetidas a diferentes períodos de envelhecimento artificial. *, ns = significativo e não significativo pelo teste t a 5% de probabilidade.	59
Figura 11. Comprimento de plântula (A e D), índice de velocidade de emergência (B e E) e emergência (C e F) em sementes de duas cultivares de milho-doce submetidas a diferentes períodos de envelhecimento artificial. *, ns = significativo e não significativo pelo teste t a 5% de probabilidade.	60
Figura 12. Conteúdo de proteínas (A e D), atividade das enzimas superóxido dismutase (B e E) e catalase (C e F) em sementes de duas cultivares de milho-doce durante doze meses de armazenamento em câmara fria (CF) e ambiente não controlado (AMB). *, ns = significativo e não significativo pelo teste t a 5% de probabilidade.	62
Figura 13. Atividade da enzima peroxidase do ascorbato (A e D), peroxidase (B e E) e conteúdo de malonaldeído (C e F) em sementes de duas cultivares de milho-doce durante doze meses de armazenamento em câmara fria (CF) e ambiente não controlado (AMB). *, ns = significativo e não significativo pelo teste t a 5% de probabilidade.	66
Figura 14. Açúcares solúveis totais (A e D), redutores (B e E) e não redutores (C e F) em sementes de duas cultivares de milho-doce durante doze meses de armazenamento em câmara fria (CF) e ambiente não controlado (AMB). *, ns = significativo e não significativo pelo teste t a 5% de probabilidade.	70
Figura 15. Conteúdo de proteínas (A e D), atividade das enzimas superóxido dismutase (B e E) e catalase (C e F) em sementes de duas cultivares de milho-doce submetidas a diferentes períodos de envelhecimento artificial. *, ns = significativo e não significativo pelo teste t a 5% de probabilidade.	72
Figura 16. Atividade da enzima peroxidase do ascorbato (A e D), peroxidase (B e E) e conteúdo de malonaldeído (C e F) em sementes de duas cultivares de milho-doce submetidas a diferentes períodos de envelhecimento artificial. *, ns = significativo e não significativo pelo teste t a 5% de probabilidade.	73

Figura 17. Açúcares solúveis totais (A e D), redutores (B e E) e não redutores (C e F) em sementes de duas cultivares de milho-doce submetidas a diferentes períodos de envelhecimento artificial. *, ns = significativo e não significativo pelo teste t a 5% de probabilidade.	75
Figura 18. Dendograma da análise de agrupamento hierárquico (HCA) realizada a partir das distâncias generalizadas de Mahalanobis entre as porcentagens de germinação obtidas durante diferentes períodos de armazenamento em câmara fria (CF) e ambiente não controlado (AMB), e após o envelhecimento artificial (EA) de sementes de milho-doce.....	76
Figura 19. Análise de componentes principais (PCA) obtida pela combinação linear das variáveis relacionadas a densidade tecidual, qualidade fisiológica e caracterização bioquímica de sementes de duas cultivares de milho-doce, submetidas a diferentes períodos envelhecimento artificial e durante o armazenamento por 12 meses. Diagrama de ordenação (A) e círculo de correlação (B). DC: Doce Cristal; SD: Superdoce; CF: câmara fria; AMB: ambiente não controlado.	78
Figura 20. Definição das classes (C1 a C4) de germinação e vigor, conforme os níveis de qualidade das sementes obtidos pelo teste de germinação (A e D), primeira contagem de germinação (B e E) e índice de velocidade de germinação (C e F), para duas cultivares de milho-doce. EA: envelhecimento artificial; CF: câmara fria; AMB: ambiente não controlado. Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Barras: erro padrão.	80
Figura 21. Espectros (bruto e média) FT-NIR de sementes de duas cultivares de milho-doce em suas respectivas classes atribuídas conforme os níveis de qualidade obtidos pelo teste de germinação (A e D), primeira contagem de germinação (B e E) e índice de velocidade de germinação (C e F).	83
Figura 22. Importância das variáveis de comprimento de onda para classificação, via PLS-DA, da qualidade fisiológica de sementes, das cultivares Doce Cristal (A, B, C) e Superdoce (D), envelhecidas naturalmente e artificialmente. Espectros pré-processados pela segunda derivada de Savitzky-Golay e classificados conforme os níveis de qualidade obtidos pelo teste de germinação.....	88
Figura 23. Importância das variáveis de comprimento de onda para classificação, via PLS-DA, da qualidade fisiológica de sementes, das cultivares Doce Cristal (A, B, C) e Superdoce (D, E,	

F), envelhecidas naturalmente e artificialmente. Espectros pré-processados pela segunda derivada de Savitzky-Golay e classificados conforme os níveis de qualidade obtidos pela primeira contagem de germinação..... 90

Figura 24. Importância das variáveis de comprimento de onda para classificação, via PLS-DA, da qualidade fisiológica de sementes, das cultivares Doce Cristal (A, B, C e D) e Superdoce (E, F, G e H), envelhecidas naturalmente e artificialmente. Espectros pré-processados pela segunda derivada de Savitzky-Golay e classificados conforme os níveis de qualidade obtidos pelo índice de velocidade de germinação..... 91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Densidade relativa (DR), densidade integrada (DI), germinação (G) e primeira contagem de germinação (PC) em sementes de duas cultivares de milho-doce durante doze meses de armazenamento em câmara fria (CF) e ambiente não controlado (AMB).....	45
Tabela 2. Condutividade elétrica (CE), teste de frio (TF) e envelhecimento acelerado (EA) em sementes de duas cultivares de milho-doce durante doze meses de armazenamento em câmara fria (CF) e ambiente não controlado (AMB).....	50
Tabela 3. Comprimento de plântula (CP), índice de velocidade de emergência (IVE) e emergência (E) em sementes de duas cultivares de milho-doce durante doze meses de armazenamento em câmara fria (CF) e ambiente não controlado (AMB).	53
Tabela 4. Conteúdo de proteínas, atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) em sementes de duas cultivares de milho-doce durante doze meses de armazenamento em câmara fria (CF) e ambiente não controlado (AMB).....	61
Tabela 5. Atividade da enzima peroxidase do ascorbato (APX), peroxidase (POX) e conteúdo de malonaldeído (MDA) em sementes de duas cultivares de milho-doce durante doze meses de armazenamento em câmara fria (CF) e ambiente não controlado (AMB).	65
Tabela 6. Açúcares solúveis totais (AST), açúcares redutores (AR) e açúcares não redutores (ANR) em sementes de duas cultivares de milho-doce durante doze meses de armazenamento em câmara fria (CF) e ambiente não controlado (AMB).....	69
Tabela 7. Número de acertos individuais por classe de qualidade fisiológica das sementes e métricas do modelo de classificação PLS-DA, usando dados dos espectros originais (sem pré-tratamento).....	84
Tabela 8. Número de acertos individuais por classe de qualidade fisiológica das sementes e métricas do modelo de classificação PLS-DA, usando dados de espectros transformados pela primeira derivada de Savitzky-Golay.	85
Tabela 9. Número de acertos individuais por classe de qualidade fisiológica das sementes e métricas do modelo de classificação PLS-DA, usando dados de espectros transformados pela segunda derivada de Savitzky-Golay.	87

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1. Aspectos gerais e características do milho-doce	19
2.2. Armazenamento de sementes	21
2.3. Deterioração de sementes	24
2.4. Espectroscopia no infravermelho próximo (NIR)	29
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.1. Ensaio I: Envelhecimento natural (armazenamento).....	32
3.2. Ensaio II: Envelhecimento artificial	33
3.3. Avaliação da qualidade física e fisiológica	33
3.3.1. Determinação do grau de umidade	33
3.3.2. Densidade relativa e integrada.....	33
3.3.3. Teste de germinação	34
3.3.4. Primeira contagem de germinação	34
3.3.5. Condutividade elétrica	34
3.3.6. Teste de Frio	34
3.3.7. Envelhecimento acelerado	35
3.3.8. Comprimento de plântula	35
3.3.9. Emergência de plântulas	35
3.3.10. Índice de velocidade de emergência.....	36
3.4. Caracterização bioquímica	36
3.4.1. Determinação da atividade de enzimas antioxidativas e de proteínas.....	36
3.4.1.1. Superóxido dismutase (SOD)	37
3.4.1.2. Catalase (CAT)	37
3.4.1.3. Peroxidase do ascorbato (APX).....	37
3.4.1.4. Peroxidase (POX)	38
3.4.2. Conteúdo de Malonaldeído (MDA).....	38
3.4.3. Determinação dos teores de açúcares	38
3.4.3.1. Açúcares solúveis totais (AST)	39
3.4.3.2. Açúcares redutores (AR)	39
3.4.3.3. Açúcares não redutores (ANR).....	39
3.5. Espectroscopia do infravermelho próximo (NIR)	39
3.6. Análise estatística, pré-processamento de dados espectrais e modelagem.....	40

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1. Alterações na qualidade física e fisiológica	43
4.1.1. Ensaio I: Envelhecimento natural (armazenamento).....	43
4.1.2. Ensaio II: Envelhecimento artificial	55
4.2. Alterações bioquímicas	60
4.2.1. Ensaio I: Envelhecimento natural (armazenamento).....	60
4.2.2. Ensaio II: Envelhecimento artificial	71
4.3. Predição da armazenabilidade e associação linear entre as análises e os períodos de envelhecimento natural e artificial	75
4.4. Classificação da qualidade de sementes de milho-doce por meio de FT-NIR	78
5. CONCLUSÕES	93
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94

1. INTRODUÇÃO

O milho-doce é um importante vegetal que, apesar de ser amplamente cultivado em áreas temperadas dos Estados Unidos e do Canadá, vem apresentando um crescente mercado em regiões tropicais e subtropicais (REVILLA; ANIBAS; TRACY, 2021). O Brasil, como grande produtor de milho comum, possui um alto potencial para aumentar a produção nacional de milho-doce (NIHEI *et al.*, 2020). Porém, um dos entraves para a expansão e disseminação do cultivo no país tem sido a baixa oferta de sementes de alta qualidade. Associa-se a este problema as particularidades do milho-doce e a reduzida disponibilidade de informações em relação à preservação da qualidade das sementes até o momento da semeadura.

Como característica própria, o milho-doce apresenta um ou mais genes mutantes que bloqueiam a conversão de açúcar em amido, promovendo um maior acúmulo de açúcares no endosperma, sendo esse o principal aspecto que os diferencia do milho comum (COAN; PINTO; SCAPIM, 2018). As mudanças na composição dos carboidratos atribuídas a esse tipo especial de milho, além de reduzirem a concentração de reservas (amido) no endosperma (HU *et al.*, 2021), contribuem para formação de espaços internos entre a camada de aleurona e o pericarpo das sementes durante o processo de secagem, tornando esse mais frágil (CHEN, 2014). A presença de um pericarpo tenro implica em uma maior susceptibilidade das sementes a danos mecânicos e patógenos. Todas essas particularidades podem fazer com que sementes de milho-doce apresentem menor vigor (REVILLA; ANIBAS; TRACY, 2021) e sejam mais propensas a uma rápida deterioração tanto em nível de campo, quanto no armazenamento, quando comparadas com as de milho comum.

Embora a demanda nacional por sementes de milho-doce ocorra ao longo de todo o ano, para atender a indústria de milho verde processado, a colheita em áreas de produção de sementes, normalmente, acontece apenas no período de outono e inverno, para evitar a deterioração em campo por altas precipitações e temperaturas (COIMBRA *et al.*, 2009). Assim, para essa cultura, o armazenamento é uma etapa de suma importância para favorecer o equilíbrio da disponibilidade de sementes de alta qualidade para comercialização conforme a sua respectiva demanda independente da época. Neste contexto, informações sobre o comportamento das sementes de milho-doce durante o armazenamento são importantes para a adoção de estratégias adequadas e específicas para a sua conservação desde a colheita até o plantio subsequente.

Sabe-se que a qualidade fisiológica das sementes apresenta um impacto significativo na produtividade e rendimento de uma cultura (XING *et al.*, 2023), sendo definida pela germinação

e vigor que são máximos no ponto de maturidade fisiológica. A partir desse ponto, as sementes estão sujeitas a uma série de alterações degenerativas, que caracterizam o envelhecimento ou processo de deterioração (LABBÉ; VILLELA; PESKE, 2019). As alterações de ordem física estão relacionadas a distúrbios que afetam a aparência e integridade das sementes. Assim, injúrias mecânicas, lesões provocadas por microrganismos e insetos, modificações na densidade, coloração e superfície do tegumento podem ser indicativos de deterioração (MARCOS-FILHO, 2015). Como alterações fisiológicas, são mencionadas reduções na velocidade de germinação, declínio no desempenho de plântulas (desuniformidade no crescimento e maior taxa de anormalidades), decréscimos no potencial de armazenamento, diminuição da resistência a ação de microrganismos patogênicos e perda do poder germinativo (WILSON; MCDONALD, 1986; BASAVARAJAPPA; SHETTY; PRAKASH, 1991). Já as manifestações bioquímicas da deterioração são evidenciadas por alterações na respiração, produção de ATP, taxa de síntese, em sistemas enzimáticos, no metabolismo de reservas, nos sistemas de membranas e por danos genéticos (MARCOS-FILHO, 2015).

Por se tratar de um processo complexo que interfere diretamente na qualidade fisiológica das sementes, a deterioração vem sendo base para realização de inúmeros trabalhos científicos. Porém, ainda que sejam evidentes os progressos alcançados na elucidação dos mecanismos envolvidos na deterioração das sementes, há carência de informações sobre suas causas e sequência de eventos (EBONE; CAVERZAN; CHAVARRIA, 2019). Desta forma, a evolução do conhecimento sobre a deterioração ainda consiste em um dos principais desafios para os tecnologistas de sementes. Diante deste contexto, estudos que avaliem as alterações físicas, fisiológicas e bioquímicas decorrentes do envelhecimento, em sementes de diversas espécies, podem contribuir para o esclarecimento de várias dúvidas existentes sobre essa temática. Além disso, tais estudos são importantes para identificação de possíveis marcadores bioquímicos sensíveis o suficiente para detectar o grau de deterioração.

Na atualidade, o monitoramento da deterioração das sementes é realizado por meio de testes de vigor. Esses são ferramentas imprescindíveis em um programa de controle de qualidade de sementes, uma vez que possibilitam a obtenção de informações sobre o desempenho de lotes em campo e no armazenamento (MARCOS-FILHO, 2020b). Entretanto, por mais que sejam eficientes em sua finalidade, esses testes são destrutivos, estão sujeitos a subjetividade do analista nas avaliações e, muitas vezes, demandam muito tempo para a obtenção dos resultados. Nesse sentido, novas técnicas têm apresentado potencial para serem implementadas na classificação de lotes de sementes quanto à qualidade, identificando o nível de deterioração dessas, reduzindo a subjetividade e o tempo de análise, sem destruição das

amostras. Dentre essas técnicas, destaca-se a espectroscopia no infravermelho próximo com transformada de Fourier (FT-NIR). Esta baseia-se na absorção, pelas sementes, de radiação eletromagnética na região do infravermelho próximo (XIA *et al.*, 2019), permitindo a obtenção de espectros que contêm picos de comprimentos de ondas relacionados aos compostos químicos que são alterados de acordo com o nível de qualidade das sementes (SOUZA *et al.*, 2023).

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivos: (i) avaliar e associar as alterações físicas, fisiológicas e bioquímicas em sementes de milho-doce no decorrer do envelhecimento natural (armazenamento) e artificial; (ii) investigar o potencial da espectroscopia FT-NIR para classificar sementes de milho-doce em relação à germinação e ao vigor.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Aspectos gerais e características do milho-doce

O milho-doce (*Zea mays* L. *saccharata*) apresenta alto valor agregado e características próprias, como sabor adocicado, pericarpo fino e textura delicada (LAOSATIT *et al.*, 2022). Destina-se exclusivamente ao consumo humano e pode ser utilizado como milho verde, *in natura* e em conserva, congelado na forma de espigas ou grãos, desidratado, ou como minimilho colhido antes da polinização (FARIA; NASCIMENTO, 2014).

No Brasil, praticamente toda produção é direcionada para o processamento agroindustrial, possibilitando um fluxo constante de comercialização do milho-doce em conserva (enlatado) (COAN; PINTO; SCAPIM, 2018). O cultivo de milho-doce se estende desde o Rio Grande do Sul até Goiás, que apresenta maior área cultivada, passando por São Paulo e Minas Gerais (NUMOTO *et al.*, 2019). Porém, a produtividade ainda é limitada, em razão da baixa disponibilidade de cultivares adaptadas as diversas regiões do país (GONÇALVES *et al.*, 2018), bem como da dificuldade de oferta de sementes de alta qualidade que permitam a obtenção de um estande de plantas uniforme.

A principal diferença do milho-doce em relação ao milho comum é a presença de um ou mais genes recessivos mutantes que elevam a concentração de açúcares no endosperma em detrimento do amido (FARIA; NASCIMENTO, 2014). Os genes mutantes, que conferem o caráter doce ao grão, apresentam diferentes efeitos na síntese de amido, por isso, podem ser divididos em dois grupos: doce e superdoce (COAN; PINTO; SCAPIM, 2018). O gupo doce contém os genes *sugary1 (su1)*, *amylose-extender1 (ae1)* e *dull1 (du1)*, enquanto o superdoce inclui os seguintes genes: *brittle1 (bt1)*, *brittle2 (bt2)* e *shrunken2 (sh2)*. Tais genes mutantes podem atuar isoladamente ou em conjunto, em duplas ou triplas combinações (MAGALHÃES; LAVINSKY; SOUZA, 2016). O milho-doce obtido de cultivares que possuem os genes denominados de superdoce, apresenta maior doçura e sintetiza menor quantidade de amido quando comparado ao proveniente de cultivares do grupo doce (PEREIRA FILHO; TEIXEIRA, 2016).

Para fins de consumo como milho verde, tanto *in natura* como em conserva, a colheita do milho-doce é realizada quando os grãos estão no estado leitoso (fase R3 do ciclo fenológico), entre 20 e 28 dias após o florescimento (LUZ *et al.*, 2014). Nesse estado, os grãos ainda estão imaturos, com umidade superior a 70% (REVILLA; ANIBAS; TRACY, 2021), podendo apresentar de quatro a oito vezes mais açúcar total do que o milho comum (JHA; SINGH; AGRAWAL, 2016). Sob altas temperaturas, as espigas de milho-doce sofrem alguns processos

fisiológicos, como aumento na taxa respiratória e rápida conversão de açúcares em amido. Esses processos resultam em diminuição no conteúdo de açúcares solúveis e do peso úmido dos grãos, além de provocarem alterações nos aspectos sensoriais (XIE *et al.*, 2017). Assim, o gerenciamento pós-colheita do milho-doce é fundamental para manter a qualidade do produto e atender as exigências do mercado consumidor. Recomenda-se que seja realizado o resfriamento rápido das espigas colhidas no campo e quando necessário, essas devem ser armazenadas em temperaturas próximas de 0 °C (HENZ; MORETTI, 2016).

O mercado consumidor apresenta preferência por grãos com maiores conteúdos de açúcares e menores teores de amido. Por esse motivo, os genes *sh2*, *bt1* e *bt2* (grupo superdoce) são os mais utilizados no desenvolvimento de cultivares comerciais (COAN; PINTO; SCAPIM, 2018). Além disso, as espigas das cultivares portadoras do gene *sh2* têm praticamente o dobro de vida de pós-colheita em relação às demais, sendo esse um aspecto interessante para o mercado de consumo *in natura* e para o processamento industrial (HENZ; MORETTI, 2016). A maior uniformidade na maturação da cultivar, espigas grandes e cilíndricas, textura macia e menor espessura do pericarpo também são características altamente desejáveis do ponto de vista comercial (KWIATKOWSKI; CLEMENTE, 2007).

Quando a finalidade do cultivo é a produção de sementes, a colheita deve ser realizada a partir do momento que essas estão fisiologicamente maduras e apresentam o máximo de germinação e vigor. O ponto de colheita ideal depende do genótipo, sendo que para as cultivares Doce-Cristal (BR-402; portadora do gene *su1*) e Superdoce (BR-400; portadora do gene *bt2*), a colheita deve ser feita até 75 (ARAÚJO *et al.*, 2006a) e 76 dias (ARAÚJO *et al.*, 2006b) após o florescimento, respectivamente. Posterior a esses períodos observam-se decréscimos no vigor das sementes devido à deterioração no campo, que ocorre de maneira mais rápida no milho-doce em comparação com o milho comum (PEREIRA FILHO; TEIXEIRA, 2016).

Em milho-doce, a alta concentração de açúcares solúveis e a reduzida concentração de amido no endosperma, proporcionam a formação de espaços internos entre a camada de aleurona e o pericarpo das sementes durante a desidratação (CHEN, 2014). Em consequência disso, as sementes apresentam aspecto enrugado e pericarpo mais frágil, o que as tornam mais susceptíveis a danos mecânicos e a patógenos (DOUGLASS; JUVIK; SPLITTSTOESSER, 1993). Tais características das sementes de milho-doce podem resultar em baixo potencial de armazenamento e rápida perda da qualidade (deterioração), prejudicando o estabelecimento e a uniformidade do estande de plantas em campo (AZANCA; BAR-ZUR; JUVIK, 1996).

De acordo com Revilla *et al.* (2021), à medida que se aumenta a qualidade de mesa (grãos macios e com alto teores de açúcares) do milho-doce, ocorre um efeito inverso na

qualidade das sementes. Neste contexto, sementes contendo o gene mutante do grupo superdoce tendem a serem mais problemáticas e, geralmente, apresentam germinação inferior àquelas provenientes do milho comum e de cultivares portadoras do alelo *su1*, pertencente ao grupo doce. Diante desse fato, para comercialização de sementes de milho certificadas (C1 e C2) e não certificadas (S1 e S2) são tolerados os seguintes limites mínimos de germinação: 85% (milho comum), 70% (grupo doce), 60% (grupo superdoce) (BRASIL, 2013).

A composição e textura do endosperma, a susceptibilidade a patógenos e a danos, causados pelo processo de colheita, beneficiamento e secagem, bem como a menor concentração de reservas (amido), são particularidades das sementes de milho-doce que contribuem para sua deterioração e afetam sua longevidade. Dessa forma, estudos que forneçam informações sobre a preservação da qualidade dessas sementes são importantes para possibilitar a comercialização de sementes de alta capacidade germinativa e vigor.

2.2. Armazenamento de sementes

O armazenamento é uma etapa fundamental nas culturas agrícolas cujo período de colheita normalmente não coincide com a época de plantio e tem como principal objetivo preservar ao máximo a qualidade das sementes, reduzindo a velocidade do processo de deterioração (MARCOS-FILHO, 2015). Desta forma, um armazenamento eficiente deve garantir uma maior longevidade das sementes, além de manter o potencial dessas de gerar uma plântula vigorosa no campo. A longevidade das sementes é influenciada, principalmente, pela constituição genética que se manifesta na composição química e nas características estruturais, qualidade das sementes após a colheita e condições de armazenamento (umidade relativa do ar, temperatura e tipo embalagem) (RANGANATHAN; GROOT, 2023).

A umidade relativa (UR) e a temperatura são os fatores que mais afetam a longevidade e qualidade das sementes no armazenamento (ROBERTS, 1972; CHANG; CONVERSE; STEELE, 1994). Entre esses dois fatores a umidade relativa é considerada mais relevante, pois apresenta uma relação direta com o grau de umidade das sementes (AMARO *et al.*, 2019), e o aumento desse acelera o processo de deterioração. Bilia *et al.* (1994) constataram o maior efeito da umidade relativa na qualidade de sementes de milho em relação à temperatura ao obter maior conservação do vigor em condições controladas de câmara seca (22 °C e 35-45% UR) em comparação com câmara fria (10 °C e 90% UR).

Shahein e Shalaby (2021) avaliaram os impactos de diferentes umidades do ambiente de armazenamento sobre a qualidade fisiológica e composição química de sementes de milho e relataram redução no vigor, viabilidade e no teor de óleo e proteína, bem como aumento no

grau de umidade e acidez das sementes, com o incremento da umidade relativa de 46% para 80%. Também ocorreu redução no vigor das sementes com o aumento da umidade relativa de 46% para 65%, o que não foi observado para germinação (SHAHEIN; SHALABY, 2021). Além disso, esses autores evidenciaram que no maior período de armazenamento estudado (18 meses) houve decréscimos mais acentuados na porcentagem de germinação e no comprimento e massa seca de plântulas, comprovando que a intensidade da deterioração das sementes, também está diretamente relacionada ao período de armazenamento.

Ao avaliar o efeito da temperatura ao longo do armazenamento de sementes de milho, Fessel *et al.* (2006) e Moraes *et al.* (2022) verificaram que em 30 °C houve maior redução no vigor em comparação com 20 °C, sendo um desempenho satisfatório relatado com 10 °C. Já Paraginski *et al.* (2015) observaram diminuição na germinação e aumento na condutividade elétrica da solução de embebição de sementes de milho em temperaturas de armazenamento superiores a 15 °C. Essas informações confirmam que a utilização de temperaturas baixas é mais adequada para o armazenamento das sementes. Segundo Rahmawati e Aquil (2020), geralmente temperaturas abaixo de 20 °C são indicadas para o armazenamento de sementes de cereais.

Assim, condições de armazenamento que associam baixa temperatura e umidade relativa são as que mais favorecem a longevidade das sementes de milho. Heberle *et al.* (2019) afirmam que essas podem ser armazenadas em condições de câmara fria (12 ± 2 °C e $60 \pm 5\%$ UR) e em ambiente natural (média de 21°C e 71% UR) durante 450 e 360 dias, respectivamente, sem que a germinação apresente valores inferiores a 85%, porém em condição que integra elevada temperatura e umidade relativa (30 ± 2 °C e $70 \pm 5\%$ UR) isso é possível somente por 180 dias. Capilheira *et al.* (2024) avaliaram a qualidade fisiológica de 37 genótipos de milho ao longo de 180 dias e obtiveram como resultado uma melhor preservação do vigor e da germinação das sementes em condições de câmara fria regulada a 10 °C e 40% de UR em relação a condições de armazém. Timóteo e Marcos-Filho (2013) observaram a superioridade das condições de câmara fria e seca (10 °C e 30% UR) em comparação com os ambientes subótimo (20 °C e 70% UR) e não controlado no decorrer do armazenamento de sementes de milho. Ademais, esses autores relataram que as reduções mais drásticas no vigor, durante o armazenamento, foram observadas em lotes de baixo potencial fisiológico e que diferentes genótipos, de uma mesma espécie, podem diferir quanto à longevidade.

Embora existam muitos estudos relacionados ao comportamento de sementes de milho comum ao longo do armazenamento em diferentes ambientes, especificamente para genótipos de milho-doce informações sobre o assunto, até este momento, são limitadas. Em um estudo

sobre secagem de sementes de milho-doce e seus efeitos acerca da qualidade fisiológica e armazenamento, Araújo *et al.* (2000) constataram que a câmara fria (8 ± 2 °C e $70 \pm 5\%$ UR) foi eficiente para a conservação das sementes, durante 12 meses. Camargo e Carvalho (2008) ao estudarem o uso de diferentes condições de armazenamento e tipos de embalagem sobre a qualidade de sementes de milho-doce enfatizaram que o ambiente de câmara fria (10°C e 50% UR) com acondicionamento das sementes em embalagem de papel (permeável) é o método mais apropriado para preservação da germinação e vigor dessas por um período de 18 meses. Por sua vez, em condições de ambiente natural sementes armazenadas à vácuo em embalagem plástica (impermeável), com 8% de grau de umidade, tiveram melhor desempenho, pelo mesmo período (CAMARGO; CARVALHO, 2008).

O tipo de embalagem utilizada no armazenamento pode afetar a longevidade das sementes, pois a natureza das embalagens apresenta relação direta com o grau de umidade dessas (DADLANI *et al.*, 2023). Embalagens permeáveis permitem a troca de vapor d'água com ambiente externo até que o equilíbrio higroscópico seja alcançado, o que não é possível com uso de embalagens impermeáveis. A escolha da embalagem a ser utilizada depende da temperatura e umidade relativa sob as quais as sementes irão permanecer armazenadas, do grau de umidade das sementes, da duração do armazenamento e modalidade de comercialização das sementes (MARCOS-FILHO, 2015; LABBÉ; VILLELA; PESKE, 2019). Sementes de milho-doce podem ser armazenadas com o grau de umidade de 8% em embalagens impermeáveis e até 13% em embalagens permeáveis (PESSOA, 1996).

De acordo com Pereira (2021), para um armazenamento mais prolongado das sementes de milho-doce em ambiente com temperatura de 30 °C é necessário reduzir as condições de umidade relativa como também a concentração de oxigênio nas embalagens impermeáveis, entretanto, em 20 °C somente a redução da UR, para 30 ou 45%, é adequada para aumentar a armazenabilidade dessas. Já Rivera *et al.* (2011) verificaram que sementes de milho-doce armazenadas em câmara fria (10 °C) apresentam sua qualidade fisiológica mais preservada do que quando armazenadas em temperatura ambiente (25 °C) e que o tipo de embalagem não influencia na qualidade fisiológica dessas durante 240 dias de armazenamento. Esses autores relatam que o armazenamento à vácuo em embalagens impermeáveis pode resultar em ganhos poucos significativos, não justificando o emprego em escala comercial.

É importante ressaltar que os poucos estudos encontrados na literatura relacionados ao armazenamento de sementes de milho-doce são restritos, em quase sua totalidade, a sementes do grupo superdoce, e nesses não foram investigadas as alterações bioquímicas devido a deterioração que ocorre nas sementes. Assim, pesquisas que englobem informações sobre a

qualidade fisiológica e essas alterações em sementes armazenadas de milho-doce de ambos os grupos (doce e superdoce), levando em consideração diferentes condições e períodos de armazenamento são desejáveis. Tais informações podem contribuir para o conhecimento do comportamento das sementes de milho-doce durante o armazenamento, permitindo definir estratégias adequadas para sua conservação.

2.3. Deterioração de sementes

Após a maturidade fisiológica as sementes estão sujeitas ao envelhecimento e processo de deterioração que pode ser caracterizado por uma série de alterações degenerativas que provocam a queda progressiva e irreversível do vigor, e posterior perda da viabilidade dessas. Neste contexto, as alterações associadas ao processo de deterioração refletem no vigor das sementes e vêm sendo estudadas por diversos autores. De acordo com Ventura *et al.* (2012), o vigor da semente depende da capacidade dessas de resistir aos efeitos deletérios do envelhecimento. Dentre esses efeitos pode ser citado o estresse oxidativo induzido pelas espécies reativas de oxigênio (EROs) (ZANG *et al.*, 2021).

O estresse oxidativo é resultado do desequilíbrio entre produção e eliminação de EROs (FERREIRA *et al.*, 2021) e causa danos celulares nos tecidos vegetais. As EROs são subprodutos naturais do metabolismo com origem na redução incompleta ou parcial do oxigênio (KUMAR *et al.*, 2015) e que abrangem moléculas como o radical superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$) (NOCTOR; REICHHELD; FOYER, 2018). Nas sementes, o acúmulo excessivo dessas moléculas está relacionado a perda da atividade de enzimas (EBONE; CAVERZAN; CHAVARRIA, 2019), peroxidação lipídica, carbonilação de proteínas, danos genéticos (ZANG *et al.*, 2021) e reação de Maillard (XING *et al.*, 2023).

Sabe-se que a intensidade do dano celular, ocasionado pelo estresse oxidativo, é determinada pela capacidade das células de eliminar as EROs. Dessa forma, o sistema enzimático antioxidativo desempenha um papel fundamental na homeostase celular, neutralizando as EROs. Esse está positivamente associado com a germinação e com o potencial de armazenamento das sementes (BAILLY, 2004). Para Xing *et al.* (2023), a redução da atividade de enzimas antioxidantes pode intensificar o declínio do vigor das sementes.

O sistema enzimático antioxidativo das sementes é composto pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX), peroxidase (POX), além de outras (SHARMA *et al.*, 2012). A SOD é considerada a primeira barreira enzimática contra o estresse oxidativo e pode ser encontrada na matriz mitocondrial, no cloroplasto e citosol,

promovendo a remoção do radical superóxido e produzindo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio molecular. Em condições de estresse, o H_2O_2 é eliminado pela ação da CAT, que está presente em peroxissomos (MARCOS-FILHO, 2015). A APX também pode eliminar parte do H_2O_2 por meio da redução desse em H_2O utilizando o ascorbato como um agente redutor (MITLLER; BLUMWALD, 2017). As peroxidases que apresentam alta atividade com guaiacol como substrato podem ser chamadas de POX e estão presentes na parede celular, citosol e vacúolo (DOORN; KETSA, 2014). Essas degradam o H_2O_2 enquanto o substrato é convertido em radical livre.

Durante a deterioração de sementes, um evento importante é o dano à membrana plasmática que resulta na perda da permeabilidade seletiva, bem como no aumento dos danos ao material genético e consumo de reservas (EBONE; CAVERZAN; CHAVARRIA, 2019). A peroxidação de lipídeos é o principal fator que contribui para o dano à membrana (RATAJEZAK *et al.*, 2019) e ocorre através da interação entre EROs e ácidos graxos insaturados (SCANDALIOS, 1993), causando a liberação de subprodutos, incluindo aldeídos reativos como o malonaldeído (MDA) (BAILLY *et al.*, 1996). Assim, o MDA pode ser considerado como um biomarcador de peroxidação lipídica e da deterioração.

Há evidências que o conteúdo de MDA pode estar positivamente correlacionado com a carbonilação de proteínas nas sementes, favorecendo as reações do tipo Maillard (XING *et al.*, 2023; LI *et al.*, 2017). Essas reações não são gerenciadas por enzimas e envolvem a glicação de açúcares redutores (como glicose e frutose) com aminoácidos (STRELECA *et al.*, 2008). Desta forma, a presença de açúcares redutores também pode induzir a deterioração dos componentes proteicos. De acordo com Marcos-Filho (2015), sementes com altos teores desses açúcares são predispostas a rápida deterioração durante a secagem e/ou armazenamento. Porém, esse autor também relata que a maioria das sementes apresentam baixas concentrações de açúcares redutores, exceto se essas forem altamente recalcitrantes, estiverem imaturas ou tenham sido expostas a condições quentes e úmidas. Devido aos açúcares redutores comprometerem a função biológica de proteínas e favorecerem a liberação de compostos tóxicos, o acúmulo destes pode reduzir a longevidade das sementes (LEPRINCE *et al.*, 2017).

Altas temperaturas e umidade relativa (UR) estão diretamente relacionadas com a maior velocidade de deterioração das sementes por provocarem aumentos excessivo nas taxas respiratórias e atividade metabólica dessas, respectivamente, favorecendo também a produção de EROs. Durante a maturação das sementes são acumuladas macromoléculas como carboidratos, proteínas e lipídios que atuam no suprimento das necessidades metabólicas do embrião até o desenvolvimento inicial de plântula. As reservas armazenadas nas sementes são

convertidas em energia para o metabolismo, através do processo de respiração, que é composto por quatro etapas: glicólise, rota oxidativa das pentoses fosfato, ciclo do ácido cítrico e fosforilação oxidativa. Com o aumento da UR do ambiente de exposição das sementes, os teores de água dessas aumentam, até que o equilíbrio higroscópico seja alcançado. À medida que a umidade das sementes aumenta, a respiração é ativada, levando à degradação de reservas acumuladas e ao aumento da produção EROs (RANGANATHAN; GROOT, 2023), principalmente na etapa de fosforilação oxidativa (EBONE; CAVERZAN; CHAVARRIA, 2019). Acréscimos na temperatura intensificam a velocidade dos processos bioquímicos ligados à deterioração (DELOUCHE *et al.*, 1973).

O consumo de reservas em sementes com níveis metabólicos acelerados aliado a perda da integridade das membranas, devido aos danos oxidativos, afeta a atividade das mitocôndrias, reduzindo a eficiência do mecanismo liberador de energia (MARCOS-FILHO, 2015). O gasto de compostos de reservas, como carboidratos solúveis, resulta em esgotamento de substrato para respiração, somado a isso, o dano na membrana ocasiona lixiviação de solutos, fazendo com que haja perda de cátions, ânions e açúcares (EBONE; CAVERZAN; CHAVARRIA, 2019). As alterações nos níveis de carboidratos solúveis e a incapacidade das mitocôndrias no fornecimento eficiente de energia durante o processo de germinação, prejudica a mobilização de reservas para o eixo embrionário, o que pode levar a um crescimento insatisfatório da plântula ou até a morte da semente. Em consequência disso, reduções nos conteúdos de açúcares totais das sementes têm sido associados a perda de qualidade fisiológica dessas (CHANDEL; KHAN; GANDOTRA, 2015).

Além disso, a redução nos níveis dos açúcares não redutores, como a sacarose e os oligossacarídeos da família da rafinose, pode impactar negativamente no grau de proteção à integridade das membranas (MARCOS-FILHO, 2015). Há um consenso no fato que esses açúcares são importantes para formação do estado vítreo. O citoplasma das sementes, nesse estado, apresenta-se extremamente viscoso e com restrição na mobilidade molecular, permitindo a estabilização dos componentes celulares (RANGANATHAN; GROOT, 2023). Em função disso, as taxas de reações bioquímicas oxidativas são retardadas, prologando assim a longevidade das sementes (SUN, 1997; MURTHY; KUMAR; SUN, 2003; BALLESTEROS; WALTERS, 2011). Para Matilla (2022), o estado vítreo previne o dano oxidativo celular e mantém a estrutura das macromoléculas e membranas.

Em síntese, muitos eventos deletérios ocorrem no decorrer da deterioração. Esses eventos envolvem alterações nas membranas, em enzimas, proteínas, no metabolismo de carboidratos, atividade respiratória, danos genéticos, entre outros (COOLBEAR, 1995). Nesse

contexto, a determinação de marcadores bioquímicos que permitem identificar tais eventos, pode se constituir de uma ferramenta importante para indicar o nível de deterioração das sementes, se os resultados forem avaliados em conjunto com os de qualidade fisiológica.

Oliveira *et al.* (2020) concluíram que as enzimas SOD e CAT são bons marcadores do status de qualidade de sementes de milho híbrido ao longo do armazenamento, podendo ser observada redução na atividade enzimática após 9 meses em consequência da deterioração dessas. Timóteo e Marcos-Filho (2013) ao estudar os efeitos de diferentes ambientes de armazenamento sobre o potencial fisiológico de sementes de três genótipos de milho, relataram que nas sementes mais deterioradas houve acentuada diminuição ou mesmo ausência de atividade da enzima CAT. Segundo esses autores, a atividade reduzida dessa enzima pode resultar em menor capacidade de prevenção de danos oxidativos, tornando as sementes sujeitas à perda da viabilidade de forma mais rápida. Já Heberle *et al.* (2019) verificaram decréscimos na atividade enzimática da POX e CAT com o aumento do período e da temperatura de armazenamento das sementes de milho.

Avaliando as alterações bioquímicas e fisiológicas em sementes de milho causadas pelo envelhecimento artificial das mesmas, Spinola *et al.* (2000) constataram que as mudanças eletroforéticas das enzimas peroxidase foram mais efetivas em comparação com os testes tradicionais de vigor na indicação da deterioração. Galvão *et al.* (2014) também evidenciaram que as alterações enzimáticas da peroxidase é eficiente para monitorar e caracterizar a qualidade fisiológica de sementes de milho. De acordo com Mansouri-Far *et al.* (2015), o envelhecimento artificial da semente de milho está associado a alterações na atividade das enzimas antioxidantes (SOD, CAT e POX) e vazamento de eletrólitos. Em um estudo similar, Kapilan (2015) relatou declínio na germinação e na atividade enzimática da CAT e APX em sementes de milho envelhecidas artificialmente.

Muitos estudos sobre deterioração de sementes utilizam a metodologia do teste de envelhecimento acelerado, desenvolvido para avaliação do vigor, para promover o envelhecimento artificial das sementes (PADILHA; COELHO; EHRHARDT-BROCARD, 2022; SILVA *et al.*, 2023; DANTAS *et al.*, 2019; SPINOLA; CÍCERO; MELO, 2000). Assim, a exposição das sementes a diferentes períodos de envelhecimento artificial tem sido utilizada em pesquisas para se obter uma estimativa do nível de deterioração e da armazenabilidade dessas (WANG *et al.*, 2022; TIMÓTEO; MARCOS-FILHO, 2013; FANTAZZINI *et al.*, 2018; FREITAS *et al.*, 2004). Vários autores evidenciam que o envelhecimento artificial pode simular o envelhecimento natural que ocorre ao longo do armazenamento (RIVELA-TALAMANTES *et al.*, 2022; SURESH *et al.*, 2019; BARRETO; GARCIA, 2017). No entanto, a eficiência do

envelhecimento artificial para essa finalidade depende da temperatura, umidade relativa e do tempo de exposição das sementes ao estresse, além da espécie.

Ao confrontar os resultados de alterações bioquímicas em sementes de milho-doce, provocadas pelo envelhecimento artificial a 41 °C por 3 dias e pelo envelhecimento devido ao armazenamento em ambiente por 8 meses, Wang *et al.* (2022) verificaram que não houve diferença significativa no conteúdo MDA entre esses tratamentos. Todavia, é importante salientar, que nesse estudo os dados bioquímicos referentes ao desempenho das sementes de milho-doce antes do envelhecimento natural e artificial (controle) não foram comparados com os dos tratamentos anteriormente citados, gerando dúvidas na eficácia do conteúdo de MDA para detecção do nível de deterioração das sementes.

A análise dos efeitos do envelhecimento acelerado sobre membranas celulares e as mudanças bioquímicas em sementes de milho indicou aumento da peroxidação de lipídios e decréscimos em carboidratos de reservas e proteínas com a evolução da deterioração (BASAVARAJAPPA; SHETTY; PRAKASH, 1991). Ao estudar as mudanças nas concentrações de carboidratos solúveis em embriões de milho de sementes submetidas ao envelhecimento artificial (30 °C e 75% UR) por diferentes períodos, Bernal-Lugo e Leopold (1992) observaram redução na quantidade de rafinose e em monossacarídeos como glicose, frutose e galactose, durante a deterioração. Esses autores constataram que o declínio na concentração de sacarose em embriões de milho ocorre mais tarde que a diminuição da rafinose e que as reduções no conteúdo dos açúcares redutores poderiam ser explicadas pela participação desses nas reações de Amadori e Maillard. Além disso, foi relatado que os açúcares redutores presentes no embrião se apresentavam em quantidades pequenas e foram praticamente esgotados nos primeiros 30 dias, já a sacarose permaneceu constante durante cerca de 35 dias, apresentando um declínio subsequente, porém não sendo observado ausência dessa até o último período de envelhecimento artificial estudado (90 dias) (BERNAL-LUGO; LEOPOLD, 1992). Por outro lado, Ovcharov e Koshelev (1974) *apud* Koster e Leopold (1988) verificaram a presença de açúcares redutores (glicose e frutose) e desaparecimento de sacarose em sementes de milho que perderam sua capacidade de germinar. Para Murthy *et al.* (2003), aumentos na concentração de açúcares redutores durante a deterioração de sementes também podem ocorrer devido a hidrólise de sacarose e oligossacarídeos.

Desta forma, percebe-se que diversas pesquisas têm contribuído para compreensão dos mecanismos ligados ao envelhecimento das sementes. Porém, informações sobre as alterações bioquímicas que ocorrem durante a deterioração das sementes ainda são limitadas e em alguns casos contraditórias, o que justifica a realização de mais estudos que abordem esse tema.

Particularmente, para sementes de milho-doce os mecanismos que resultam na perda de vigor e viabilidade das sementes ainda precisam ser elucidados. Além disso, são escassos trabalhos publicados que investigaram se as manifestações da deterioração em sementes de milho-doce devido ao envelhecimento artificial e natural são semelhantes em intensidade e ocorrência.

2.4. Espectroscopia no infravermelho próximo (NIR)

Recentemente, algumas técnicas emergentes têm mostrado potencial para avaliação da qualidade fisiológica das sementes, apresentando vantagens em relação aos testes tradicionais de vigor por serem não-destrutivas, permitirem rapidez na obtenção dos dados, não necessitar preparo da amostra, gerando economia de tempo e reagentes, bem como por reduzirem a influência da subjetividade humana (XING *et al.*, 2023; PRIYA; MANICKAVASAGAN, 2021). Neste contexto, além de possuir essas vantagens, a técnica de espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) se destaca por permitir analisar substâncias químicas no interior das sementes (XING *et al.*, 2023). Assim, considerando que a deterioração é um processo oxidativo que promove alterações nos compostos que constituem as sementes, tal técnica pode ser promissora para classificar lotes de sementes quanto à qualidade fisiológica, detectando o grau de envelhecimento dessas.

Na espectroscopia no infravermelho próximo as informações espectrais são obtidas mediante a absorção da radiação eletromagnética em comprimentos de onda na faixa de 780-2500 nm (XIA *et al.*, 2019). Nessa faixa é possível identificar a presença de grupos funcionais C-H, N-H, O-H, através da interação da amostra de interesse com a radiação eletromagnética que é absorvida por água e compostos orgânicos como carboidratos, lipídios e proteínas (LARIOS *et al.*, 2020). Dessa forma, são obtidos espectros que contêm picos de comprimentos de onda relacionados aos compostos químicos que são alterados de acordo com o nível e qualidade das sementes (SOUZA *et al.*, 2023).

De acordo com Xia *et al.* (2019), as informações analíticas presentes nos espectros NIR são difíceis de explicar e selecionar devido a sua natureza multivariada, sendo impossível distinguir as diferenças espectrais entre as amostras. Porém esses autores afirmam que quando combinados grandes quantidades de dados espectrais com algoritmos quimiométricos avançados é possível extrair informações úteis, com rapidez e eficiência. Diante dessa informação, se faz necessário a adoção de etapas que envolvem pré-processamento de dados espectrais e a aplicação de algoritmos de aprendizado de máquina para permitir modelar uma relação entre os dados espectrais e a composição química das sementes. Essas etapas são

importantes para detectar possíveis erros grosseiros e amostras anômalas (outliers), buscando extrair o máximo de informações dos dados (SENA; ALMEIDA, 2018).

As fontes mais frequentes de variância indesejável nos espectros NIR são os ruídos, espalhamento e desvios de linha-base (ENGEL *et al.*, 2013). Essas variâncias podem prejudicar a habilidade preditiva do modelo de regressão ou classificação, na etapa posterior. Portanto, no pré-processamento de dados tais variâncias devem ser eliminadas ou amenizadas, por meio de métodos de pré-tratamento espectral. Entre esses métodos estão a primeira e segunda derivada de Savitzky-Golay (XIA *et al.*, 2019). Os métodos de pré-processamento devem ser utilizados com precaução, considerando a característica do espectro, uma vez que uma escolha inadequada pode resultar em perda de informações importante (PASQUINI, 2018).

Os algoritmos de aprendizado de máquina são a base para construção de modelos para classificar atributos de qualidade de sementes, pois podem capturar relações lineares e não lineares com alta precisão (MEDEIROS *et al.*, 2020b). A análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) se destaca entre os algoritmos existente, por ser uma ferramenta de aprendizagem supervisionada que possibilita uma separação eficiente de dados espectrais em classes previamente definidas. O método PLS-DA é comumente empregado na classificação de dados de alta dimensionalidade e com variáveis altamente correlacionadas (BRERETON; LLOYD, 2014). Vários autores constataram a eficiência desse algoritmo na construção de modelos preditivos para avaliação da qualidade de sementes com base nos espectros NIR (SOARES *et al.*, 2024; SILVA *et al.*, 2024a; SOUZA *et al.*, 2023; VENKATESA *et al.*, 2020; KUSUMANINGRUM *et al.*, 2018).

Atualmente, o espectrômetro com transformada de Fourier (FT) é o instrumento mais utilizado para obtenção de um espectro no infravermelho (CASTRO; SILVA, 2018). O equipamento denominado espectrômetro de dispersão foi utilizado por várias décadas, porém está cada vez mais em desuso, devido ao espectrômetro FT apresentar maior sensibilidade ou razão sinal/ruído em relação a esse (BARBOSA, 2007). Na região do infravermelho próximo, o uso de espectrômetros com transformada de Fourier possibilitou a obtenção de espectros com determinação de frequências precisa, de alta resolução e reprodutibilidade, além de maior rapidez nas análises (QIU *et al.*, 2019; CASTRO; SILVA, 2018).

Ambrose *et al.* (2016) ao investigarem a eficácia do uso da espectroscopia no infravermelho próximo com transformada de Fourier (FT-NIR) combinada com o método PLS-DA, para classificação da viabilidade de sementes de milho, obtiveram modelos com acurácias próximas de 100% na calibração e com capacidade preditiva superior a 95%. Jia *et al.* (2016) observaram que com o auxílio da espectroscopia NIR e de algoritmos de classificação foi

possível distinguir sementes de milho danificadas por geadas e discriminar sementes viáveis e não viáveis. A técnica NIR também já foi utilizada para determinar o grau de umidade de sementes dessa espécie (FINNEY; NORIS, 1978). Além disso, para milho, há relatos sobre o uso do NIR para analisar teor de óleo, amido e proteína (JIANG *et al.*, 2007; SPIELBAUER *et al.*, 2009; WU *et al.*, 2023), bem como a presença de infestação fúngica (FALADE *et al.*, 2017) e micotoxinas (GIACOMO; STEFANIA, 2013; PEARSON *et al.*, 2001).

Para sementes de milho-doce, estudos com espectroscopia NIR ainda são incipientes. Qiu *et al.* (2019) adotaram a técnica FT-NIR e análises discriminantes para classificar sementes de diferentes cultivares de milho-doce. De acordo com esses autores, os quatro algoritmos testados alcançaram altas acurácias nas etapas de calibração e validação dos modelos. Esses resultados sugerem que os modelos adequados poderiam ser integrados a máquinas de classificação com a finalidade de selecionar lotes de sementes com alta pureza (QIU *et al.*, 2019). As acurácias dos modelos de previsão demonstraram que a espectroscopia FT-NIR foi eficiente para detectar sementes de milho superdoce inviáveis, danificadas por superaquecimento e envelhecimento artificial (QIU *et al.*, 2018). Para os autores citados, a distinção de sementes inviáveis das viáveis pode ser explicada, principalmente, pelas alterações químicas resultantes do processo de deterioração, que foram capturadas pela espectroscopia NIR. Recentemente, em diferentes lotes de sementes de milho-doce, Queiroz (2022) utilizou o teste de germinação para definir classes de qualidade, associando essas a dados espectrais coletados anteriormente nas mesmas sementes por meio de FT-NIR, obtendo modelos com altas acurácias principalmente quando os dados foram submetidos a primeira derivada de Savitz-Golay, antes da construção desses com o classificador PLS-DA.

Diante do exposto, observa-se que a espectroscopia no infravermelho próximo vem apresentando desempenho satisfatório para avaliação da viabilidade de sementes de milho-doce de forma rápida, econômica e não destrutiva. Entretanto, na maioria desses estudos a inviabilidade das sementes foi causada por métodos de envelhecimento artificial, sendo escassas pesquisas que englobem também, em um único modelo preditivo mais robusto, dados espectrais de sementes envelhecidas naturalmente. Ademais, há ausência de informações sobre a eficácia da técnica NIR para classificação de sementes de milho-doce quanto ao vigor. Deste modo, pesquisas com enfoque nesses assuntos são justificáveis e fundamentais para maior compreensão do potencial da tecnologia NIR na detecção do nível de deterioração das sementes de diferentes cultivares de milho-doce.

3. MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi conduzida no Laboratório de Pesquisa de Sementes do Departamento de Agronomia da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. Foram utilizadas sementes de milho-doce das cultivares Doce Cristal (BR-402) e Superdoce (BR-400), safra 2021/2022, fornecidas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA Hortaliças. As sementes foram expurgadas com fosfina (GASTOXIN® B57; 2 pastilhas de 3 g/m³ equivalente a dose de 2 g de fosfina/m³) e classificadas em peneira de crivo circular com diâmetro de 7,14 mm (18/64”). Em seguida, as sementes foram submetidas ao envelhecimento natural (ensaio I) e artificial (ensaio II) conforme descrito a seguir.

3.1. Ensaio I: Envelhecimento natural (armazenamento)

Para cada cultivar, amostras de 6 Kg de sementes foram homogeneizadas e acondicionadas em embalagens permeáveis (sacos de papel Kraft Multifolhado). Metade da amostra (3 kg) foi armazenada em câmara fria (10 °C ± 2,6 e 56% ± 5,3 de UR) e a outra metade em ambiente não controlado (23,5 °C ± 1,8 e 64% ± 6,2 de UR), por um período de 12 meses, a partir de julho de 2021.

O monitoramento da temperatura e da umidade relativa do ar, no ambiente não controlado foi realizado durante todo período de armazenamento por meio de um termohigrômetro digital, sendo os dados apresentados na Figura 1.

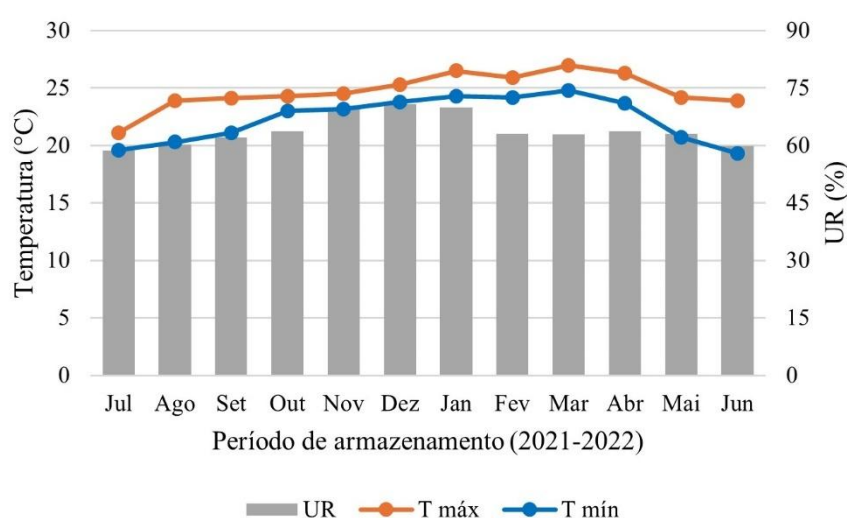


Figura 1. Médias mensais da temperatura e umidade relativa do ar (UR) obtidas no ambiente de armazenamento não controlado durante doze meses.

As sementes recém-colhidas (inicial) e armazenadas por 3, 6, 9 e 12 meses, em câmara fria (CF) e em ambiente não controlado (AMB), foram submetidas a testes para avaliação da qualidade física e fisiológica, determinações bioquímicas e à coleta de dados espectrais no FT-NIR, conforme metodologias descritas nos itens 3.3, 3.4 e 3.5, respectivamente.

3.2. Ensaio II: Envelhecimento artificial

As sementes recém-colhidas de cada cultivar foram distribuídas, em camada uniforme, sobre tela metálica acoplada em caixa plástica tipo gerbox, contendo ao fundo 40 mL de água destilada. As caixas foram tampadas de modo a obter 100% UR em seu interior, e mantidas em câmara tipo BOD à temperatura de 41 °C por períodos de 24, 48, 72 e 96 horas. Para o tratamento controle, foram utilizadas sementes sem exposição ao envelhecimento artificial (período 0).

Após cada período de envelhecimento artificial, as sementes foram submetidas à secagem natural até atingir a umidade inicial (aproximadamente 12%) e, posteriormente, aos testes e determinações descritas nos itens 3.3, 3.4 e 3.5.

3.3. Avaliação da qualidade física e fisiológica

3.3.1. Determinação do grau de umidade

Foi determinado em estufa a 105 °C, por 24 h (BRASIL, 2009). Foram utilizadas quatro subamostras de 25 sementes para cada tratamento. Os resultados foram expressos em porcentagem (base úmida).

3.3.2. Densidade relativa e integrada

Inicialmente foram obtidas imagens radiográficas digitais das sementes. Para esse fim, foram utilizadas 200 sementes por tratamento, totalizando 325 imagens radiográficas por cultivar, sendo cada imagem composta por 8 sementes. As sementes foram fixadas de forma ordenada em papel adesivo para permitir a identificação individual nos testes subsequentes (itens 3.3.3 e 3.3.4). Em seguida, as imagens radiográficas digitais foram geradas utilizando o equipamento Faxitron, modelo MX-20 (Faxitron X-ray Corp. Wheeling, IL, EUA), configurado com tempo de exposição à radiação de dez segundos, tensão de 27 kV, distância focal de 27,8 cm e contraste da imagem calibrada em 3211 (largura) x 2756 (centro). Posteriormente a aquisição, as imagens radiográficas foram salvas no formato TIFF e analisadas de maneira semiautomatizada pelo software ImageJ®. Foram obtidas as variáveis densidade relativa (DR)

e densidade integrada (DI). A DR refere-se a soma dos valores de cinza de todos os pixels na área selecionada dividida pelo número de pixels da seleção (expresso em cinza pixel⁻¹). Já a DI é definida como a soma dos valores dos pixels da imagem ou seleção (expresso em cinza mm² pixel⁻¹), sendo equivalente ao produto de área e valor cinza médio (DR).

3.3.3. Teste de germinação

Quatro repetições de 50 sementes foram distribuídas em papel toalha umedecido com a quantidade de água equivalente a 2,5 vezes o peso do papel seco. Os rolos foram mantidos em germinador a 25 °C. Determinou-se a porcentagem de plântulas normais obtidas aos 7 dias após a semeadura (BRASIL, 2009).

3.3.4. Primeira contagem de germinação

Realizada juntamente com o teste de germinação, calculando-se a porcentagem de plântulas normais obtidas no quarto dia após a semeadura (BRASIL, 2009).

3.3.5. Condutividade elétrica

Quatro repetições de 50 sementes foram pesadas em balança com precisão de 0,001g e colocadas em copos plásticos contendo 75 mL de água destilada, durante 24 horas, a 25 °C. Após este período, foi determinada a condutividade elétrica em condutivímetro (Digimed, modelo DM-32). Os resultados foram expressos em $\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$ de sementes (VIEIRA; MARCOS-FILHO, 2020).

3.3.6. Teste de Frio

Foi conduzido com quatro repetições de 50 sementes. As sementes foram distribuídas sobre duas folhas de papel toalha, previamente umedecidas com água equivalente a três vezes a sua massa. Em seguida, as sementes foram cobertas com uma fina camada de solo (60 mL) e com uma terceira folha para confecção dos rolos, que foram colocados em sacos plásticos e mantidos em incubadora tipo BOD a 10 °C por sete dias. Após esse período, os rolos foram retirados dos sacos plásticos e transferidos para germinador a 25 °C por quatro dias para então se proceder a avaliação da porcentagem de plântulas normais.

3.3.7. Envelhecimento acelerado

As sementes foram distribuídas em camada única e uniforme sobre a tela metálica acoplada em caixa plástica tipo gerbox contendo, ao fundo, 40 mL de água. As caixas foram tampadas de modo a obter 100% UR em seu interior, e mantidas em incubadora BOD a 41 °C por 72 horas. Decorrido este período, foi conduzido o teste de germinação conforme descrito anteriormente, obtendo-se a porcentagem de plântulas normais no quarto dia após a semeadura.

3.3.8. Comprimento de plântula

Foram utilizadas quatro repetições de 20 sementes dispostas no terço superior do papel toalha umedecido com água destilada na proporção 2,5 vezes o peso do papel seco. As sementes foram distribuídas em duas fileiras de 10 sementes espaçadas entre si, e com a extremidade da radícula direcionada para a parte inferior do papel (KRZYZANOWSKI *et al.*, 2020). Os rolos foram confeccionados e mantidos em germinador a 25 °C. No quarto dia após a semeadura, as raízes secundárias das plântulas foram removidas e, em seguida, as plântulas foram fotografadas juntamente com uma régua graduada em centímetros. Para a aquisição das imagens foi utilizada uma caixa fechada de MDF, contendo um suporte tipo *copystand* acoplado e uma base fotográfica, feita de folha de espuma vinílica acetinada (E.V.A) de coloração azul. A intensidade luminosa incidente sobre a base fotográfica foi de 340 lux e as imagens fotográficas foram obtidas com o auxílio de uma câmera digital Canon EOS Rebel T7+, configurada a 1/15 segundos de velocidade de disparo do obturador e f/4.0 de abertura do diafragma. A câmera foi mantida a uma altura de 40 cm e angulação de 90° em relação a base fotográfica. Posteriormente, o comprimento total (parte aérea e raiz principal) das plântulas foi determinado de forma semiautomatizada por meio do software ImageJ®. Os resultados foram expressos em mm plântula⁻¹.

3.3.9. Emergência de plântulas

Foi conduzido em câmara de crescimento utilizando-se quatro repetições de 25 sementes semeadas a 3,0 cm de profundidade em bandejas plásticas contendo mistura de solo e areia, na proporção de 1:1, umedecida até atingir 60% da capacidade de retenção (BRASIL, 2009). Foram feitas contagens diárias do número de plântulas emergidas até a completa estabilização do estande. A porcentagem de emergência foi calculada computando-se o total de plântulas emergidas (maior que 1 cm) após a completa estabilização do estande que ocorreu no 7° dia após a semeadura.

3.3.10. Índice de velocidade de emergência

Calculado a partir de valores diários do número de plantas emergidas do primeiro ao último dia de duração do teste de emergência, conforme Maguire (1962), e com o auxílio do pacote *SeedCalc* do software R (SILVA; MEDEIROS; OLIVEIRA, 2019).

3.4. Caracterização bioquímica

3.4.1. Determinação da atividade de enzimas antioxidativas e de proteínas

Para determinação da atividade das enzimas do sistema de defesa antioxidativo, foram utilizadas quatro repetições de 25 sementes, para cada tratamento, pré-embebidas em papel toalha umedecido e mantidas em germinador a 25 °C por 24 h. As sementes foram liofilizadas (Liofilizador Scanvac CoolSafe) e maceradas utilizando-se um moinho de bolas (Tecnal, modelo TE-350), de forma a obter-se um material com granulometria finíssima. O material foi armazenado em microtubos tipo *ependorf* e mantido em dessecador até o momento das avaliações. Foram quantificadas as atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD; EC 1.15.1.1), catalase (CAT; EC 1.11.1.6), ascorbato peroxidase (APX; EC 1.11.1.11) e peroxidase (POX; EC 1.11.1.7) por meio de leituras da absorbância em espectrofotômetro de microplaca, modelo Multiskan GO.

Extração enzimática: os extratos enzimáticos brutos foram obtidos a partir de 200 mg de sementes, previamente liofilizadas e maceradas, seguido da adição de 1,9 mL do meio de extração. Em seguida, foram realizadas duas centrifugações a 14.000 rpm por 15 min., a 4 °C, e o sobrenadante foi coletado para as análises posteriores. O meio de extração consistiu em tampão fosfato de potássio (0,1 M, pH 6,8), ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (0,1 mM), fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) (1,0 mM) e polivinilpolipirrolidona (PVPP) 1% (p/v) (PEIXOTO *et al.*, 1999).

Determinação do teor de proteína: os teores de proteínas dos extratos enzimáticos foram determinados pelo método de Bradford (1976), utilizando albumina bovina (BSA) como padrão. Para tanto, 20 µL do extrato enzimático bruto foram adicionados a 200 µL do reagente de Bradford, seguido de agitação. Após 15 minutos, foi realizada a leitura da absorbância da amostra em espectrofotômetro de microplaca a 595 nm.

3.4.1.1. Superóxido dismutase (SOD)

A atividade da enzima superóxido dismutase foi determinada pela adição de 20 μL a 180 μL de meio de reação. O meio de reação foi constituído de tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 7,8), metionina 13 mM, azul p-nitro tetrazólio (NBT) 75 μM , EDTA 0,1 mM e riboflavina 2 μM (DEL LONGO *et al.*, 1993). A reação foi conduzida a 25 °C, em placa de Elisa colocada dentro de uma câmara de reação iluminada com uma lâmpada fluorescente de 15 W. Após 5 minutos de exposição à luz, a iluminação foi interrompida e a formazana azul, proveniente da fotorredução do NBT, foi determinada pela absorbância medida a 560 nm. Uma outra placa contendo o mesmo meio de reação, porém mantida no escuro pelo mesmo período, serviu de branco e o valor de absorbância encontrado, no mesmo comprimento de onda, foi subtraído da leitura das amostras que receberam iluminação. Os resultados foram expressos em $\text{U min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína, considerando-se que uma unidade de SOD é a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a fotorredução do NBT (BEAUCHAMP; FRIDOVICH, 1971).

3.4.1.2. Catalase (CAT)

Foi determinada a atividade da enzima catalase utilizando-se 10 μL de extrato bruto adicionado a 190 μL de meio de reação. O meio de reação foi composto de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0) e H_2O_2 12,5 mM (HAVIR; MCHALE, 1987). O decréscimo na absorbância a 240 nm, foi medido durante dois minutos de reação, a 25 °C. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 36 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (ANDERSON; PRASAD; STEWART, 1995). Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína.

3.4.1.3. Peroxidase do ascorbato (APX)

Para determinação da atividade da enzima peroxidase do ascorbato, 15 μL de extrato bruto enzimático foi acrescido em 185 μL de meio de reação. No meio de reação foi utilizado fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0), ácido ascórbico 0,8 mM, EDTA 0,1 mM e H_2O_2 1,0 mM. A atividade da APX foi estimada monitorando o declínio na absorbância em 290 nm, a 25°C, durante dois minutos de reação e calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar 2,8 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (NAKANO; ASADA, 1981). Os resultados foram expressos em $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína.

3.4.1.4. Peroxidase (POX)

A atividade da peroxidase foi determinada pela adição de 50 μL do extrato enzimático bruto a 150 μL de meio de reação, constituído de tampão fosfato de potássio 25 mM (pH 6,8), pirogalol 20 mM e H_2O_2 20 Mm (adaptado de Kar e Mishra (1976)). A produção de purpurogalina foi determinada por meio do incremento da absorbância a 420 nm, a 25°C, durante dois minutos de reação. O coeficiente de extinção molar de 2,47 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ foi utilizado para estimar a atividade enzimática (CHANCE; MAEHL, 1955) e os resultados foram expressos em nmol min^{-1} proteína.

3.4.2. Conteúdo de Malonaldeído (MDA)

Foram utilizadas quatro repetições de 25 sementes por tratamento. As sementes foram liofilizadas e maceradas em moinho de bolas. O conteúdo de MDA foi determinado pela reação do ácido tiobarbitúrico (TBA), seguindo a metodologia proposta por Heath e Packer (1968). Amostras de 250 mg do material macerado foram homogeneizadas com 1,7 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (p/v). Após centrifugação (14.000 rpm por 15 min, a 4 °C), uma alíquota de 0,5 mL foi transferida para um tubo de ensaio com tampa de rosca (autoclavável). Em seguida, foi adicionado 1,5 mL do meio de reação constituído de TBA 0,5% (p/v) e TCA 20%. Os tubos contendo as amostras foram fechados e incubados em banho-maria a 90 °C por 30 min com agitação. Decorrido este período, as amostras foram imediatamente resfriadas em banho de gelo, transferidas para microtubos e centrifugadas a 14.000 rpm por 10 minutos. A absorbância da amostra foi lida em espectrofotômetro (Thermo Scientific, modelo Genesys 10S UV-Vis) nos comprimentos de onda de 532 nm e 600 nm. O conteúdo de MDA foi calculado utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 155 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ e os resultados expressos em nmol g^{-1} de massa seca.

3.4.3. Determinação dos teores de açúcares

Utilizou-se quatro repetições de 25 sementes liofilizadas (Liofilizador Scanvac CoolSafe) e maceradas em moinho de bola (Tecnal, modelo TE-350), por tratamento. Os açúcares foram extraídos de 30 mg do material em 2 mL de etanol 80% a 70 °C, seguindo de centrifugação a 14.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e armazenado a 4 °C até a quantificação dos açúcares solúveis totais (AST) e açúcares redutores (AR).

3.4.3.1. Açúcares solúveis totais (AST)

A quantificação de AST foi realizada de acordo com o método do fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956), sendo utilizada sacarose 1% para a confecção da curva padrão. O meio de reação foi composto por 50 µL do extrato etanólico contendo a amostra, 200 µL de água ultrapura, 250 µL de fenol a 5% e 1,25 mL de H₂SO₄ concentrado. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Thermo Scientific, modelo Genesys 10S UV-Vis) a 490 nm e os resultados expressos em mg g⁻¹ de massa seca.

3.4.3.2. Açúcares redutores (AR)

Os AR foram quantificados de acordo com uma versão adaptada da metodologia do ácido dinitrossalicílico (DNS) (GONÇALVES *et al.*, 2010). Utilizou-se frutose 0,2% para a confecção da curva padrão. Em cada tubo de ensaio adicionou-se 500 µL do extrato etanólico (contendo a amostra) e 500 µL do reagente DNS. Em seguida, os tubos foram fechados, e aquecidos em banho de água fervente por 5 minutos. Após esse período, as amostras foram imediatamente resfriadas em banho de gelo e, posteriormente, foram adicionados 4 mL de água destilada em cada tubo, sendo as absorbâncias lidas, individualmente, em espectrofotômetro (Thermo Scientific, modelo Genesys 10S UV-Vis) a 540 nm. Os resultados foram expressos em mg g⁻¹ de massa seca.

3.4.3.3. Açúcares não redutores (ANR)

O teor de ANR foi obtido pela diferença entre o teor de açúcares solúveis totais e o teor de açúcares redutores, com resultados expressos em mg g⁻¹ de massa seca.

3.5. Espectroscopia do infravermelho próximo (NIR)

Foram utilizadas 100 sementes, por tratamento. Os espectros NIR das sementes foram obtidos em uma sala climatizada a 21 °C e por meio de um espectrômetro de infravermelho próximo com transformada de Fourier (FT-NIR) (Thermo Scientific, modelo Antaris II). Foram coletados dados espectrais de sementes individuais posicionadas com o lado do embrião direcionado para a janela do espectrômetro. Utilizou-se como porta-amostra um acessório do próprio espectrômetro, com tamanho adequado para as sementes e com superfície em quartzo. O acessório foi sobreposto com um cilindro de ouro, impedindo a interferência externa de feixes de luz nos resultados espectrais. Para cada amostra, 3.111 pontos foram coletados por espectro,

em uma faixa de número de onda de 10.000 a 4.000 cm^{-1} (1.000 a 2.500 nm) e resolução de 4 cm^{-1} . Os espectros de reflectância difusa no NIR foram expressos em absorbância. Um arquivo contendo o espectro médio de 32 varreduras sucessivas foi gerado, para cada semente, e salvo para análise posterior.

Após a aquisição de dados espectrais, as mesmas sementes foram avaliadas em relação à germinação e ao vigor. Para esse fim, foi conduzido o teste de germinação, com quatro repetições de 25 sementes, e simultaneamente, foi realizada a primeira contagem de germinação e obtido o índice de velocidade de germinação. As sementes foram semeadas em papel toalha umedecidos com água destilada em volume equivalente a 2,5 vezes o peso do papel seco. Em seguida, confeccionou-se rolos que foram mantidos em germinador a 25 °C, por 7 dias. Durante este período, foram realizadas contagens diárias do número de plântulas normais. Os resultados do teste de germinação foram expressos em porcentagem de plântulas normais obtidas no 7º dia (BRASIL, 2009). A primeira contagem de germinação (PCG) consistiu na porcentagem de plântulas normais obtidas no quarto dia após a semeadura. O índice de velocidade de germinação (IVG) foi calculado conforme Maguire (1962), utilizando-se os dados obtidos nas contagens diárias do teste de germinação.

3.6. Análise estatística, pré-processamento de dados espectrais e modelagem

Para avaliação das alterações físicas, fisiológicas e bioquímicas em sementes de milho-doce, os ensaios I e II foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições. Os dados do ensaio I (envelhecimento natural) foram analisados em esquema de parcelas subdivididas. As condições de armazenamento (CF e AMB) foram alocadas nas parcelas e os períodos de armazenamento nas subparcelas. Os dados foram submetidos à análise de variância após testar a distribuição normal do erro e a homogeneidade das variâncias pelos testes de Shapiro-Wilk e Bartlett, respectivamente. As médias obtidas para as condições de armazenamento foram comparadas pelo teste F a 5% de probabilidade, e realizou-se a análise de regressão para os períodos de armazenamento. As médias obtidas durante o armazenamento também foram comparadas com as das sementes recém-colhidas (inicial) pelo teste de Dunnett, a 5% de probabilidade. No ensaio II (envelhecimento artificial), os dados foram submetidos à análise de regressão. As estimativas dos parâmetros da regressão foram analisadas pelo teste t ($P \geq 0,05$).

Foram estimadas ainda as distâncias generalizadas de Mahalanobis entre os resultados obtidos nos testes de germinação realizados durante o armazenamento e após os diferentes períodos de envelhecimento artificial. A partir da matriz de distâncias gerada foi realizada a

análise de agrupamento hierárquico (HCA) e confeccionou-se o dendrograma. A definição do método de agrupamento ocorreu com base no valor do coeficiente de correlação cofenética, sendo que esse foi numericamente superior para o método do centroíde (ou UPGMC) em comparação com os valores obtidos para os outros métodos hierárquicos de agrupamento (ligação simples, ligação completa, ligação média entre grupos, método Ward, método da mediana e método mcquitty). O número de grupos foi determinado pelo método Mojena (1977), considerando-se $k = 1,25$ como regra de parada, conforme sugerido por Milligan e Cooper (1985). Além disso, foi realizada a análise multivariada de componentes principais (PCA) com os dados obtidos nos testes para avaliação da qualidade (física e fisiológica) das sementes e na caracterização bioquímica.

No estudo de classificação da qualidade das sementes por meio de espectroscopia no infravermelho próximo, os dados do ensaio I e II foram analisados juntos. Assim, os tratamentos foram constituídos por sementes recém-colhidas, sementes armazenadas em duas condições (CF e AMB) durante 3, 6, 9 e 12 meses, e sementes envelhecidas artificialmente por 24, 48, 72 e 96 horas. Utilizou-se sementes submetidas a diferentes tratamentos de envelhecimento com a finalidade de obtenção de amostras com diferenciados níveis de deterioração para criação de modelos mais robustos de classificação da qualidade. Foram obtidos 1.300 (100 sementes x 13 tratamentos) espectros NIR, por cultivar.

Inicialmente, foram analisados os dados dos testes laboratoriais (G, PCG e IVG) rotineiramente utilizados para avaliação da germinação ou vigor das sementes. Esses testes foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições. Os dados foram testados quanto à distribuição normal dos erros pelo teste de Shapiro-Wilk e à homogeneidade de variâncias pelo teste de Bartlett. Em seguida, os dados foram submetidos à análise de variância e as médias obtidas foram agrupadas pelo teste de Scott-knott ($P \geq 0,05$). Os agrupamentos foram obtidos com a finalidade de permitir a distinção dos tratamentos (amostras de sementes) em classes conforme seu desempenho nos testes realizados. As classes definidas foram nomeadas de forma decrescente ao nível de germinação e vigor. Desta forma, a classe C1 foi composta por tratamentos constituídos por sementes de qualidade fisiológica superior. As sementes pertencentes as classes C2 e C3 foram identificadas como de qualidade intermediária ou inferior, a depender do teste realizado. Já a classe C4 foi identificada como de qualidade inferior em relação às demais.

As classes de germinação e vigor obtidas, por meio dos resultados de cada teste de qualidade, foram atribuídas aos dados espectrais originais (sem pré-processamento). Os dados espectrais foram organizados em uma matriz X (preditores) e as classes de sementes foram

organizadas no vetor Y (resposta). Desta forma, foram formados conjuntos de dados para criação de três modelos preditivos para a classificação da qualidade fisiológica das sementes (germinação e vigor), para cada cultivar. Os dados espectrais foram, então, submetidos aos pré-processamento pela primeira e segunda derivada de Savitzky-Golay, sendo formados conjuntos de dados para construção de mais seis modelos preditivos (3 rótulos obtidos conforme resultados de cada teste para definição das classes x 2 pré-processamentos). Ambos os pré-processamentos foram realizados utilizando uma janela de 5 pontos e polinômio de terceira ordem.

Os modelos preditivos foram construídos usando o classificador PLS-DA (análise discriminante por mínimos quadrados parciais), tanto para o conjunto de dados originais (sem pré-tratamento) como para os formados após os dois pré-processamentos. Para validação e calibração do modelo, os dados espectrais foram subdivididos em conjuntos de treinamento (70%) e teste (30%), respectivamente. Além disso, a validação cruzada de dez vezes foi realizada para cada modelo. O desempenho dos modelos foi avaliado por meio da matriz de confusão e das métricas de acurácia, kappa (COHEN, 1960), sensibilidade e especificidade, cujas equações são apresentadas abaixo:

$$Acurácia = \frac{TP + TN}{TP + TN + FP + FN}$$

$$Kappa = \frac{2 * (TP * TN - FN * FP)}{(TP + FP) * (FP + TN) + (TP + FN) * (FN + TN)}$$

$$Sensibilidade = \frac{TP}{TP + FN}$$

$$Especificidade = \frac{TN}{TN + FP}$$

Em que: TP = verdadeiro positivo; TN = verdadeiro negativo; FN = falso negativo; FP= falso positivo.

A partir dos dados espectrais, tratados no pré-processamento que apresentou melhores resultados, foram identificadas as faixas de comprimento de onda que mais contribuíram para criação dos modelos para cada classe previamente definida com base nos testes de avaliação da qualidade fisiológica. Para todas as análises, foi utilizado o software estatístico R 4.3.0 (R CORE TEAM, 2023).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Alterações na qualidade física e fisiológica

4.1.1. Ensaio I: Envelhecimento natural (armazenamento)

O grau de umidade das sementes da cultivar Doce Cristal variou de 11,2% a 12,3% em ambiente não controlado (AMB) e de 10,7% a 11,6% em câmara fria (CF) (Figura 2). Valores semelhantes foram obtidos para a cultivar Superdoce, ou seja, entre 11,0% e 12,4% em AMB e entre 10,9 e 11,6% em CF. Assim, nota-se que não ocorreram variações acentuadas no grau de umidade ao longo do armazenamento em AMB e em CF. Contudo, verifica-se que as oscilações no grau de umidade das sementes armazenadas em AMB foram ligeiramente maiores em relação às das mantidas em CF. Todas as faixas de umidade encontradas nos dois ambientes de armazenamento foram compatíveis com os valores indicados para o armazenamento seguro das sementes, que devem ser de até 13% (PESSOA, 1996).

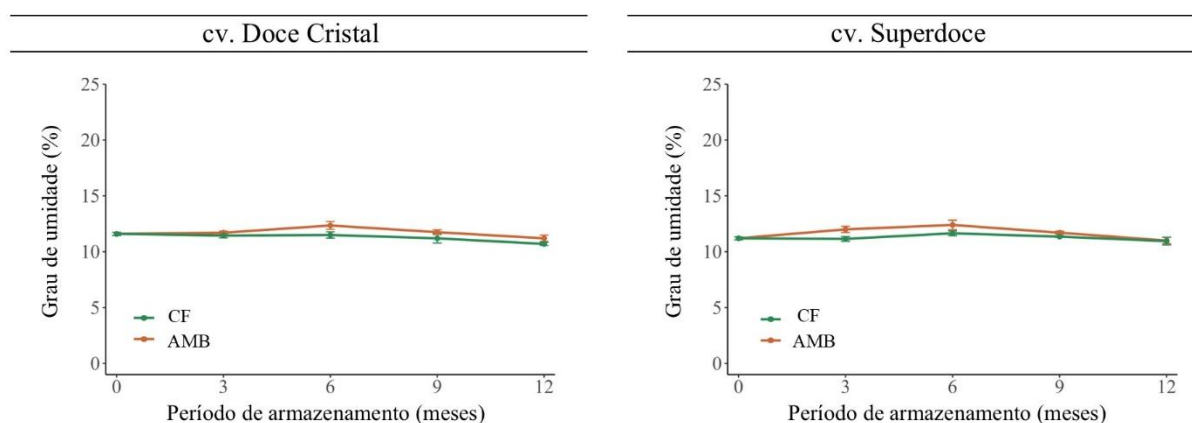


Figura 2. Grau de umidade (%) de sementes em duas cultivares de milho-doce durante doze meses de armazenamento em câmara fria (CF) e ambiente não controlado (AMB). Barras: desvio padrão.

O teste de raios X permitiu uma visualização nítida da morfologia interna e estruturas das sementes (pericarpo, endosperma, escutelo e eixo embrionário), em ambas cultivares (Figura 3A). Além disso, foi possível identificar sementes com danos mecânicos e por predação, bem como tecidos em deterioração, tanto para cultivar Doce Cristal (Figura 3B) como para a cv. Superdoce (Figura 3C). Ao analisar as radiografias geradas, relata-se que a proporção de sementes com danos encontrada nos lotes foi inferior a 3% e não houve acréscimos nesse valor ao longo do armazenamento das sementes em CF e AMB.

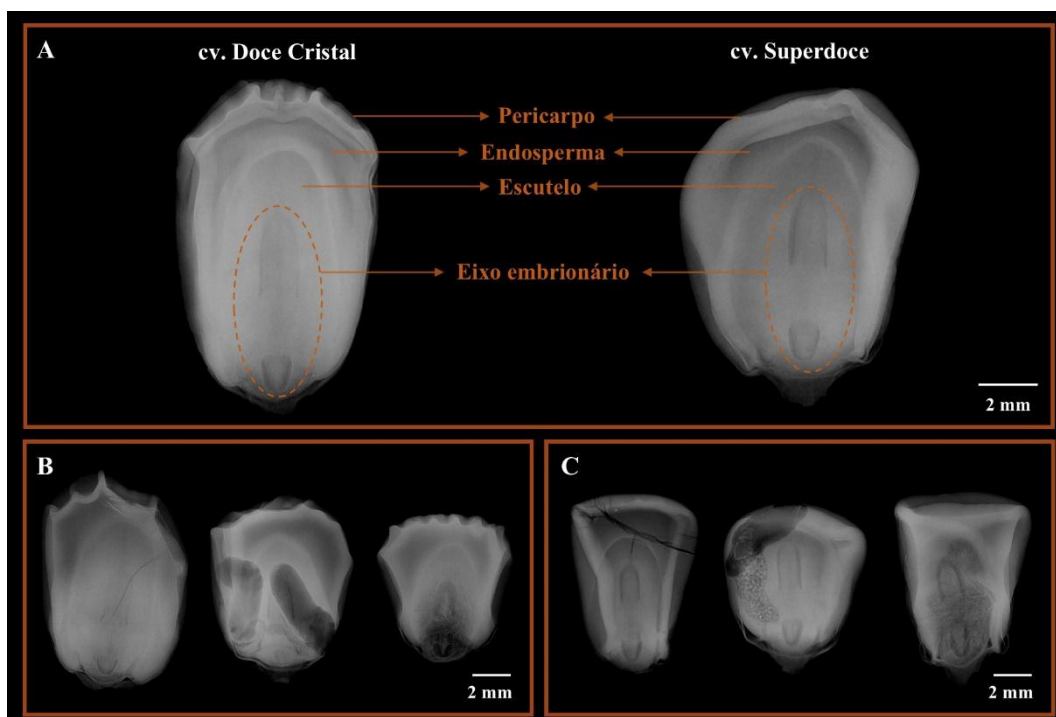


Figura 3. Imagens radiográficas das sementes indicando as estruturas internas (A) e danos físicos em sementes de milho-doce, cultivar Doce Cristal (B) e Superdoce (C).

Por meio dos valores de F obtidos nas análises de variância dos dados relacionadas à qualidade física das sementes, verificou-se que não houve interação significativa entre os fatores ambiente e período de armazenamento quanto à densidade relativa (DR) e integrada (DI), em ambas cultivares (Tabela 1). Assim, para essas variáveis tais fatores foram estudados independentemente. Para cultivar Doce Cristal, não houve efeito significativo individual de nenhum dos fatores estudados (Tabela 1; Figuras 4A e 4B), em relação às variáveis de densidade tecidual. Já para cultivar Superdoce, constatou-se efeito significativo apenas para o fator período de armazenamento. Desta forma, para esta cultivar, pode-se observar ligeira redução linear da DR e DI nas sementes armazenadas em AMB (Figuras 4E e 4F). Também ocorreu queda na DR das sementes no armazenamento em CF. Ainda para cv. Superdoce, nota-se que os valores médios de densidade relativa e integrada para as sementes armazenadas por 12 meses, em ambos os ambientes, diferiram estatisticamente dos observados para as recém-colhidas (testemunha: período inicial = 0 meses), indicando que a redução da integridade tecidual ocorreu ao final do armazenamento (Tabela 1).

Tabela 1. Densidade relativa (DR), densidade integrada (DI), germinação (G) e primeira contagem de germinação (PC) em sementes de duas cultivares de milho-doce durante doze meses de armazenamento em câmara fria (CF) e ambiente não controlado (AMB).

Período (meses)	DR (cinza pixel ⁻¹)		DI (cinza mm ² pixel ⁻¹)		G (%)		PC (%)	
	CF	AMB	CF	AMB	CF	AMB	CF	AMB
cv. Doce Cristal								
3	105,8	105,1	6439,0	6499,7	90 A	92 A	83	82
6	107,3	104,4	6508,2	6411,6	93 A	89 A	84	80
9	107,5	104,1	6462,9	6483,3	91 A	87 A	81	75
12	104,2	102,8	6347,9	6122,1	91 A	80 B γ	82	70 γ
Média	106,2 A	104,1A	6439,5 A	6379,2 A	91,2	87	82,2 A	76,5 B
Inicial	105,6		6485,4		93		83	
F (A)	5,57 ^{ns}		0,22 ^{ns}		6,86*		9,28*	
F (P)	1,63 ^{ns}		2,41 ^{ns}		4,19*		5,20*	
F (A x P)	0,53 ^{ns}		0,74 ^{ns}		3,89*		2,65 ^{ns}	
CV _(a) (%)	2,39		5,66		4,85		6,72	
CV _(b) (%)	2,36		3,30		4,12		5,18	
cv. Superdoce								
3	92,3	94,3	4739,2	4732,7	94 A	93 A	82 A	81 A
6	92,9	91,8	4768,8	4717,8	92 A	90 A	82 A	75 B γ
9	93,2	93,0	4705,8	4609,6	92 A	88 A γ	80 A	73 B γ
12	88,5 γ	86,6 γ	4463,9 γ	4326,2 γ	90 A	79 B γ	79 A	63 B γ
Média	91,7 A	91,4 A	4669,4 A	4596,6 A	92	87,5	80,7	73
Inicial	95,3		4796,5		95		84	
F (A)	0,13 ^{ns}		1,96 ^{ns}		12,54*		59,70*	
F (P)	10,84*		14,88*		11,58*		11,38*	
F (A x P)	1,01 ^{ns}		0,45 ^{ns}		4,45*		4,92*	
CV _(a) (%)	2,53		3,18		4,01		3,63	
CV _(b) (%)	2,54		2,58		3,37		4,95	

Médias seguidas pela mesma letra, na linha, não diferem entre si pelo teste F, a 5% de probabilidade.

F (A): valor de F calculado para o efeito isolado do fator ambiente de armazenamento; F (P): valor de F calculado para o efeito isolado do fator período de armazenamento; (A x P): valor de F calculado para interação entre os fatores ambiente e período de armazenamento. *, ns = significativo e não significativo pelo teste F a 5% de probabilidade. γ = Médias diferem da testemunha (inicial), no nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Dunnett.

As densidades relativa e integrada são variáveis citadas recentemente como promissoras para a avaliação da qualidade física das sementes (ARAÚJO *et al.*, 2023; MEDEIROS *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2020). Essas são obtidas a partir da análise semiautomatizada, utilizando o software ImageJ[®], das radiografias digitais geradas e levam em consideração os níveis de cinza de cada imagem radiográfica que são resultantes da absorção diferencial dos raios X pelos tecidos das sementes. Neste contexto, tecidos mais deteriorados apresentam menores níveis de radiopacidade (claro) e maiores níveis de radioluminescência (escuro), que podem ser avaliados por meio da densidade relativa e integrada (MEDEIROS *et al.*, 2018). É importante evidenciar que a DI difere da DR por considerar nos cálculos a área da semente. Assim, a DI equivale ao produto da área e do valor de cinza médio (DR).

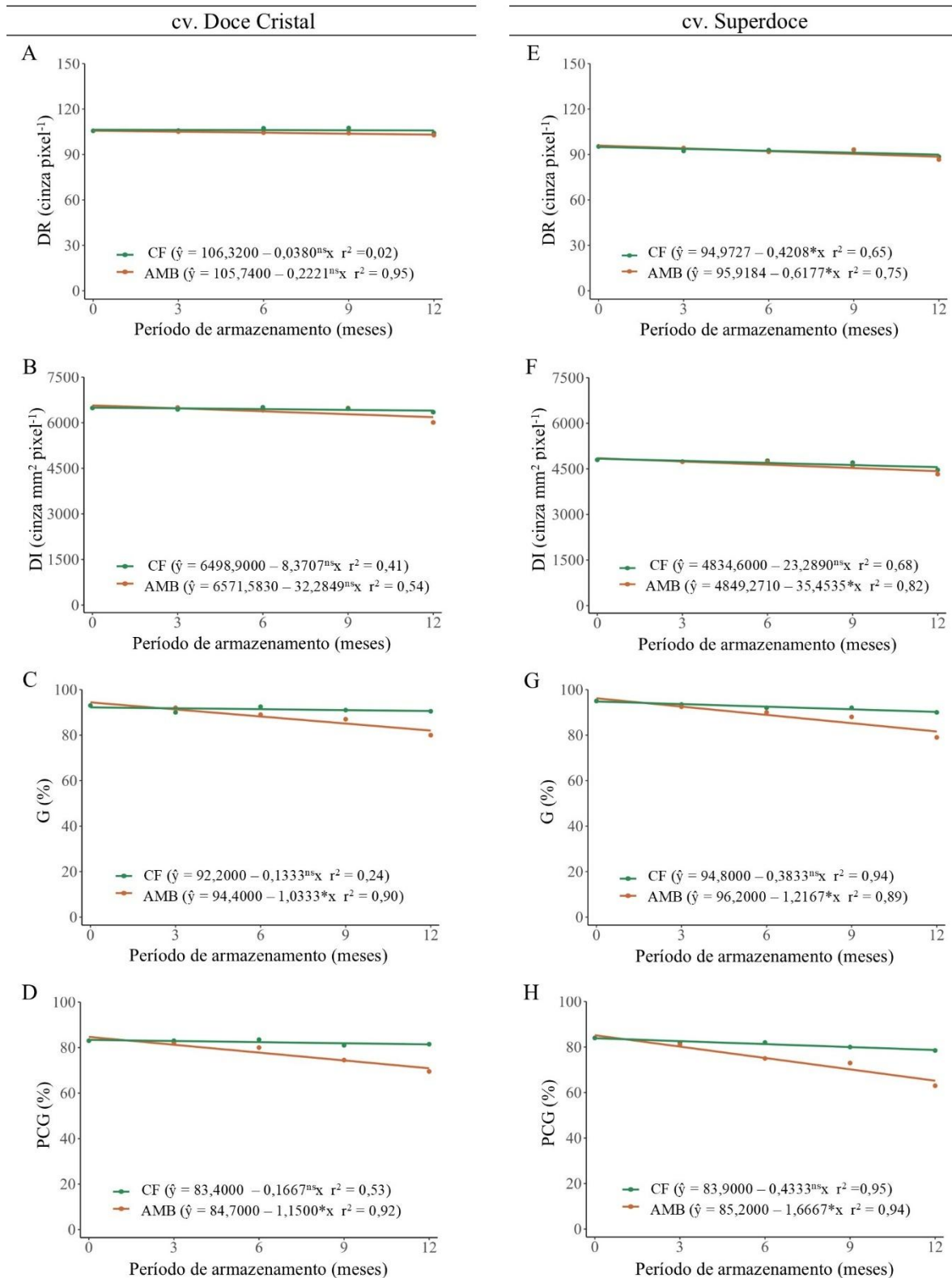


Figura 4. Densidade relativa (A e E), densidade integrada (B e F), germinação (C e G) e primeira contagem de germinação (D e H) em sementes de duas cultivares de milho-doce durante doze meses de armazenamento em câmara fria (CF) e ambiente não controlado (AMB). *, ns = significativo e não significativo pelo teste t a 5% de probabilidade.

Diversos fatores podem contribuir para reduções na densidade tecidual das sementes como má formação embrionária (FARIA *et al.*, 2019), presença de danos mecânicos, predação por insetos, contaminações fúngicas (MEDEIROS *et al.*, 2019) e alterações na quantidade de reservas energéticas (OHTO; STONE; HARADA, 2018; DOLL *et al.*, 2020). Todos esses fatores também podem afetar diretamente a germinação e o vigor. Assim, na atualidade, muitos estudos têm sido realizados para compreensão da sensibilidade dessas variáveis para fazer inferências relacionadas à qualidade fisiológica das sementes (ARAÚJO *et al.*, 2023; MEDEIROS *et al.*, 2020a; PINHEIRO *et al.*, 2020; RIBEIRO *et al.*, 2021).

Embora, a finalidade do presente trabalho não tenha sido avaliar a relação entre a densidade tecidual e qualidade fisiológica das sementes de milho-doce, analisou-se visualmente as imagens radiográficas dessas e o desenvolvimento de suas respectivas plântulas. Sementes com alta densidade geraram imagens radiográficas mais opacas, representadas no mapa de calor por regiões de cor amarela e laranja, e, normalmente, deram origem a plântulas mais vigorosas (Figuras 5A e 5D). Em contraste, sementes de baixa densidade apresentaram imagens mais escuras, representadas por áreas mais extensas com coloração azul e púrpura no mapa de calor, originando, em geral, plântulas fracas ou até anormais (Figuras 5B e 5E). Sementes que apresentaram baixa densidade tecidual no eixo embrionário (Figura 5C) ou em uma grande área do endosperma e escutelo (Figura 5F), na maioria das vezes, não emitiram a radícula e a parte aérea. Todavia, é importante destacar que algumas sementes de milho-doce que apresentaram alta densidade e ausência de danos, deram origem a plântulas anormais ou sementes mortas.

Com base nos resultados do teste de germinação, nota-se que a interação entre ambiente e período de armazenamento foi significativa (Tabela 1). Ao avaliar os ambientes dentro de cada período, relata-se que a germinação foi menor no AMB em comparação com CF apenas aos 12 meses de armazenamento. Além disso, foi possível verificar que não houve diferença significativa entre a germinação das sementes armazenadas em CF e das recém-colhidas. Desse modo, pode-se afirmar que o armazenamento em CF favoreceu a manutenção da qualidade fisiológica das sementes. Por outro lado, a germinação das sementes armazenadas em AMB foi inferior à observada para as sementes recém-colhidas (inicial), aos 12 meses, para cv. Doce Cristal e aos 9 meses para cv. Superdoce. Ademais, observa-se que ao longo do armazenamento em AMB as sementes apresentaram reduções lineares na germinação (Figuras 4C e 4G). No entanto, ressalta-se que essas reduções não ocasionaram em porcentagens de germinação inferiores ao limite mínimo de 70% (grupo doce) e 60% (grupo superdoce) exigido para comercialização de sementes de milho-doce certificadas (C1 e C2) e não certificadas (S1 e S2) (BRASIL, 2013).

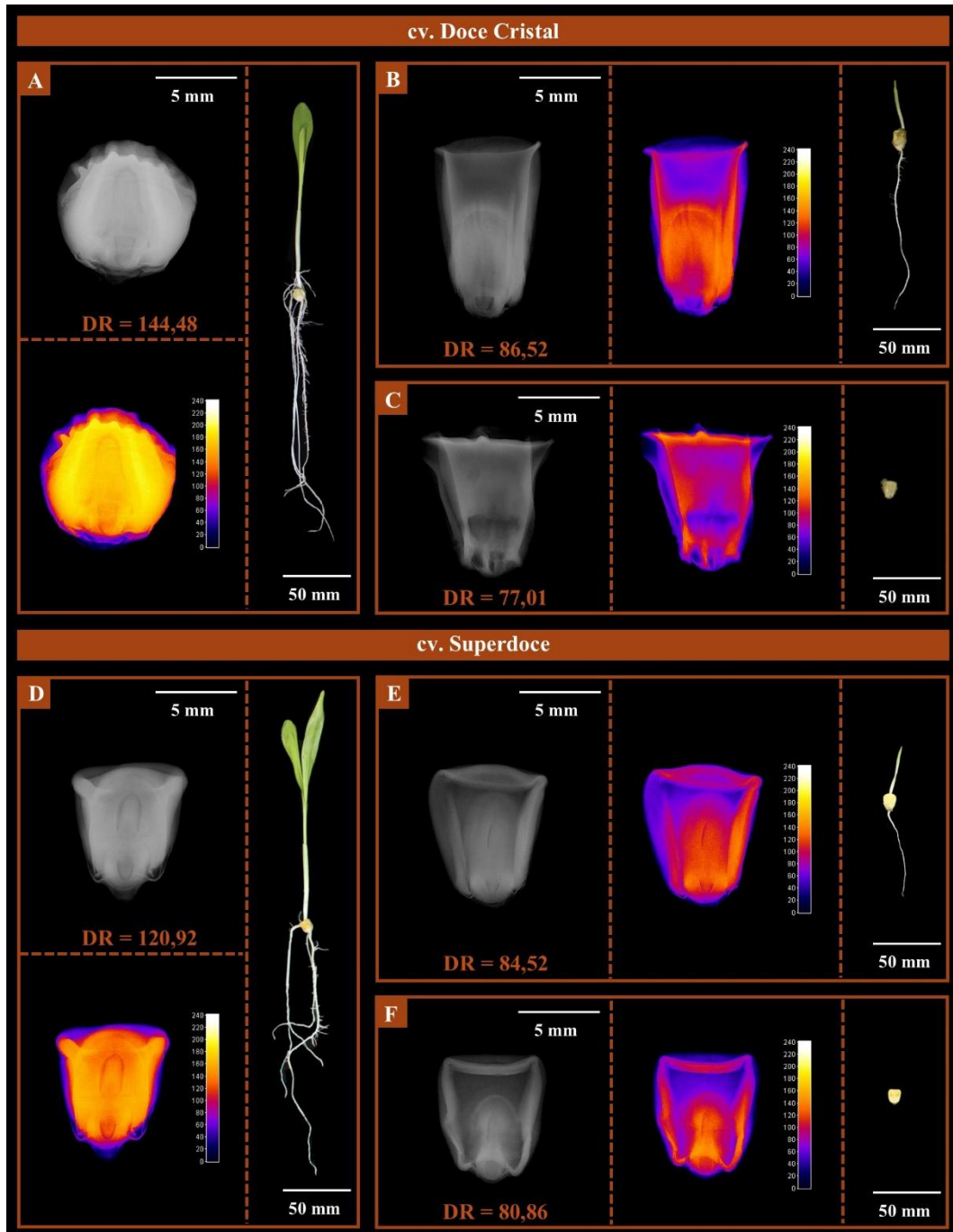


Figura 5. Imagens radiográficas das sementes de milho-doce e seus respectivos mapas de calor e plântulas (7 dias após a semeadura), cultivar Doce Cristal (A, B e C) e Superdoce (D, E e F).

Quanto à primeira contagem de germinação (PCG), que é um indicativo da velocidade de germinação (KRYZANOWSKI *et al.*, 2020), não foi possível observar interação significativa entre os fatores ambiente e período de armazenamento, para cv. Doce Cristal (Tabela 1). Porém, quando se avaliou os dois fatores de forma isolada, foram constatados efeitos significativos. Assim, para essa cultivar, foi possível notar que as sementes armazenadas em CF apresentaram melhor desempenho na PCG que as mantidas em AMB. Os valores de germinação, obtidos na

PCG e durante o armazenamento em AMB, diferiram do inicial apenas aos 12 meses. Ao se comparar os diferentes períodos de armazenamento, verifica-se que as sementes armazenadas em AMB apresentaram decréscimo linear na germinação obtida por meio da PCG (Figura 4D). Contudo, isso não foi observado para as sementes acondicionadas em CF.

Para a cv. Superdoce, foi constatada interação significativa entre os fatores estudados, em relação à PCG (Tabela 1). Evidencia-se que a velocidade de germinação foi menor em AMB aos 6, 9 e 12 meses de armazenamento, sendo os valores obtidos nesses tratamentos inferiores aos observados no início do armazenamento. Para essa cultivar, de maneira similar ao relatado para cv. Doce Cristal, ocorreram reduções lineares na velocidade de germinação somente durante o armazenamento em AMB (Figura 4H).

Pela Tabela 2, observa-se que houve interação significativa entre o ambiente e período de armazenamento para os testes de condutividade elétrica (CE), frio (TF) e envelhecimento acelerado (EA), para ambas cultivares. Vale lembrar que maiores valores de CE indicam menor vigor (VIEIRA; MARCOS-FILHO, 2020). Desta forma, em relação aos resultados desse teste, é possível constatar menor desempenho, quanto ao vigor, nas sementes armazenadas em AMB, em comparação com CF, aos 6, 9 e 12 meses de armazenamento, para as duas cultivares de milho-doce (Tabela 2). Quando as sementes foram avaliadas pelo TF e EA, para a cv. Superdoce, verifica-se que as diferenças encontradas no vigor das sementes armazenadas em CF e AMB se deram nos mesmos períodos evidenciados anteriormente. Porém, para cv. Doce Cristal e considerando-se as avaliações realizadas conforme esses dois testes, as diferenças no vigor entre os distintos ambientes ocorreram somente aos 9 e 12 meses de armazenamento, sendo menor desempenho notado nas sementes armazenadas em AMB em comparação com as mantidas em CF.

O teste de CE avalia a intensidade de liberação de solutos através das membranas celulares. Segundo Vieira e Marcos-Filho (2020), sementes de menor vigor têm membranas menos organizadas devido ao processo de deterioração, e, durante a embebição permitem maior lixiviação de eletrólitos, resultando em maiores valores de condutividade elétrica. Já o TF e EA analisam o desempenho de sementes expostas a condições desfavoráveis de ambiente, e são os mais comumente utilizados para avaliação do vigor em sementes de milho. O TF baseia-se na resposta das sementes à combinação de baixa temperatura e alto teor de água no substrato (CICERO; VIEIRA, 2020). Por sua vez, o princípio do teste de EA considera que a taxa de deterioração das sementes é intensificada significativamente após sua exposição a temperatura e umidade relativa elevadas, os fatores ambientais de maior influência na intensidade e velocidade de deterioração, simulando condições inadequadas para o armazenamento de

sementes (MARCOS-FILHO, 2020a). Sementes mais vigorosas originam maior porcentagem de germinação após o EA.

Tabela 2. Condutividade elétrica (CE), teste de frio (TF) e envelhecimento acelerado (EA) em sementes de duas cultivares de milho-doce durante doze meses de armazenamento em câmara fria (CF) e ambiente não controlado (AMB).

Período (meses)	CE ($\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$)		TF (%)		EA (%)	
	CF	AMB	CF	AMB	CF	AMB
cv. Doce Cristal						
3	14,5 A	15,3 A	87 A	85 A	70 A	71 A
6	15,8 B	18,0 A γ	84 A	80 A γ	69 A	68 A
9	16,5 B γ	19,6 A γ	83 A	78 B γ	68 A	64 B
12	20,0 B γ	25,2 A γ	79 A γ	67 B γ	65 A	58 B γ
Média	16,7	19,5	83,2	77,5	68	65,2
Inicial	14,0		87		69	
F (A)	50,05*		34,99*		15,21*	
F (P)	70,50*		23,05*		14,31*	
F (A x P)	5,67*		3,51*		3,36*	
CV _(a) (%)	6,19		3,28		2,86	
CV _(b) (%)	6,07		4,02		4,27	
cv. Superdoce						
3	26,4 A	28,4 A γ	85 A	81 A	70 A	69 A
6	27,9 B γ	33,0 A γ	78 A γ	71 B γ	71 A	65 B γ
9	30,7 B γ	36,7 A γ	68 A γ	52 B γ	68 A	57 B γ
12	34,3 B γ	43,8 A γ	62 A γ	36 B γ	64 A γ	53 B γ
Média	29,8	35,5	73,2	60	68,2	61
Inicial	23,8		86		73	
F (A)	91,83*		122,05*		31,17*	
F (P)	66,38*		189,96*		16,68*	
F (A x P)	6,41*		20,25*		3,49*	
CV _(a) (%)	5,12		5,06		5,79	
CV _(b) (%)	5,30		4,71		5,36	

Médias seguidas pela mesma letra, na linha, não diferem entre si pelo teste de F, a 5% de probabilidade.

F (A): valor de F calculado para o efeito isolado do fator ambiente de armazenamento; F (P): valor de F calculado para o efeito isolado do fator período de armazenamento; (A x P): valor de F calculado para interação entre os fatores ambiente e período de armazenamento. *, ns = significativo e não significativo pelo teste F a 5% de probabilidade. γ = Médias diferem da testemunha (inicial), no nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Dunnett.

Analisando o comportamento das sementes de milho-doce ao longo do armazenamento, pode-se afirmar que a CE aumentou linearmente, enquanto as porcentagens de germinação obtidas no TF e EA decresceram, indicando redução do vigor (Figura 6). Tal afirmação pode ser realizada para sementes armazenadas em CF (exceto quanto ao EA, para a cv. Doce Cristal), como também para as acondicionadas em AMB, para ambas cultivares. No entanto, percebe-se que a redução no vigor ocorreu de maneira mais acentuada no armazenamento em AMB,

principalmente quando se avaliou o vigor das sementes pelos testes de condutividade elétrica e frio (Figuras 6A, 6B, 6D e 6E).

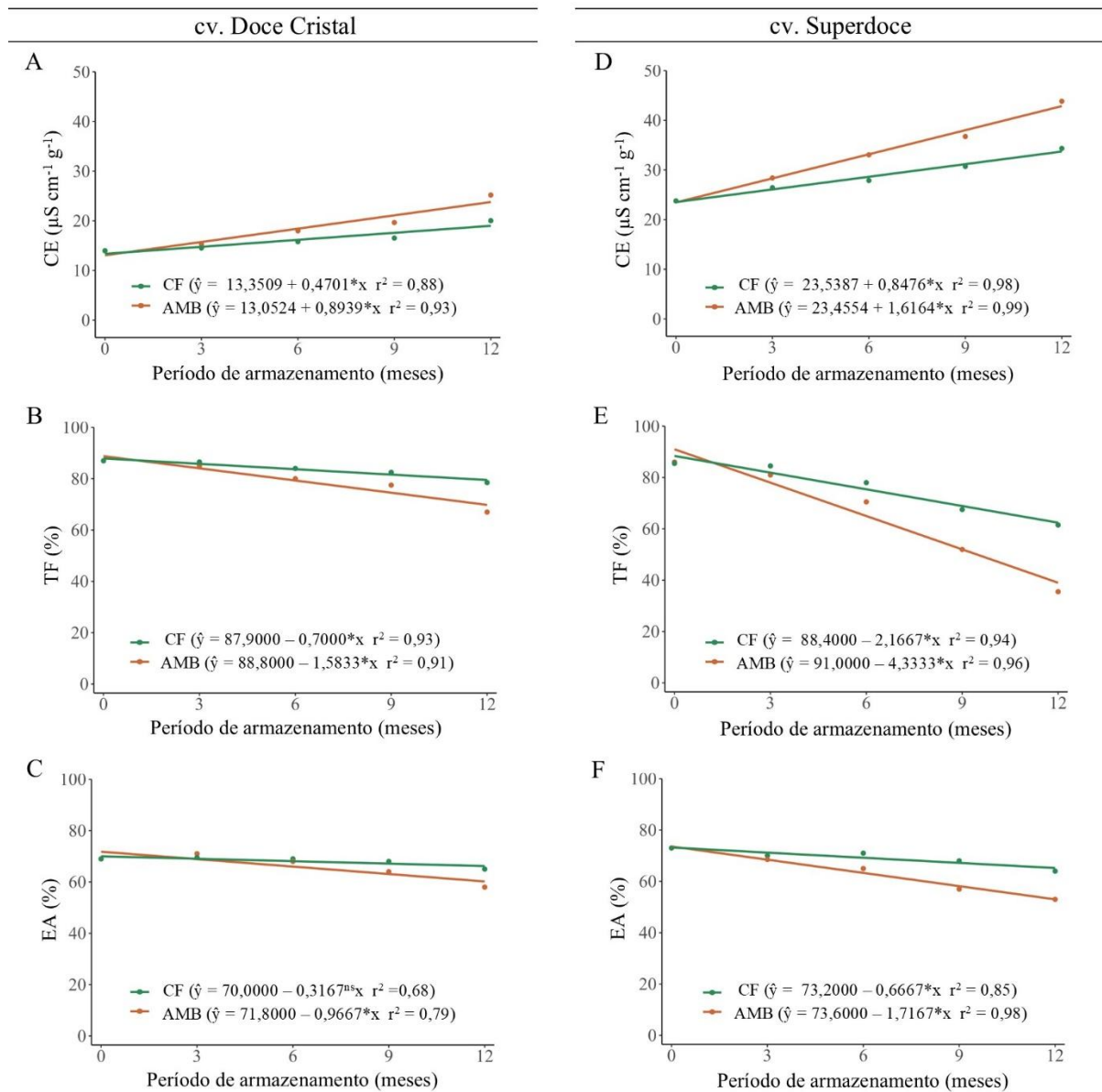


Figura 6. Condutividade elétrica (A e D), teste de frio (B e E) e envelhecimento acelerado (C e F) em sementes de duas cultivares de milho-doce durante doze meses de armazenamento em câmara fria (CF) e ambiente não controlado (AMB). *, ns = significativo e não significativo pelo teste t a 5% de probabilidade.

Destaca-se que tanto pela CE como pelo TF e EA, a redução no vigor das sementes foi mais acentuada para a cv. Superdoce (Figura 6). Contudo, essa redução foi ainda mais evidente quando se avaliou o vigor pelo TF. Considerando os resultados desse teste, verifica-se que o valor obtido ao final do armazenamento (12 meses) em AMB foi de 67% para cv. Doce Cristal enquanto para a cv. Superdoce foi de 36%, sendo que no início do armazenamento os valores foram semelhantes para ambas cultivares.

As sementes da cultivar Superdoce contêm o gene mutante brittle 2 (*bt2*) que é responsável por reduzir drasticamente a atividade da enzima ADP-glicose pirofosforilase no citosol, resultando em decréscimos na deposição de amido e favorecendo o acúmulo de sacarose (MAGALHÃES; LAVINSKY; SOUZA, 2016). Já as sementes da cultivar Doce Cristal são portadoras do gene sugary 1 (*su1*) (grupo doce) que afeta a atividade da enzima amido sintase no plastídio, aumentando os níveis de polissacarídeos solúveis em água (fitoglicogênio). Neste contexto, o milho-doce pertencente a cv. Superdoce tende a possuir teores de sacarose e açúcares redutores superiores aos da cv. Doce Cristal, além de menores níveis de amido, o que contribui para maior susceptibilidade dessas à deterioração. De acordo com Marcos-Filho (2015), sementes com maiores teores de açúcares redutores são mais propensas à deterioração, uma vez que esses podem comprometer a função de proteínas e enzimas por meio das reações de Amadori e Maillard. Também é importante evidenciar que, em cereais, menor teor de amido pode implicar em baixas reservas acumuladas, ocasionando em energia insuficiente para a germinação da semente e crescimento da plântula (LOPES; LIMA, 2015).

Ao se comparar os resultados obtidos em cada ambiente ao longo do armazenamento com os das sementes recém-colhidas (inicial) (Tabela 2) da cv. Doce Cristal, verifica-se que em CF houve redução do vigor aos 9 e 12 meses, pela CE, e aos 12 meses pelo TF. Estes testes indicaram também queda no vigor das sementes mantidas em AMB a partir dos 6 meses, enquanto pelo EA tal redução só foi detectada aos 12 meses em AMB. Com base no EA, o vigor inicial das sementes foi mantido com o armazenamento em CF. Desta forma, embora esse teste seja bastante utilizado para estimar o potencial de armazenamento das sementes, no presente trabalho, diferenças no vigor das sementes ao longo do armazenamento foram detectadas de modo mais eficiente pelos testes de condutividade elétrica e de frio. Para a cv. Superdoce, em geral, tanto a CE como o TF, indicaram que o vigor inicial das sementes armazenadas em CF e AMB foi mantido até três meses, reduzindo a partir daí. Já pelo EA, em CF o vigor inicial foi mantido até 9 meses, ocorrendo redução aos 12 meses, enquanto em AMB já com 6 meses foi observada redução no vigor das sementes.

Com relação ao comprimento de plântulas (CP), índice de velocidade de emergência (IVE), verifica-se que a interação entre ambiente e período de armazenamento foi significativa, para cv. Doce Cristal e Superdoce (Tabela 3). Nesse sentido, comparando-se os ambientes de armazenamento, pode-se observar que os CP e IVE foram menores nas sementes em AMB aos 9 e 12 meses, para ambas cultivares. Esses mesmos resultados também foram observados quanto à emergência de plântulas (E), para cultivar Superdoce (Tabela 3). Por outro lado, para cv. Doce Cristal não houve interação entre ambientes e períodos. Analisando-se os efeitos de

cada fator isoladamente houve significância apenas para o ambiente de armazenamento, sendo observados menores valores de emergência de plântulas para as sementes mantidas em AMB em comparação com CF.

Pela Figura 7, observa-se para ambas cultivares redução linear no CP ao longo do armazenamento em CF e AMB. Porém, essa redução ocorreu de forma mais acentuada nas sementes acondicionadas em AMB. Quanto ao IVE e à E não foram constatados decréscimos no vigor das sementes armazenadas em CF, verificando-se reduções lineares no desempenho das sementes apenas no armazenamento em AMB. Nota-se ainda que esta redução foi um pouco mais acentuada para as sementes da cv. Superdoce em comparação com a cv. Doce Cristal.

Tabela 3. Comprimento de plântula (CP), índice de velocidade de emergência (IVE) e emergência (E) em sementes de duas cultivares de milho-doce durante doze meses de armazenamento em câmara fria (CF) e ambiente não controlado (AMB).

Período (meses)	CP (mg plântula ⁻¹)		IVE (índice)		E (%)	
	CF	AMB	CF	AMB	CF	AMB
cv. Doce Cristal						
3	116,0 A	114,2 A	5,6 A	5,4 A	93	90
6	109,8 A	110,3 A	5,4 A	5,4 A	92	93
9	98,2 A γ	88,6 B γ	5,5 A	5,0 B γ	91	87
12	92,4 A γ	71,7 B γ	5,6 A	4,7 B γ	93	82 γ
Média	104,1	96,2	5,5	5,1	92,2 A	88,0 B
Inicial	118,9		5,7		94	
F (A)	42,79*		22,81*		8,76*	
F (P)	34,85*		3,17*		1,59 ^{ns}	
F (A x P)	3,47*		4,28*		1,90 ^{ns}	
CV _(a) (%)	3,43		4,16		4,51	
CV _(b) (%)	7,28		4,86		5,69	
cv. Superdoce						
3	116,9 A	120,0 A	5,5 A	5,3 A	93 A	91 A
6	108,6 A	98,7 A γ	5,6 A	5,3 A	94 A	90 A
9	100,5 A	74,2 B γ	5,6 A	4,9 B γ	93 A	84 B γ
12	94,6 A γ	68,4 B γ	5,5 A	4,3 B γ	90 A	74 B γ
Média	105,2	90,3	5,7	4,9	92,5	84,7
Inicial	113,5		5,7		95	
F (A)	31,84*		44,30*		52,42*	
F (P)	40,47*		7,05*		8,06*	
F (A x P)	7,36*		4,70*		3,53*	
CV _(a) (%)	7,60		5,01		3,42	
CV _(b) (%)	7,59		5,31		5,30	

Médias seguidas pela mesma letra, na linha, não diferem entre si pelo teste de F, a 5% de probabilidade.

F (A): valor de F calculado para o efeito isolado do fator ambiente de armazenamento; F (P): valor de F calculado para o efeito isolado do fator período de armazenamento; (A x P): valor de F calculado para interação entre os fatores ambiente e período de armazenamento. *, ns = significativo e não significativo pelo teste F a 5% de probabilidade. γ = Médias diferem da testemunha (inicial), no nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Dunnett.

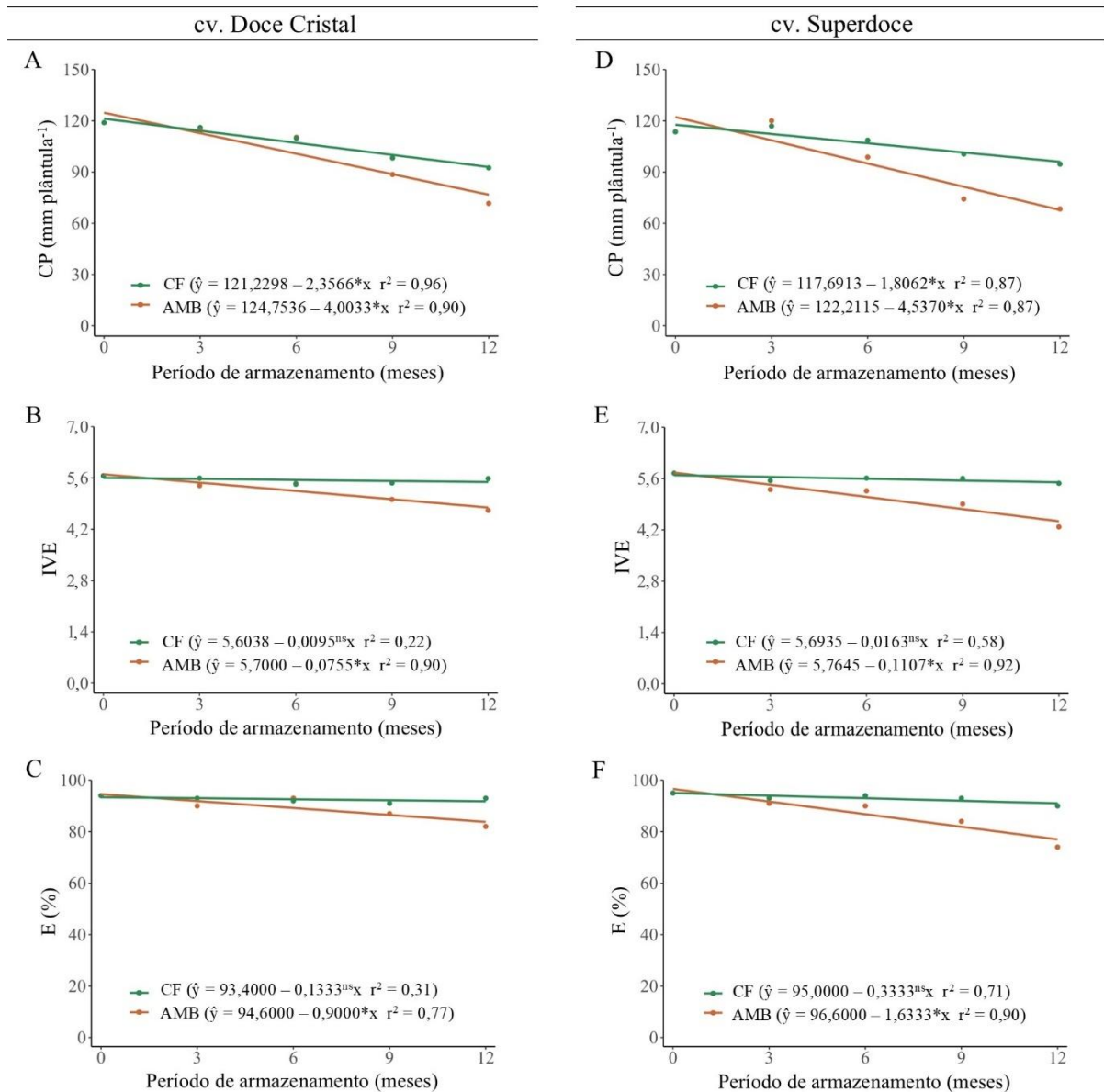


Figura 7. Comprimento de plântula (A e D), índice de velocidade de emergência (B e E) e emergência (C e F) em sementes de duas cultivares de milho-doce durante doze meses de armazenamento em câmara fria (CF) e ambiente não controlado (AMB). *, ns = significativo e não significativo pelo teste t a 5% de probabilidade.

Comparando-se os valores referentes à qualidade inicial das sementes da cv. Doce Cristal com aqueles obtidos em cada ambiente ao longo do armazenamento (Tabela 3), verifica-se que o comprimento de plântulas foi menor aos 9 e 12 meses tanto em CF como em AMB; já o IVE foi menor nestes mesmos períodos apenas em AMB. A porcentagem de emergência inicial foi mantida em CF; em AMB houve redução apenas aos 12 meses de armazenamento. Para a cv. Superdoce, houve redução do comprimento de plântula aos 12 meses em CF e AMB, sendo que neste último os valores obtidos aos 6 e 9 meses também foram inferiores ao valor inicial. Por sua vez, o IVE e a emergência foram praticamente mantidos em CF não diferindo

dos valores iniciais, enquanto em AMB foram mantidos apenas até o sexto mês, ocorrendo redução a partir desse momento.

Em suma, pelos testes de avaliação da qualidade fisiológica houve melhor desempenho para as sementes armazenadas em CF em comparação com as mantidas em AMB. No armazenamento em CF, as sementes foram submetidas a menor umidade relativa do ar (56%) e temperatura (10 °C) que atuaram no sentido de reduzir a atividade metabólica das sementes, favorecendo a manutenção da sua qualidade fisiológica. Em contraste, no AMB, a maior umidade relativa do ar (64%) e temperatura média (23,5 °C) contribuíram para acelerar o processo de deterioração, reduzindo a qualidade das sementes. Camargo e Carvalho (2008) também relataram que o armazenamento em câmara fria foi mais eficiente para a preservação da qualidade fisiológica de sementes de milho-doce.

De modo geral, pelos resultados apresentados nesta presente pesquisa, pode-se afirmar que não houve diferença expressiva na qualidade física, avaliada por meio da densidade tecidual, entre as sementes armazenadas em CF e AMB. Também, foi possível constatar que a detecção da redução do vigor ocorreu de forma similar tanto para cultivar Doce Cristal como para Superdoce. Assim, para ambas cultivares houve redução relevante no vigor das sementes a partir dos seis meses quando o armazenamento foi realizado AMB. Já no armazenamento em CF reduções no vigor foram mais evidentes após 9 meses. Ademais, a germinação das sementes armazenadas em CF foi preservada durante todo o período de armazenamento estudado, para ambas cultivares. Por sua vez, para sementes armazenadas em AMB ocorreram decréscimos na germinação a partir dos 12 meses de armazenamento.

4.1.2. Ensaio II: Envelhecimento artificial

Houve aumento no grau de umidade das sementes de ambas as cultivares com o aumento do período de envelhecimento artificial, o que era esperado em função da higroscopicidade das sementes e do maior tempo de permanência sob condição de alta umidade relativa (em torno de 100%) (Figura 8). Para cv. Doce Cristal, o grau de umidade inicial que era de 11,6% e atingiu 30,1% no final envelhecimento artificial (96 horas). Já para as sementes da cv. Superdoce, foi observado um valor inicial de 11,2% e de 29,3% após 96 h de envelhecimento artificial.

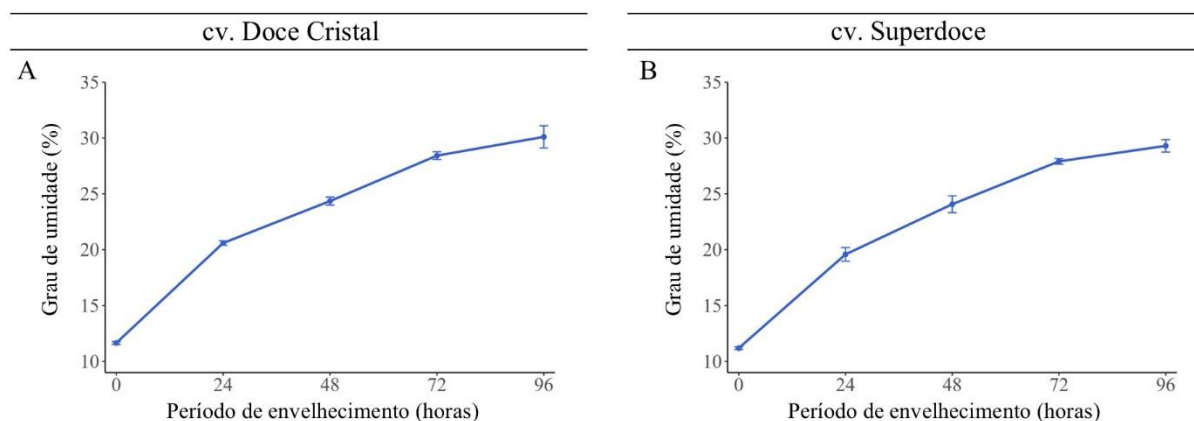


Figura 8. Grau de umidade (%) de sementes em duas cultivares de milho-doce submetidas a diferentes períodos de envelhecimento artificial. Barras: desvio padrão.

O teor de água afeta o metabolismo das sementes e, conseqüentemente, interfere na padronização das avaliações e obtenção de resultados confiáveis (MARCOS-FILHO, 2015). Neste contexto, as sementes envelhecidas artificialmente foram submetidas à secagem natural antes da realização dos testes e determinações para avaliação do seu desempenho. Sendo assim, no momento das análises os valores de grau de umidade das sementes permaneceram em uma faixa uniforme entre 11,3% e 11,8%.

Os valores de densidade relativa (DR) e integrada (DI) das sementes de ambas as cultivares praticamente não alteraram com o aumento do período de envelhecimento artificial, indicando que as características físicas não foram afetadas (Figuras 9A, 9B, 9E e 9F). Pela Figura 4, observa-se comportamento semelhante para estas variáveis durante o armazenamento das sementes. Já a qualidade fisiológica, pelos resultados de germinação (Figura 9C e 9G) e primeira contagem de germinação (PCG) (Figuras 9D e 9H), decresceu linearmente ao longo do tempo de envelhecimento de modo semelhante para ambas as cultivares. A germinação, que era de 93% para a cv. Doce Cristal e 95% para a cv. Superdoce, caiu para 75% e 76%, respectivamente, após 96 h de envelhecimento artificial. Comparando-se com os resultados obtidos durante o armazenamento (Figuras 4C, 4D, 4G e 4H), houve semelhança entre as alterações na germinação e PCG após o envelhecimento artificial e o armazenamento em ambiente não controlado (AMB). É importante ressaltar que, as alterações no potencial fisiológico das sementes, tanto no armazenamento como no envelhecimento artificial, não tiveram reflexo sobre as características de densidade avaliadas pelo teste de raios X.

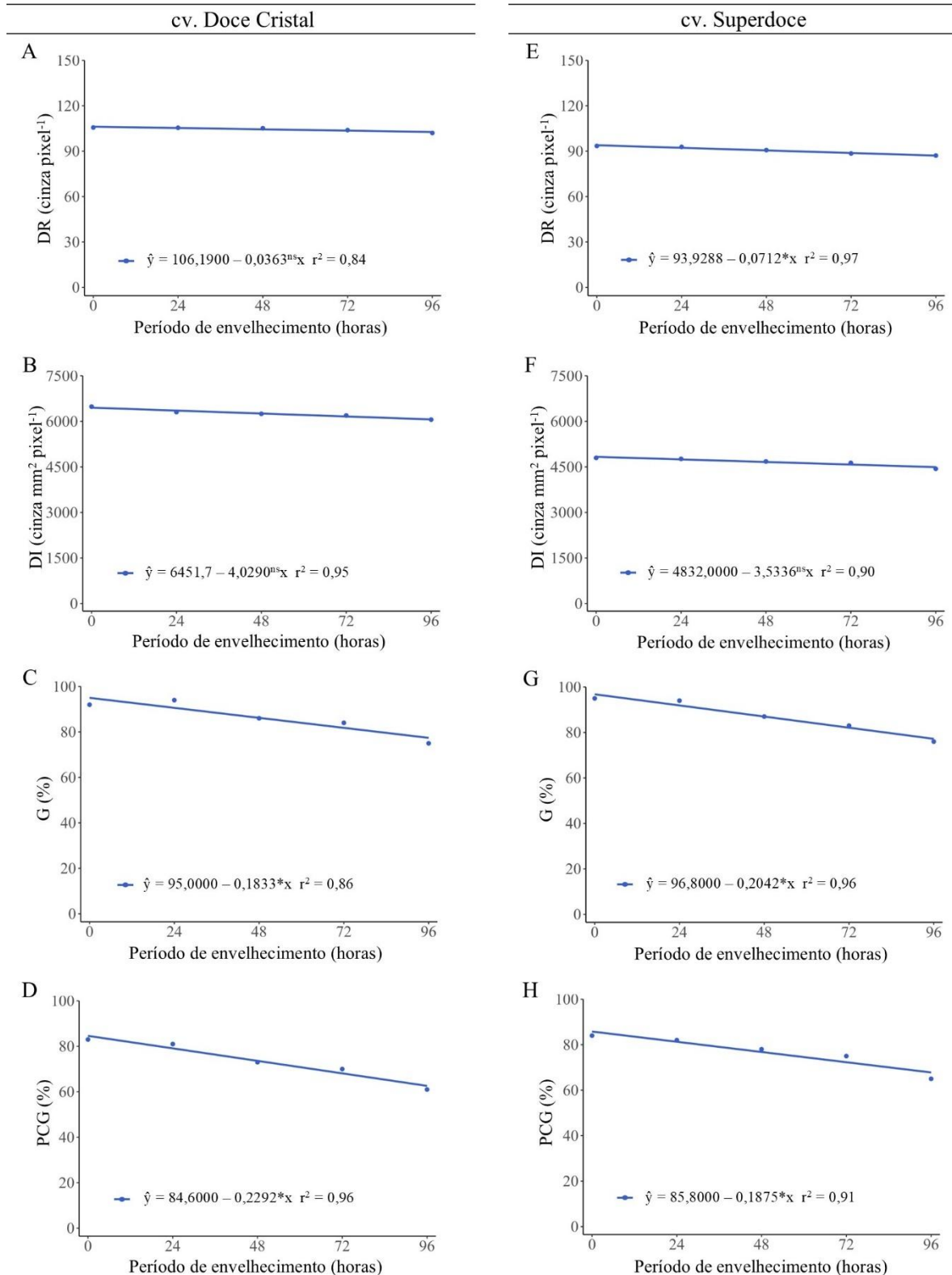


Figura 9. Densidade relativa (A e E), densidade integrada (B e F), germinação (C e G) e primeira contagem de germinação (D e H) em sementes de duas cultivares de milho-doce submetidas a diferentes períodos de envelhecimento artificial. *, ns = significativo e não significativo pelo teste t a 5% de probabilidade.

O teste de condutividade elétrica (CE) avalia a intensidade de liberação de solutos das sementes durante o processo de embebição, estando associado à integridade das membranas e capacidade de reestruturação dessas (BASU; GROOT, 2023). Desta forma, maiores valores de CE indicam maior lixiviação de solutos e maior ocorrência de deterioração (VIEIRA; MARCOS-FILHO, 2020). Houve aumento da condutividade elétrica e, conseqüentemente, redução no vigor das sementes (Figuras 10A e 10D) com o aumento do período de envelhecimento artificial. Nota-se que a redução no vigor ocorreu de forma mais acentuada para as sementes da cv. Superdoce, conforme também constatado durante o armazenamento das sementes (Figuras 6A e 6D). Também os testes de frio (Figuras 10B e 10E) e envelhecimento acelerado (Figuras 10C e 10F) indicaram queda no vigor das sementes com o aumento do período de envelhecimento de modo similar para as duas cultivares. Reduções semelhantes no vigor das sementes de milho-doce foram relatadas durante o armazenamento, sobretudo quando esse foi realizado em AMB.

Os maiores valores de CE observados nas sementes da cv. Superdoce em comparação com a cv. Doce Cristal evidencia sua maior sensibilidade à deterioração promovida pelo envelhecimento artificial, o que também foi detectado durante o armazenamento das sementes tanto em AMB como em CF (Figura 6). Sementes com maiores teores de açúcares tendem a apresentarem maior sensibilidade à deterioração (MARCOS-FILHO, 2015), uma vez que os açúcares redutores podem causar carbonilação de proteínas e a liberação de produtos tóxicos para a célula vegetal (LEPRINCE *et al.*, 2017). Tal fato pode explicar a deterioração mais acentuada em sementes da cultivar Superdoce, visto que essas apresentam teores de açúcares superiores aos da cv. Doce Cristal.

Pelo comprimento de plântulas (Figuras 11A e 11D), IVE (Figuras 11B e 11E) e emergência de plântulas (Figuras 11C e 11F), verifica-se redução no desempenho das sementes com o aumento do período de envelhecimento artificial. Esta redução foi mais acentuada para o comprimento de plântula (CP). Este resultado evidencia que com o aumento do processo de deterioração das sementes, promovida pela maior exposição às condições de alta temperatura e UR durante o envelhecimento artificial, o crescimento das plântulas foi mais afetado do que a porcentagem e velocidade de emergência. Resultados semelhantes foram obtidos durante o armazenamento em AMB das sementes de ambas as cultivares (Figura 7).

A redução na taxa de crescimento de plântulas é uma das manifestações da deterioração consideradas por Delouche e Baskin (1973). Em sementes deterioradas, há maior degradação de reservas acumuladas devido, sobretudo, aos incrementos na taxa respiratória dessas, o que pode ocasionar menor mobilização de reservas do endosperma para o eixo embrionário, durante

a formação da plântula (EBONE; CAVERZAN; CHAVARRIA, 2019). De acordo com Andrade *et al.* (2019), sementes de milho com maior eficiência de utilização de reservas apresentam maior vigor e produzem plântulas com maior comprimento e massa seca.

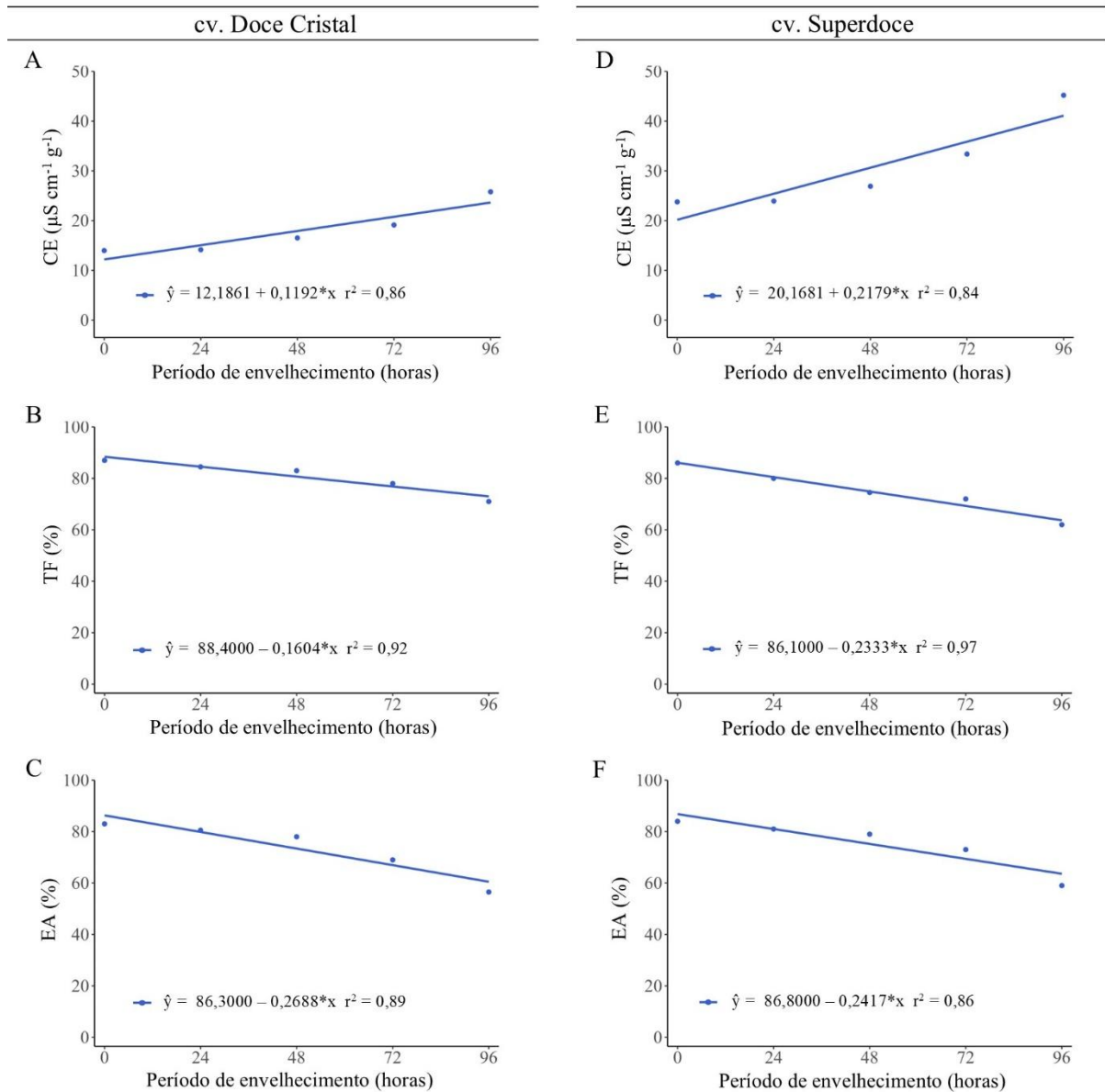


Figura 10. Condutividade elétrica (A e D), teste de frio (B e E) e envelhecimento acelerado (C e F) em sementes de duas cultivares de milho-doce submetidas a diferentes períodos de envelhecimento artificial. *, ns = significativo e não significativo pelo teste t a 5% de probabilidade.

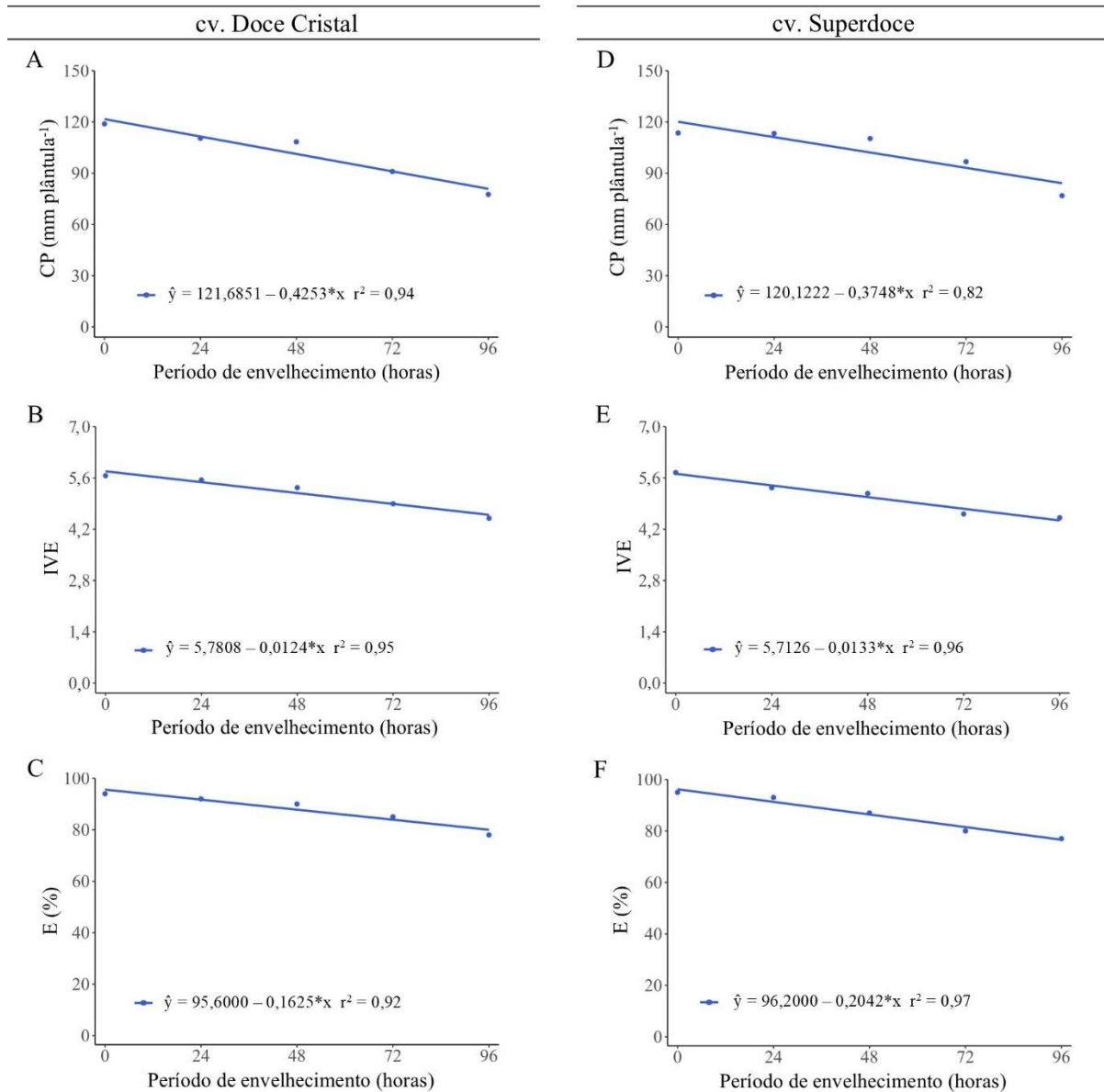


Figura 11. Comprimento de plântula (A e D), índice de velocidade de emergência (B e E) e emergência (C e F) em sementes de duas cultivares de milho-doce submetidas a diferentes períodos de envelhecimento artificial. *, ns = significativo e não significativo pelo teste t a 5% de probabilidade.

4.2. Alterações bioquímicas

4.2.1. Ensaio I: Envelhecimento natural (armazenamento)

Na Tabela 4 são apresentados os dados relacionados às determinações de proteínas solúveis e atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). Para a cv. Doce Cristal, nota-se que não houve interação entre os fatores ambiente e período de armazenamento no que se refere a essas variáveis. Em relação ao conteúdo de proteína e à atividade da enzima SOD, foram observadas significâncias apenas para o fator período de

armazenamento. Já para CAT é possível relatar efeito significativo individual para ambos os fatores estudados. Desta forma, para essa enzima, pode-se constatar menor atividade nas sementes mantidas em AMB quando comparadas com aquelas acondicionadas em CF.

Tabela 4. Conteúdo de proteínas, atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) em sementes de duas cultivares de milho-doce durante doze meses de armazenamento em câmara fria (CF) e ambiente não controlado (AMB).

Período (meses)	Proteína (mg g ⁻¹ MS)		SOD (U min ⁻¹ mg ⁻¹ de proteína)		CAT (μmol min ⁻¹ mg ⁻¹ de proteína)	
	CF	AMB	CF	AMB	CF	AMB
cv. Doce Cristal						
3	40,15	40,33	1,28	1,29	3,28	2,94
6	37,97	39,25	1,49	1,45	3,07	3,09
9	39,24	36,63	1,47	1,68 γ	3,10	2,83
12	36,93	35,45 γ	1,39	1,45	2,98	1,48 γ
Média	38,57 A	37,91 A	1,41 A	1,47 A	3,11 A	2,58 B
Inicial	40,04		1,37		3,04	
F (A)	0,69 ^{ns}		2,42 ^{ns}		6,86*	
F (P)	7,66*		12,42*		3,33*	
F (A x P)	2,03 ^{ns}		2,15 ^{ns}		2,15 ^{ns}	
CV _(a) (%)	5,87		7,62		19,77	
CV _(b) (%)	4,48		6,76		22,65	
cv. Superdoce						
3	39,88	39,04	1,27 A	1,29 A	3,66	4,01
6	39,94	40,40	1,29 A	1,19 A	3,82	3,96
9	38,85	38,24 γ	1,38 A	1,16 A	3,78	3,25
12	38,01 γ	37,13 γ	1,22 A	0,58 B γ	3,63	2,28 γ
Média	39,17 A	38,70 A	1,29	1,06	3,72 A	3,37 A
Inicial	41,23		1,11		3,62	
F (A)	3,26 ^{ns}		22,84*		2,33 ^{ns}	
F (P)	5,52*		9,21*		3,16*	
F (A x P)	0,43 ^{ns}		5,82*		2,53 ^{ns}	
CV _(a) (%)	1,87		11,69		18,23	
CV _(b) (%)	3,49		14,38		19,18	

Médias seguidas pela mesma letra, na linha, não diferem entre si pelo teste F, a 5% de probabilidade.

F (A): valor de F calculado para o efeito isolado do fator ambiente de armazenamento; F (P): valor de F calculado para o efeito isolado do fator período de armazenamento; (A x P): valor de F calculado para interação entre os fatores ambiente e período de armazenamento. *, ns = significativo e não significativo pelo teste F a 5% de probabilidade. γ = Médias diferem da testemunha (inicial), no nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Dunnett.

Ainda para cv. Doce Cristal, ao se avaliar o efeito do fator período de armazenamento, observa-se um ligeiro declínio linear no conteúdo de proteína e aumento na atividade da enzima SOD nas sementes mantidas em AMB (Figuras 12A e 12B). Para esse mesmo ambiente, percebe-se redução na atividade da enzima CAT a partir dos 6 meses de armazenamento (Figura 12C). Nas sementes armazenadas em CF, não foram encontradas diferenças no conteúdo de proteínas, bem como na atividade enzimática da SOD e CAT.

Segundo Santos *et al.* (2004), a deterioração não pode ser evitada, porém, pode ser minimizada em condições adequadas de armazenamento. Considerando que com o decorrer do armazenamento em câmara fria por 12 meses não houve alterações relevantes na atividade das enzimas SOD e CAT, supõe-se que a baixa temperatura e umidade relativa do ar encontradas nesse ambiente favoreceu a redução da atividade metabólica das sementes, evitando o acúmulo de espécies reativas de oxigênio e retardando o processo de deterioração.

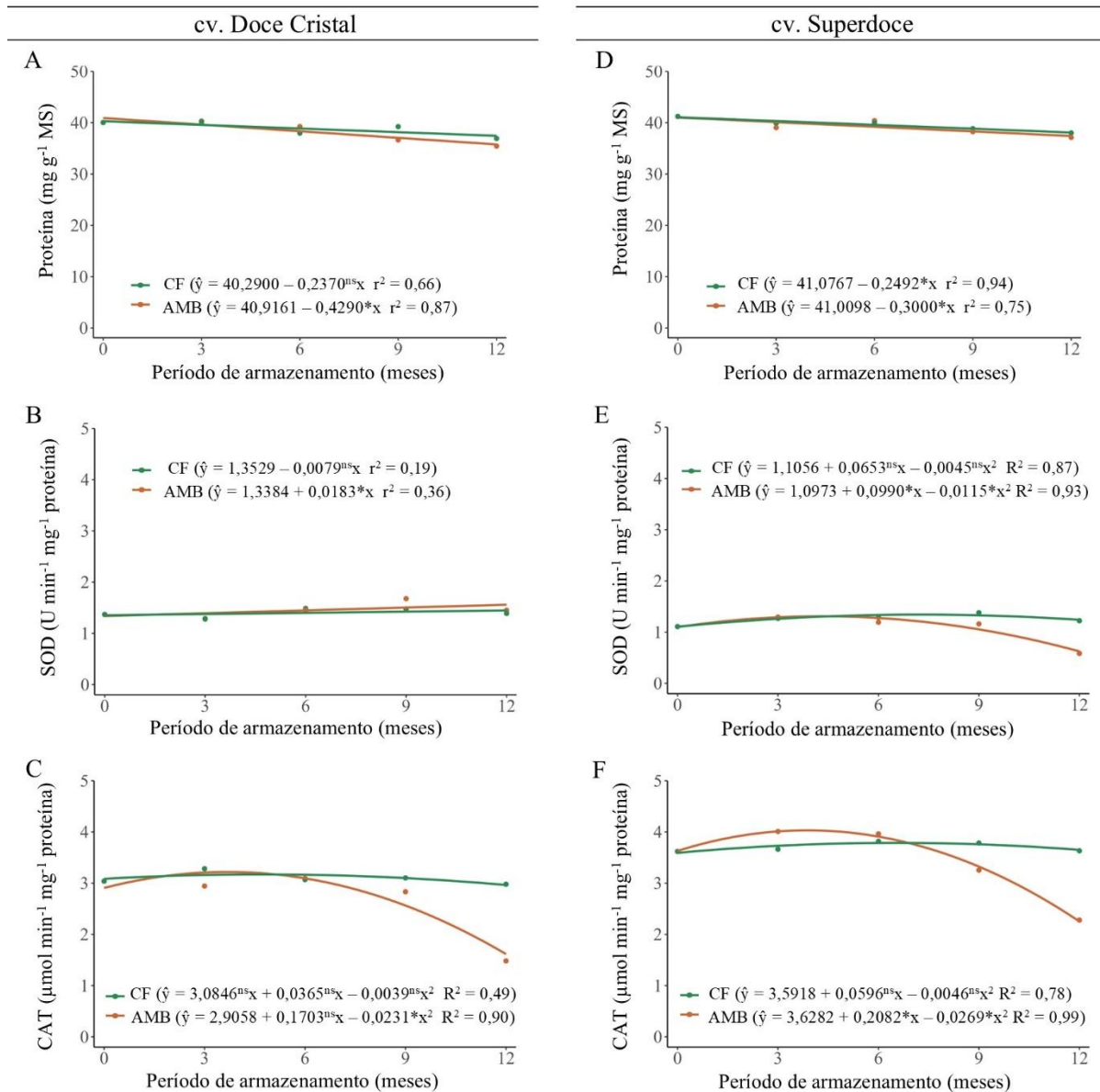


Figura 12. Conteúdo de proteínas (A e D), atividade das enzimas superóxido dismutase (B e E) e catalase (C e F) em sementes de duas cultivares de milho-doce durante doze meses de armazenamento em câmara fria (CF) e ambiente não controlado (AMB). *, ns = significativo e não significativo pelo teste t a 5% de probabilidade.

Com relação aos resultados da cv. Superdoce, pode-se observar que não houve interação significativa entre os fatores ambiente e período de armazenamento, para conteúdo de proteínas

e atividade da CAT (Tabela 4). Também foi possível constatar que não houve diferença no conteúdo de proteínas e na atividade da CAT entre as sementes mantidas em CF e AMB. Entretanto, foi possível verificar a existência de efeito isolado significativo para o período de armazenamento, para ambas as variáveis. Assim, houve um ligeiro declínio no conteúdo de proteínas ao longo do armazenamento em CF e em AMB (Figura 12D). Por sua vez, para CAT, foi observada redução na atividade somente durante o armazenamento em AMB e a partir dos 6 meses (Figura 12F). Quanto à enzima SOD, constata-se interação significativa entre ambiente e período de armazenamento (Tabela 4). Desse modo, aos 12 meses de armazenamento sementes mantidas em AMB tiveram menor atividade de SOD quando comparadas com as acondicionadas em CF. Ademais, nota-se um ligeiro incremento na atividade dessa enzima no armazenamento em AMB até 6 meses de armazenamento, ocorrendo decréscimos a partir desse período (Figura 12E), similar ao evidenciado para a enzima CAT.

Em ambas cultivares, sementes armazenadas em AMB por 12 meses apresentaram menor atividade da CAT quando comparadas com as recém-colhidas (inicial) (Tabela 4). Tal fato também foi observado em relação às variáveis proteína e enzima SOD, para a cv. Doce Cristal e Superdoce, respectivamente. Além disso, nota-se que os valores de proteína foram menores que os obtidos antes do armazenamento a partir dos 9 meses para sementes acondicionadas em AMB e aos 12 meses para sementes mantidas em CF, para cv. Superdoce.

Alterações em proteínas durante o declínio do vigor das sementes, têm sido associadas ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) que resulta no estresse oxidativo (XING *et al.*, 2023). De acordo com esses autores, no decorrer do envelhecimento as proteínas hidroxiladas, devido a ação de oxidantes altamente ativos, irão se acumular e agregar, ocasionando redução no teor de proteína solúvel e diminuição na atividade enzimática. A redução do conteúdo proteico das sementes implica em menor fornecimento de energia para o crescimento do eixo embrionário (MARCOS-FILHO, 2015, LV *et al.*, 2018), como também pode levar a inibição do processo de síntese *de novo* de proteínas durante a germinação das sementes, o que afeta a longevidade das mesmas e o desenvolvimento de plântulas normais (SANO *et al.*, 2016).

A remoção intracelular de EROs, evitando o dano oxidativo, está relacionada a ativação do sistema de defesa antioxidativo, o qual inclui as enzimas antioxidantes (KUMAR *et al.*, 2015). A enzima SOD atua na dismutação do radical superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$) a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio, sendo considerada a primeira linha de defesa contra as EROs (GILL *et al.*, 2015; SCANDALIOS, 1993, BOWLER *et al.*, 1992; NOCTOR *et al.*, 2018). O H_2O_2 é menos reativo que o $\bullet\text{O}_2^-$, porém também é tóxico e apresenta uma meia vida maior,

além de possuir facilidade de atravessar as membranas celulares (MITTLER, 2017). Ao receber mais um elétron o H_2O_2 pode originar o radical hidroxila ($\bullet OH$) que é muito reativo e está envolvido na oxidação dos fosfolipídios de membranas celulares, como também em danos no DNA e degradação de proteínas. Nesse contexto, a enzima CAT desempenha um papel fundamental na proteção das células vegetais, convertendo o H_2O_2 em água e oxigênio, sem a produção de radicais livres (KIBINZA, 2011; MITLLER; BLUMWALD, 2017).

Oliveira *et al.* (2020) observaram redução na atividade da SOD e CAT em sementes de milho híbrido após 9 meses de armazenamento em armazém convencional (23 °C e 62% UR). Os autores associaram a expressão enzimática reduzida ao processo de deterioração, ocasionando em queda da qualidade fisiológica das sementes. Timóteo e Marcos-Filho (2013) relatam que redução na atividade da catalase pode aumentar a formação de peróxidos nas células, tornando as sementes mais sujeitas à perda de viabilidade. Na literatura, também há relatos de aumentos na expressão da SOD e CAT no início do armazenamento das sementes, sendo esse interpretado como uma tentativa das células em diminuir o acúmulo de EROs formadas devido ao envelhecimento ou a qualquer estresse biótico ou abiótico (OLIVEIRA *et al.*, 2020).

Houve interação significativa entre os fatores ambiente e período de armazenamento, quanto à atividade das enzimas peroxidases (APX e POX), para cv. Doce Cristal (Tabela 5). Para essas enzimas, diferenças entre os ambientes foram observadas aos 9 e 6 meses, com menores valores em AMB. Ainda para a cv. Doce Cristal, foram constatadas reduções lineares na atividade da APX apenas nas sementes armazenadas em AMB (Figura 13A). Já para POX foram verificados decréscimos lineares nos dois ambientes estudados, porém ao longo do armazenamento em AMB a queda na atividade enzimática foi mais acentuada (Figura 13B). Em relação ao conteúdo de malonaldeído (MDA), não houve efeito simultâneo e nem independente dos fatores ambiente e período de armazenamento (Tabela 5 e Figura 13C).

Para a cv. Superdoce, não ocorreu interação entre ambiente e período de armazenamento para a atividade da enzima APX. Entretanto, verificou-se efeito isolados desses fatores. Assim, avaliando o comportamento das sementes nos diferentes ambientes, nota-se menor atividade dessa enzima no armazenamento em AMB (Tabela 5). Ao analisar o efeito do período de armazenamento, foi possível constatar que as reduções da atividade da APX ocorreram de forma linear tanto em CF como em AMB, embora nesta última condição tenha sido bem mais acentuada (Figura 13D). Por sua vez, para enzima POX, a interação entre os fatores estudados foi significativa. Desta forma, foi observado menor atividade da POX em AMB aos 6 meses de armazenamento. A queda na atividade dessa enzima também ocorreu linearmente (Figura 13E)

e de maneira semelhante a relatada para a APX. Quanto ao conteúdo de MDA, assim como mencionado para cv. Doce Cristal, não foi verificada interação entre os fatores ambiente e período de armazenamento, também não houve efeito significativo individual.

Tabela 5. Atividade da enzima peroxidase do ascorbato (APX), peroxidase (POX) e conteúdo de malonaldeído (MDA) em sementes de duas cultivares de milho-doce durante doze meses de armazenamento em câmara fria (CF) e ambiente não controlado (AMB).

Período (meses)	APX (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹ de proteína)		POX (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹ de proteína)		MDA (nmol g ⁻¹ de MS)	
	CF	AMB	CF	AMB	CF	AMB
cv. Doce Cristal						
3	11,82 A	12,78 A	46,60 A	43,76 A γ	7,58	7,69
6	10,48 A	8,74 A γ	44,67 A	33,00 B γ	8,04	8,11
9	11,63 A	7,62 B γ	40,89 A γ	27,12 B γ	7,54	8,35
12	10,54 A	5,80 B γ	31,69 A γ	17,11 B γ	7,79	8,31
Média	11,12	9,11	40,96	30,25	7,74 A	8,12 A
Inicial	12,33		52,78		7,78	
F (A)	12,32*		33,16*		3,80 ^{ns}	
F (P)	15,44*		36,78*		0,44 ^{ns}	
F (A x P)	8,53*		3,48*		0,36 ^{ns}	
CV _(a) (%)	19,36		14,78		6,87	
CV _(b) (%)	12,51		11,47		10,69	
cv. Superdoce						
3	10,91	8,59	52,06 A	50,21 A	8,65	8,68
6	9,85	8,23	46,98 A	36,60 B γ	8,86	8,64
9	9,57	5,77 γ	43,45 A	31,89 B γ	8,79	8,71
12	7,84 γ	4,13 γ	38,02 A γ	19,28 B γ	9,15	9,49
Média	9,54 A	6,68 B	45,13	34,49	8,86 A	8,88 A
Inicial	10,07		49,43		8,42	
F (A)	71,80*		60,95*		0,01 ^{ns}	
F (P)	17,45*		26,06*		1,33 ^{ns}	
F (A x P)	1,82 ^{ns}		3,59*		0,21 ^{ns}	
CV _(a) (%)	11,78		9,68		7,08	
CV _(b) (%)	13,86		12,98		8,28	

Médias seguidas pela mesma letra, na linha, não diferem entre si pelo teste F, a 5% de probabilidade.

F (A): valor de F calculado para o efeito isolado do fator ambiente de armazenamento; F (P): valor de F calculado para o efeito isolado do fator período de armazenamento; (A x P): valor de F calculado para interação entre os fatores ambiente e período de armazenamento. *, ns = significativo e não significativo pelo teste F a 5% de probabilidade. γ = Médias diferem da testemunha (inicial), no nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Dunnett.

Quando comparados os valores de atividade da enzima APX durante o armazenamento em AMB com os observados para as sementes recém-colhidas (inicial), nota-se reduções a partir de 6 meses, para a cv. Doce Cristal (Tabela 5). Para essa mesma cultivar, verificou-se diferenças nos valores médios de atividade da POX entre as sementes armazenadas e as recém-colhidas (inicial), com menor atividade aos três e nove meses para as sementes mantidas em AMB e CF, respectivamente. Considerando a cv. Superdoce, as sementes armazenadas em CF

por 12 meses apresentaram valores inferiores de atividade das enzimas APX e POX em relação aos obtidos antes do armazenamento das sementes. Em AMB, a atividade foi menor a partir de 9 meses, para a APX, e de 6 meses, para a POX. Já os conteúdos de MDA obtidos antes do armazenamento não diferiram significativamente dos observados ao longo do armazenamento independente do ambiente.

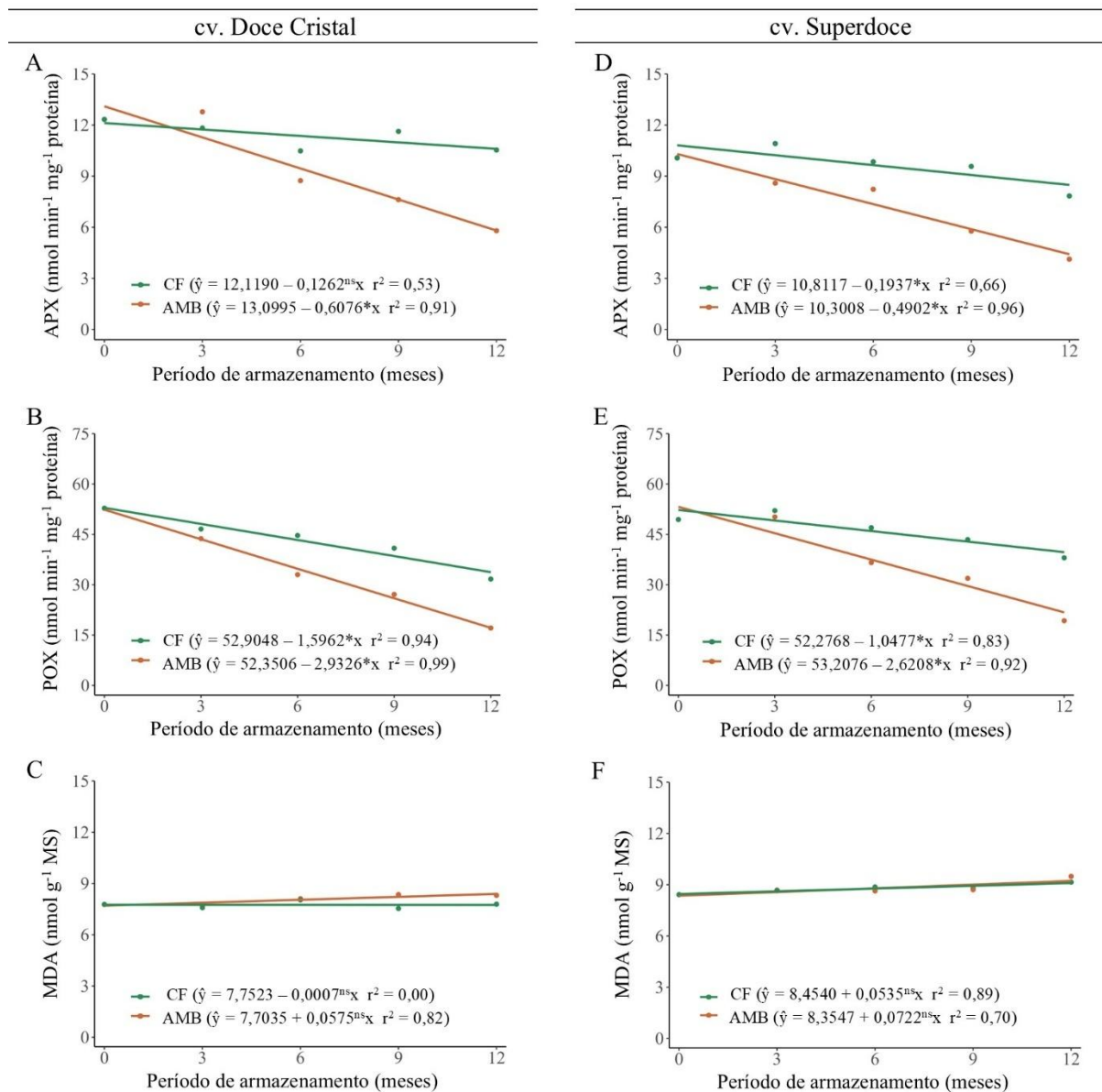


Figura 13. Atividade da enzima peroxidase do ascorbato (A e D), peroxidase (B e E) e conteúdo de malonaldeído (C e F) em sementes de duas cultivares de milho-doce durante doze meses de armazenamento em câmara fria (CF) e ambiente não controlado (AMB). *, ns = significativo e não significativo pelo teste t a 5% de probabilidade.

As enzimas APX e POX fazem parte de um amplo grupo de peroxidases que atuam na eliminação do H_2O_2 , formando água (DE GARRA, 2004; SMIRNOFF, 2018). Devido a essas enzimas atuarem na desintoxicação celular, reduções em suas atividades podem comprometer

a capacidade de prevenção e/ou reparo de danos oxidativos, o que acarreta deterioração das sementes. É importante destacar que na presente pesquisa, as enzimas peroxidases permitiram a identificação do nível de deterioração das sementes. De maneira semelhante, Heberle *et al.* (2019) constataram que as peroxidases apresentam potencial para detectar o processo de deterioração em sementes de milho, sendo, portanto, uma ferramenta eficiente na avaliação da qualidade fisiológica de sementes armazenadas.

Em síntese, observa-se que as enzimas APX e POX foram as que mais tiveram redução na atividade ao longo do armazenamento, para as duas cultivares, tanto em CF como em AMB (Figura 13), seguidas pela CAT, cuja atividade decresceu a partir de 6 meses apenas em AMB. Para a SOD o decréscimo ocorreu também em AMB, mas somente para as sementes da cv. Superdoce (Figura 12). A redução na atividade destas enzimas antioxidantes está relacionada ao processo de deterioração das sementes (EBONE; CAVERZAN; CHAVARRIA, 2019) que resulta na redução no seu potencial fisiológico, conforme pode ser constatado pelos resultados dos testes de vigor, principalmente condutividade elétrica (Figuras 6A e 6D), teste de frio (Figuras 6B e 6E) e comprimento de plântulas (Figuras 7A e 7D).

O acúmulo de EROs aliado a um sistema enzimático antioxidante prejudicado, durante a deterioração das sementes, pode levar à peroxidação lipídica (RATAJACZAK *et al.*, 2019). Essa consiste em um processo de auto-oxidação que causa modificações na permeabilidade de membranas, levando à destruição das mesmas e ao colapso da célula (ZHANG *et al.*, 2021; EBONE; CAVERZAN; CHAVARRIA, 2019). Considerando que o malonaldeído (MDA) é um subproduto da peroxidação lipídica, o aumento em seu conteúdo tem sido associado a perda do vigor e da capacidade de germinação das sementes. Incrementos no conteúdo de MDA, ao longo do armazenamento, foram relatados para sementes de soja (SHARMA *et al.*, 2013) e *Moringa oleifera* (FOTOUO-M *et al.*, 2020).

Pelos resultados apresentados na Tabela 5 e Figura 13, nota-se que para sementes de milho-doce não ocorreram aumentos significativos no conteúdo de MDA no decorrer do armazenamento por 12 meses, em ambos os ambientes estudados, o que sugere que para essa espécie, provavelmente, a peroxidação lipídica seja um mecanismo secundário na perda da qualidade fisiológica das sementes, atuando em estádios mais avançados de deterioração. Em sementes de ervilha, a peroxidação de lipídios foi evidenciada durante o armazenamento apenas em sementes inviáveis (VESELOVA; VESELOVSKY; OBROUCHEVA, 2015). De acordo com esses autores, à deterioração precoce de sementes de ervilha durante o envelhecimento natural, está mais relacionada à hidrólise não enzimática de carboidratos.

Nas análises de açúcares solúveis totais (AST), redutores (AR) e não redutores (ANR) não houve interação significativa entre ambiente e período de armazenamento (Tabela 6), em ambas cultivares, assim estudou-se os fatores de forma isolada. Considerando os resultados da cv. Doce Cristal, nota-se que não ocorreram diferenças entre os ambientes de armazenamento (CF e AMB), para essas variáveis. Entretanto, houve efeito significativo para o fator período de armazenamento, quanto à AST e ANR, o que não foi observado para os AR. Assim, é possível observar que a porcentagens de açúcares solúveis totais e não redutores reduziram de forma linear à medida que se aumentou o período de armazenamento em AMB (Figuras 14A e 14C). Para as sementes armazenadas em CF observou-se uma tendência ligeira de queda nos valores absolutos, porém nenhum modelo apresentou ajuste significativo.

Com base nos dados da cultivar Superdoce, observa-se efeito isolado significativo para o ambiente e período de armazenamento, quanto à AST e AR (Tabela 6). Maiores porcentagens de açúcares solúveis totais e redutores foram obtidos em AMB em relação à CF. Além disso, constata-se que o conteúdo de AST foi praticamente mantido em CF, ocorrendo reduções mais evidentes em AMB a partir do sexto mês (Figura 14D). Já os AR decresceram linearmente ao longo de todo armazenamento em ambos os ambientes (Figura 14E), enquanto os ANR não apresentaram alterações significativas em CF, como também em AMB (Figura 14F).

Ao analisar os valores obtidos antes (inicial) e durante o armazenamento, observa-se que aos 12 meses ocorreu redução nos conteúdos de AST, em ambos os ambientes, e de ANR em AMB, para a cv. Doce Cristal (Tabela 6). Em relação à cv. Superdoce os conteúdos de AST aos 12 meses em AMB e de AR a partir de 6 meses em ambos os ambientes decresceram em comparação com os valores obtidos antes do armazenamento das sementes.

Reduções na quantidade de AST e ANR indicam sua oxidação para produção de energia durante a respiração, o que pode limitar a disponibilidade de substratos para germinação das sementes (BEWLEY; BLACK, 1994). Além disso, o declínio dos mesmos, pode interferir na proteção das membranas celulares, uma vez que açúcares do tipo rafinose, sacarose, estaquiase e verbascose são importantes na formação do estado vítreo no citoplasma (MARCOS-FILHO, 2015; REJ *et al.*, 2024). Neste estado, as reações deterioravas são restritas devido à alta viscosidade do citoplasma, possibilitando o retardamento dos efeitos do nocivos de radicais livres e favorecendo a manutenção da qualidade fisiológica das sementes (RANGANATHAN; GROOT, 2023; LEOPOLD; SUN; BERNAL-LUGO, 1994).

A presença de altos teores de açúcares redutores, como glicose e frutose, pode acarretar alterações em proteínas e no material genético, por meio das reações de Amadori e Maillard. Essas reações, não são enzimáticas e têm início quando um grupo carbonila do açúcar redutor

se liga a um grupo amino da proteína ou do ácido nucléico (MURTHY; KUMAR; SUN, 2003). A combinação dessas moléculas gera uma base Schiff reversível que se rearranja produzindo produtos de Amadori (CUI et al., 2021). Em seguida, ocorrem uma série de reações que resultam na fragmentação dos produtos de Amadori e na formação de aldeídos, cetonas, dicarbonilas e compostos heterocíclicos (CUI et al., 2021, HODGE, 1953). Ao final desse complexo de reações, esses compostos são transformados em pigmentos poliméricos de coloração marrom, como as meloidinas, que são responsáveis pelo escurecimento do tegumento das sementes (MARCOS-FILHO, 2015).

Tabela 6. Açúcares solúveis totais (AST), açúcares redutores (AR) e açúcares não redutores (ANR) em sementes de duas cultivares de milho-doce durante doze meses de armazenamento em câmara fria (CF) e ambiente não controlado (AMB).

Período (meses)	AST (mg g ⁻¹)		AR (mg g ⁻¹)		ANR (mg g ⁻¹)	
	CF	AMB	CF	AMB	CF	AMB
cv. Doce Cristal						
3	38,81	37,68	8,01	8,87	30,80	28,81
6	38,94	36,43	9,20	8,72	29,74	27,71
9	35,95	34,80	9,63	9,37	26,32	25,43
12	33,71 γ	31,86 γ	8,57	8,28	25,14	23,58 γ
Média	36,85 A	35,19 A	8,85 A	8,81 A	28,00 A	26,38 A
Inicial	40,12		8,39		31,73	
F (A)	5,27 ^{ns}		0,03 ^{ns}		3,29 ^{ns}	
F (P)	7,83*		1,14 ^{ns}		5,69*	
F (A x P)	0,14 ^{ns}		0,41 ^{ns}		0,06 ^{ns}	
CV _(a) (%)	5,67		7,27		9,27	
CV _(b) (%)	6,99		15,37		10,96	
cv. Superdoce						
3	46,99	46,45	12,14	11,69	34,85	34,76
6	46,47	44,83	9,85 γ	7,88 γ	36,62	36,95
9	43,59	41,93	7,70 γ	7,35 γ	35,89	34,58
12	44,48	38,52 γ	7,18 γ	5,44 γ	37,30	33,08
Média	45,38 A	42,93 B	9,22 A	8,09 B	36,16 A	34,84 A
Inicial	47,64		13,88		33,76	
F (A)	21,68*		7,37*		4,16 ^{ns}	
F (P)	4,74*		45,48*		0,63 ^{ns}	
F (A x P)	1,15 ^{ns}		1,38 ^{ns}		0,86 ^{ns}	
CV _(a) (%)	3,36		13,56		5,15	
CV _(b) (%)	7,19		11,70		8,84	

Médias seguidas pela mesma letra, na linha, não diferem entre si pelo teste F, a 5% de probabilidade.

F (A): valor de F calculado para o efeito isolado do fator ambiente de armazenamento; F (P): valor de F calculado para o efeito isolado do fator período de armazenamento; (A x P): valor de F calculado para interação entre os fatores ambiente e período de armazenamento. *, ns = significativo e não significativo pelo teste F a 5% de probabilidade. γ = Médias diferem da testemunha (inicial), no nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Dunnett.

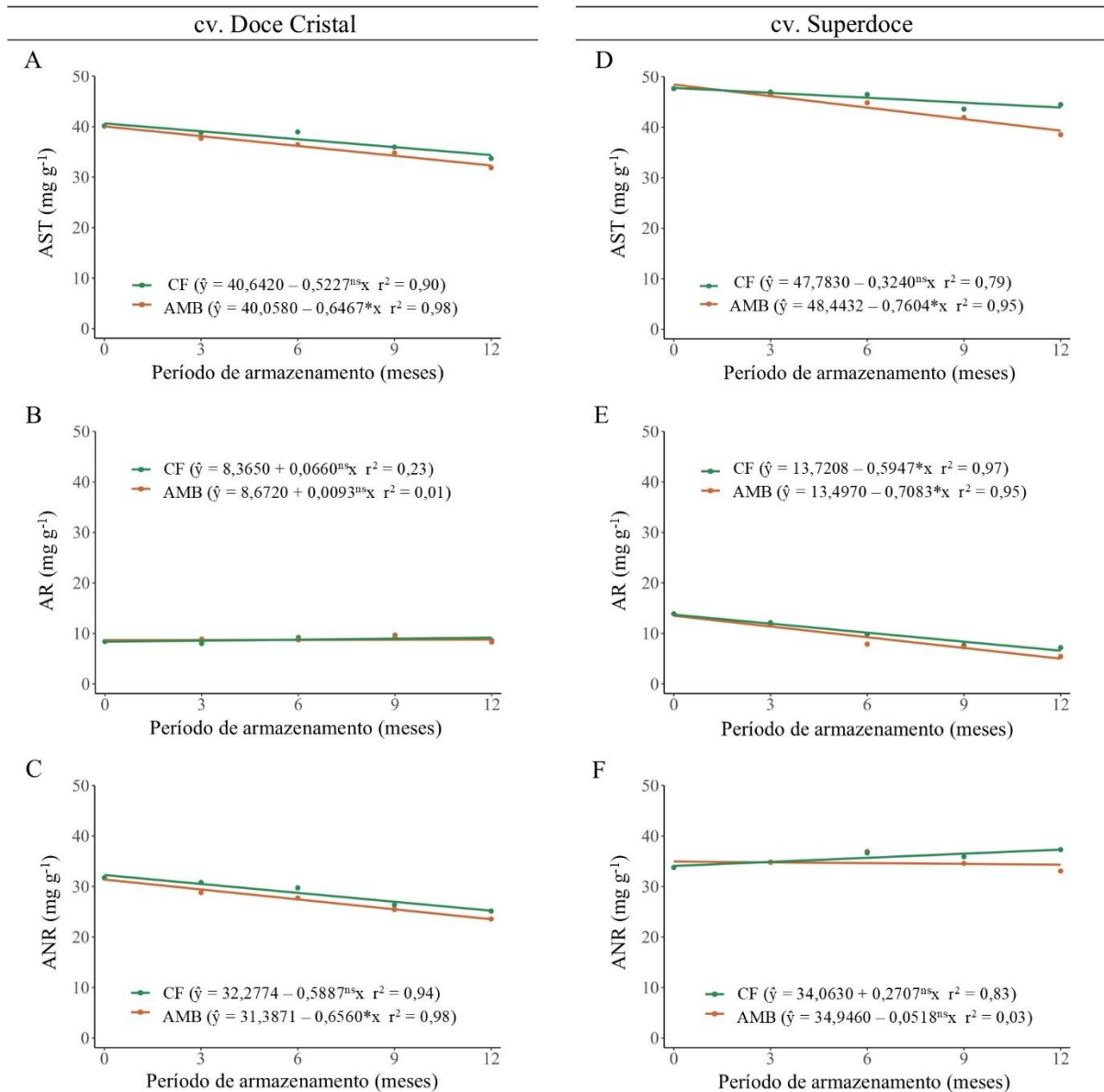


Figura 14. Açúcares solúveis totais (A e D), redutores (B e E) e não redutores (C e F) em sementes de duas cultivares de milho-doce durante doze meses de armazenamento em câmara fria (CF) e ambiente não controlado (AMB). *, ns = significativo e não significativo pelo teste t a 5% de probabilidade.

O declínio dos AST encontrados no presente trabalho sugerem a ocorrência de hidrólise de sacarose e/ou oligossacarídeos, o que deveria resultar em aumentos no teor de AR. Porém, para cv. Doce Cristal não foram observadas alterações nos açúcares redutores. Já para cv. Superdoce houve redução nos mesmos. O desaparecimento dos AR pode ser explicado por seu consumo nas reações de Amadori e Maillard (BERNAL-LUGO; LEOPLD, 1992). Desta forma, acredita-se que essas reações estejam ocorrendo no decorrer do armazenamento das sementes, porém o balanço entre produção (a partir da hidrólise de açúcares) e consumo de AR nas sementes, provavelmente, ainda esteja favorável ao não acúmulo de monossacarídeos (glicose e frutose), devido à deterioração não ter sido tão drástica. Em sementes de milho,

Bernal-Lugo e Leopold (1992) verificaram diminuição do conteúdo de rafinose e declínio nos teores de açúcares redutores durante a deterioração das sementes. Para essa mesma espécie, também há relatos de presença de monossacarídeos e de esgotamento de sacarose em sementes que perderam a capacidade de germinar (OVCHAROV; KOSHELEV, 1974 *apud* KOSTER; LEOPOLD, 1988).

Vale ressaltar que não houve uma relação evidente entre os teores de AR (Tabela 6) e qualidade fisiológica das sementes avaliada por meio dos testes de vigor e pela germinação (Tabelas 1, 2 e 3). Assim, pode-se afirmar que os AR não se constituíram em marcadores eficientes para detectar o grau de deterioração. Também, destaca-se que estudos relacionados ao consumo de carboidratos ao longo do envelhecimento das sementes de milho-doce são escassos na literatura. Nesse sentido, novas pesquisas que determinem o conteúdo de AST e monossacarídeos, bem como dos produtos das reações de Amadori e Maillard, devem ser realizados para melhor compreensão do papel dos açúcares na deterioração das sementes com diferentes níveis de qualidade.

4.2.2. Ensaio II: Envelhecimento artificial

As alterações no conteúdo de proteínas ao longo do envelhecimento artificial (Figuras 15A e 15D) foram semelhantes às observadas durante o armazenamento (Figuras 12A e 12D), com ligeiro decréscimo com o decorrer do tempo para ambas as cultivares. Reduções no conteúdo de proteínas durante o envelhecimento também foram relatadas por Basavarajappa et al. (1991) em sementes de milho. Além disso, esses autores observaram aumento na concentração de aminoácidos livres com a deterioração das sementes, o que indica degradação proteica por proteases.

Não houve alteração na atividade da SOD com o decorrer do envelhecimento artificial das sementes da cv. Doce Cristal (Figura 15B), enquanto para a cv. Superdoce, observou-se um ligeiro aumento entre 0 e 24 h, estabilizando entre 24 e 48 h, decrescendo a partir daí. Em geral, resultados semelhantes foram obtidos para a CAT, cuja atividade foi praticamente mantida até 48 h de envelhecimento declinando em seguida para as sementes de ambas as cultivares (Figuras 15C e 15F). Houve semelhança entre estes resultados e os obtidos ao longo do armazenamento das sementes de ambas as cultivares em ambiente não controlado (AMB), enquanto em câmara fria (CF) não houve alteração expressiva na atividade tanto da SOD como da CAT (Figuras 12B, 12C, 12E e 12F).

Por outro lado, a atividade das enzimas APX (Figuras 16A e 16D) e POX (Figuras 16B e 16E) diminuiu linearmente com o decorrer do envelhecimento artificial das sementes de

ambas as cultivares, enquanto o conteúdo de MDA praticamente não se alterou (Figuras 16C e 16F). Observações similares também foram constatadas durante o armazenamento das sementes de ambas as cultivares tanto em CF como em AMB (Figura 13).

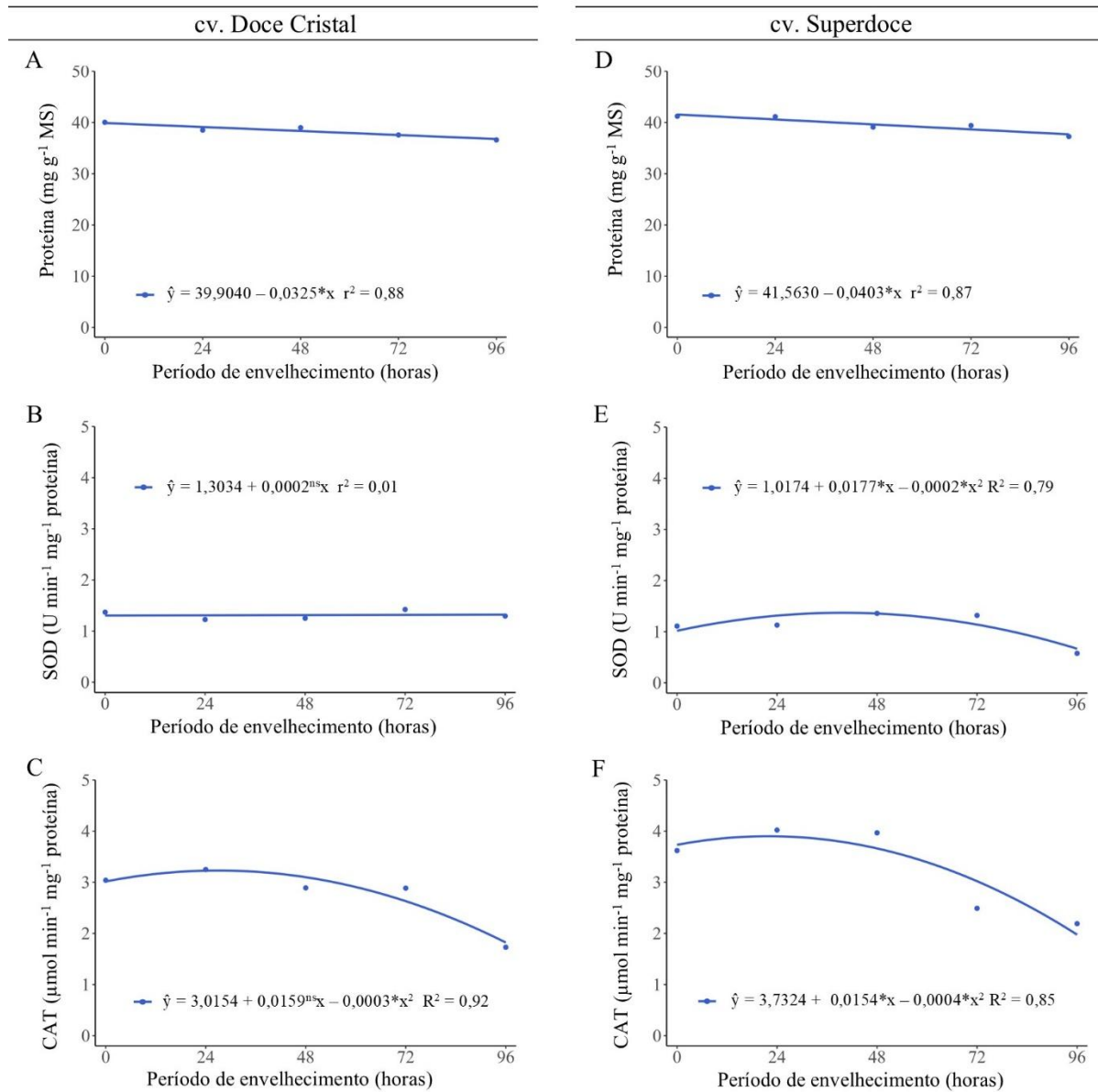


Figura 15. Conteúdo de proteínas (A e D), atividade das enzimas superóxido dismutase (B e E) e catalase (C e F) em sementes de duas cultivares de milho-doce submetidas a diferentes períodos de envelhecimento artificial. *, ns = significativo e não significativo pelo teste t a 5% de probabilidade.

As alterações na atividade da APX e POX durante o envelhecimento artificial (Figura 16) são coerentes com os resultados observados para os testes de germinação (Figuras 9C e 9G) e vigor (Figuras 9D, 9H, 10 e 11) que também evidenciaram redução linear no potencial fisiológico das sementes com o aumento do período de envelhecimento. No entanto, a atividade das enzimas antioxidantes SOD (Figura 15E), nas sementes da cv. Superdoce, e CAT (Figuras

15C e 15F), em ambas as cultivares, só foram afetadas pelas condições de alta temperatura e UR do envelhecimento artificial após um período de 48 h.

Portanto, pode-se afirmar que as alterações observadas na atividade das enzimas antioxidantes, durante o envelhecimento artificial (Figuras 15 e 16) e armazenamento das sementes (Figuras 12 e 13) tiveram correspondência com as modificações no vigor das sementes, conforme ficou evidente pelos testes de condutividade elétrica, de frio, envelhecimento acelerado (Figuras 6 e 10) e comprimento de plântula (Figuras 7A, 7D, 11A e 11D).

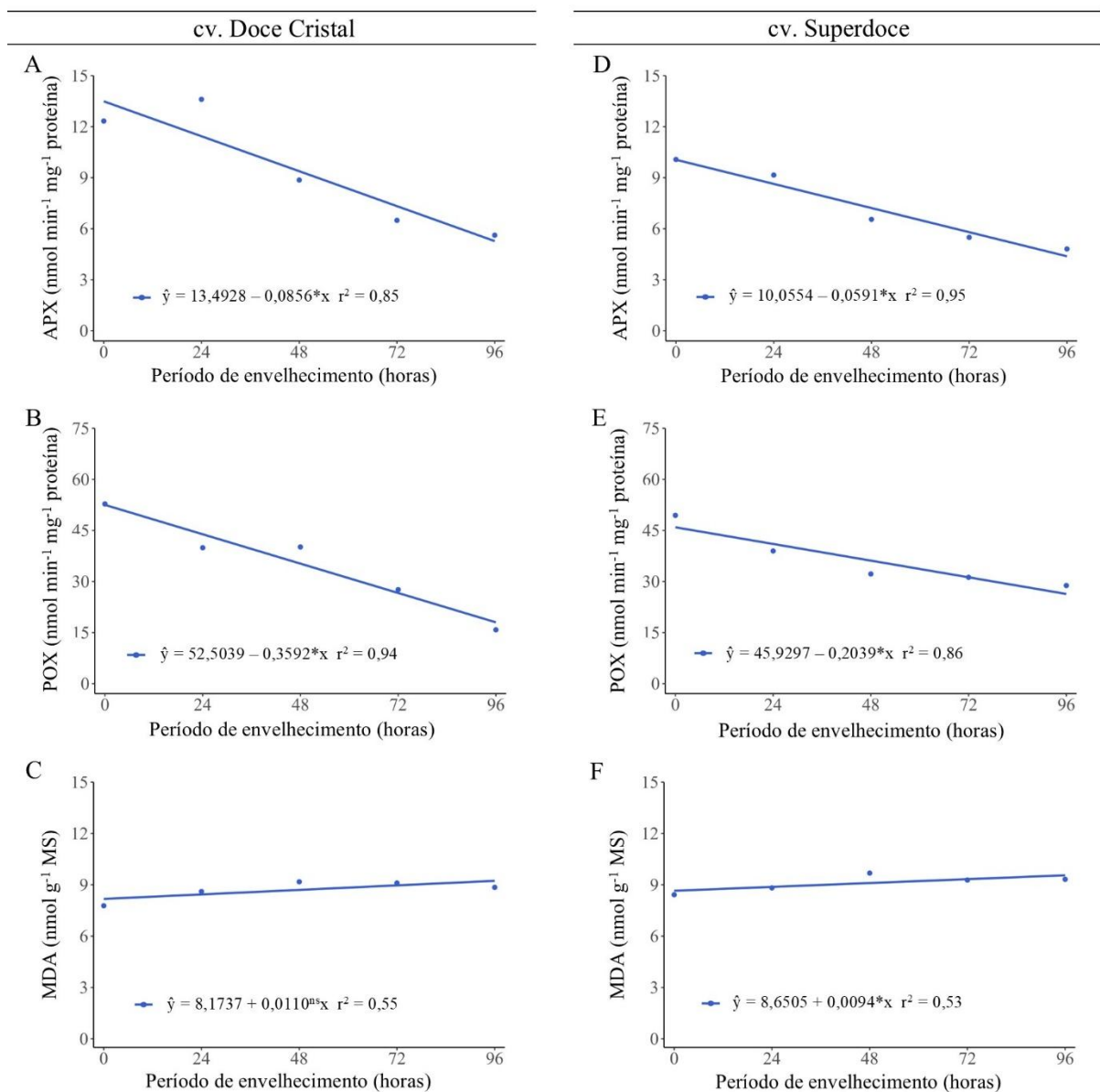


Figura 16. Atividade da enzima peroxidase do ascorbato (A e D), peroxidase (B e E) e conteúdo de malonaldeído (C e F) em sementes de duas cultivares de milho-doce submetidas a diferentes períodos de envelhecimento artificial. *, ns = significativo e não significativo pelo teste t a 5% de probabilidade.

Vários autores relataram que o envelhecimento das sementes de milho está associado ao decréscimo na atividade das enzimas antioxidantes (SPINOLA; CÍCERO; MELO, 2000; KAPILAN, 2015; KAVITHA *et al.*, 2017; MANSOURI-FAR *et al.*, 2015). Segundo esses autores a redução na atividade enzimática é ainda mais intensificada com o aumento do período de exposição das sementes a condições de alta umidade relativa (UR) e temperatura durante o envelhecimento artificial. Alta UR implica em aumento no grau de umidade das sementes, o que acelera a atividade respiratória, contribuindo para uma maior produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e oxidação enzimática (EBONE; CAVERZAN; CHAVARRIA, 2019). Os acréscimos na temperatura intensificam a velocidade dos processos bioquímicos ligados à deterioração (DELOUCHE *et al.*, 1973).

Houve um ligeiro decréscimo no conteúdo de açúcares totais (AST) (Figuras 17A e 17D) com o aumento do período de envelhecimento artificial das sementes de ambas as cultivares. Em relação aos teores de açúcares não redutores (ANR) ocorreu redução linear apenas para cv. Doce Cristal (Figura 17C). Além disso, observa-se que não houve alterações relevantes nos teores de açúcares redutores (AR) (Figuras 17B e 17E).

Os decréscimos no conteúdo de AST pode estar relacionado à quebra hidrolítica da sacarose e de oligossacarídeos em açúcares simples, devido ao aumento do metabolismo da semente provocado pela alta UR e temperatura na qual essas foram expostas durante o envelhecimento artificial. Neste contexto, seria esperado que a redução dos AST ocasionasse aumentos nos teores de AR, o que não foi observado para ambas cultivares. Assim, esses resultados sugerem que esteja ocorrendo um balanço entre a formação de AR, a partir da hidrólise de açúcares complexos, como também seu consumo por meio das reações de Amadori e Maillard de forma a não se verificar alterações significativas nos teores desses açúcares.

Avaliando as alterações bioquímicas que ocorrem nas sementes de milho híbrido após o envelhecimento artificial, Kavitha *et al.* (2017) relataram diminuição no conteúdo de carboidratos. Esses autores também verificaram ausência de alterações nos AR em sementes envelhecidas artificialmente à temperatura de 40°C e 100% até o período de quatro dias (96 h) (KAVITHA *et al.*, 2017). No entanto, após tal período ocorreram aumentos mais relevantes nos teores de açúcares redutores das sementes (KAVITHA *et al.*, 2017).

Ao comparar os resultados das determinações de açúcares (Figura 17) com os obtidos ao longo do armazenamento das sementes de milho-doce (Figura 14), observa-se, de modo geral, comportamento semelhante, destacando apenas a redução um pouco mais acentuada do conteúdo de AR durante o armazenamento em ambas as condições para as sementes da cv. Superdoce, quando comparado como o envelhecimento artificial.

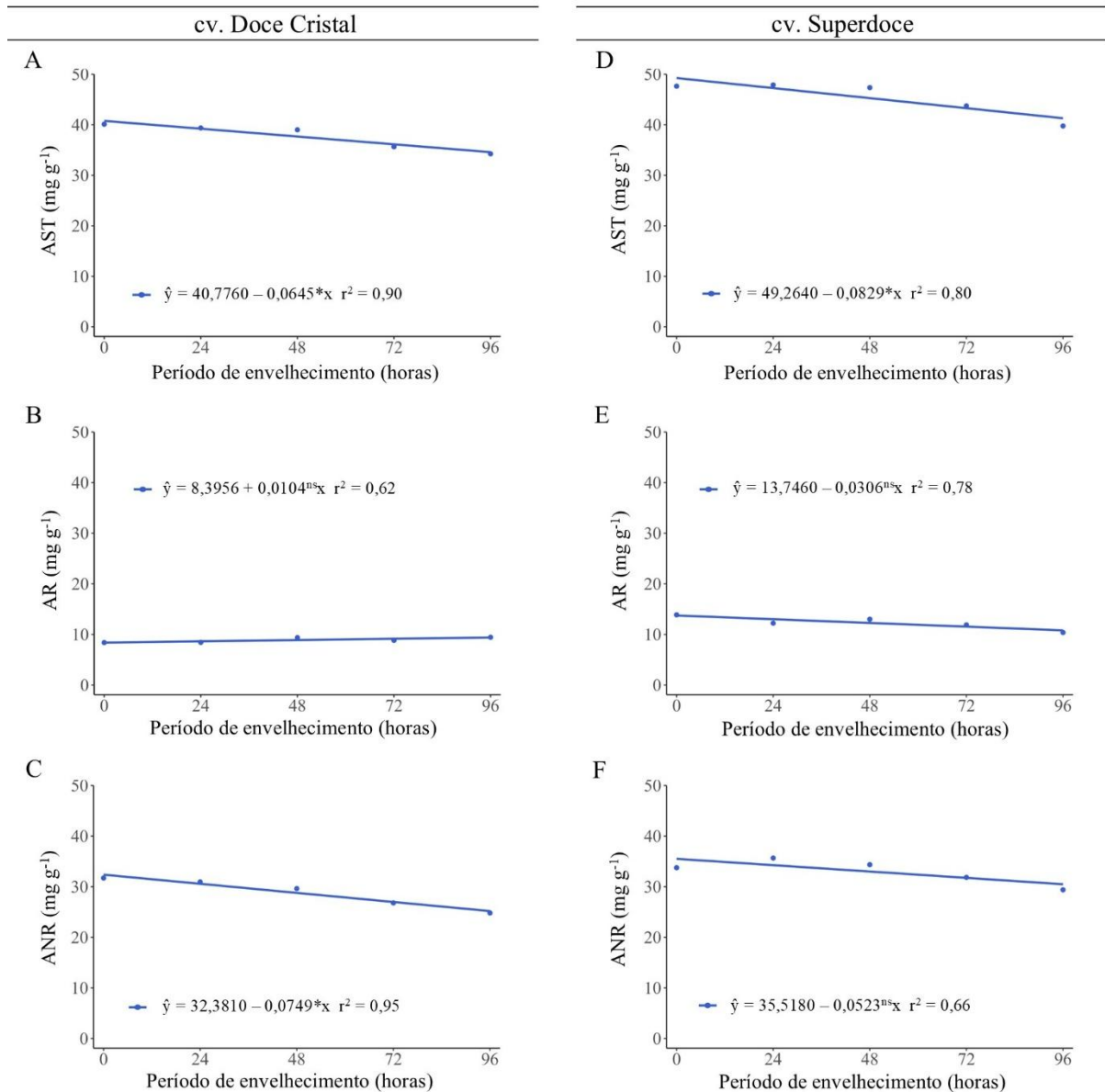


Figura 17. Açúcares solúveis totais (A e D), redutores (B e E) e não redutores (C e F) em sementes de duas cultivares de milho-doce submetidas a diferentes períodos de envelhecimento artificial. *, ns = significativo e não significativo pelo teste t a 5% de probabilidade.

4.3. Predição da armazenabilidade e associação linear entre as análises e os períodos de envelhecimento natural e artificial

O dendrograma da análise de agrupamento hierárquico (HCA) mostra a formação de dois grupos distintos (Figura 18), indicando que ocorreu dissimilaridade entre os tratamentos. Pode-se afirmar que o dendrograma apresentou capacidade de reproduzir as informações da matriz de dissimilaridade, uma vez que o coeficiente de correlação cofenética foi de 0,8217, valor esse superior a 0,70 que é preconizado como limite mínimo de aceitação para avaliação da consistência dos agrupamentos (ROHLF, 1970). Observa-se que o grupo 1 e 2 constituiu-se

dos tratamentos que apresentaram melhor e pior desempenho quanto à germinação das sementes, respectivamente.

Dentro do grupo 1, verifica-se a formação de dois subgrupos (Figura 18). No subgrupo 1A, é possível verificar menores distâncias, e conseqüentemente, maior similaridade entre sementes não envelhecidas (inicial) e os períodos de 3, 6 e 9 meses de armazenamento em câmara fria (CF). Sendo assim, esses resultados confirmam que não houve perda na germinação até os 9 meses de armazenamento em ambiente de CF. Já ao analisar o subgrupo 1B nota-se maior similaridade entre o envelhecimento artificial (EA) por 48 horas e a germinação das sementes aos 9 meses de armazenamento em ambiente não controlado (AMB).

Além disso, houve similaridade entre as sementes submetidas ao EA por 96 horas e as mantidas em AMB por 12 meses (grupo 2), em relação à germinação. Porém, destaca-se que a similaridade foi maior (menor distância observada) entre o EA por 48 horas e o armazenamento por 9 meses em AMB. Desta forma, pode-se constatar que o envelhecimento artificial sob temperatura de 41°C e 100% de UR, por 48 horas é mais eficiente para prever a armazenabilidade das sementes de milho-doce durante o armazenamento em condições de ambiente. Freitas *et al.* (2006) relataram que a germinação de sementes de algodão aos 10 meses de armazenamento foi similar à das envelhecidas artificialmente por 96 h. Para Silva *et al.* (2024b), o envelhecimento artificial por 96 h apresenta potencial para ser utilizado na predição da tolerância de sementes de soja quanto à deterioração durante o armazenamento.

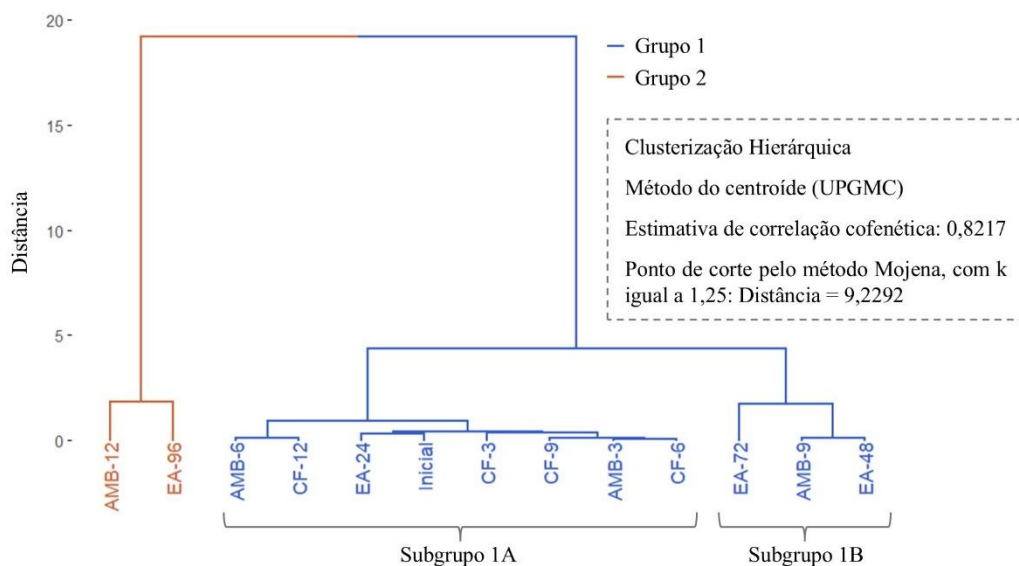


Figura 18. Dendrograma da análise de agrupamento hierárquico (HCA) realizada a partir das distâncias generalizadas de Mahalanobis entre as porcentagens de germinação obtidas durante diferentes períodos de armazenamento em câmara fria (CF) e ambiente não controlado (AMB), e após o envelhecimento artificial (EA) de sementes de milho-doce.

A análise de componentes principais (PCA) é uma técnica multivariada que pode ser eficiente na interpretação de dados relacionados à qualidade das sementes, principalmente quando se dispõe de grande número de tratamentos submetidos a avaliação por vários testes ou determinações (RIBEIRO *et al.*, 2021). Assim, essa foi realizada na presente pesquisa com a finalidade de identificar associação linear entre as variáveis estudadas e os diferentes períodos de envelhecimento natural (armazenamento) e artificial. Ressalta-se que os dois componentes principais (PC1 e PC2) explicaram 80,4% da variabilidade dos dados (Figura 19). Esse valor está dentro do intervalo considerado eficiente para explicar a variabilidade total dos dados observados (JOLLIFFE; CADMA, 2016).

Pelo diagrama de ordenação pode-se constatar, para ambas cultivares, que as sementes armazenadas em CF por 3 e 6 meses, bem como às envelhecidas por 24 horas, permaneceram no mesmo quadrante e apresentaram escores próximos aos das recém-colhidas, indicando que nesses tratamentos não houve perda da qualidade das sementes (Figura 19A). Além disso, fica evidente a aproximação dos dados de armazenamento em ambiente não controlado por 9 e 12 meses com os do envelhecimento artificial por 72 e 96 h, respectivamente. Esses resultados sugerem semelhanças entre os efeitos provocados por esses dois envelhecimentos (natural e artificial) em relação à deterioração e perda da qualidade das sementes.

Quando se analisa o círculo de correlação (Figura 19B), observa-se que os vetores das variáveis de condutividade elétrica (CE) e malonaldeído (MDA), se localizaram no mesmo quadrante (PC1-/PC2+) e próximos dos tratamentos de pior desempenho no envelhecimento artificial (96 h) e armazenamento (12 meses), para cv. Superdoce. Esses resultados indicam associação linear entre esses tratamentos e essas variáveis. Sendo assim, pode-se dizer que sementes mais deterioradas apresentaram maiores valores absolutos de CE e de MDA, o que também pode ser confirmado pelos dados mostrados nas Figuras 6, 10, 13 e 16. Porém, destaca-se que a variável MDA, apresentou menor contribuição na variabilidade total dos dados, assim como as variáveis atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) e teores de açúcares redutores (AR), confirmando que tais determinações bioquímicas não permitiram uma identificação confiável nível de deterioração.

Com relação aos vetores dos testes tradicionais para avaliação do vigor das sementes, observou-se que esses se localizam entre os tratamentos constituídos por sementes recém-colhidas das cultivares Doce Cristal (DC-inicial) e Superdoce (SD-inicial). Desta forma, foi possível verificar associação linear positiva entre os resultados desses testes e dos tratamentos de melhor desempenho. No entanto, com a exposição das sementes a maiores períodos de armazenamento e envelhecimento artificial houve maior perda de qualidade fisiológica das

sementes, o que pode ser notado pelo maior distanciamento entre os vetores dos testes de vigor e os tratamentos EA-96 h e AMB-12. O mesmo comportamento foi observado, principalmente, para os vetores das variáveis atividade das enzimas peroxidases (APX e POX), confirmando a eficiência dessas na detecção da deterioração e na avaliação da qualidade das sementes. Por sua vez, as variáveis densidade relativa e integrada se mantiveram mais afastadas dos vetores dos testes de vigor, como também do vetor referente ao teste de germinação. Estes resultados reforçam os observados anteriormente por meio dos testes de média, no qual as alterações na qualidade fisiológica das sementes não apresentaram relações evidentes com a densidade tecidual das sementes.

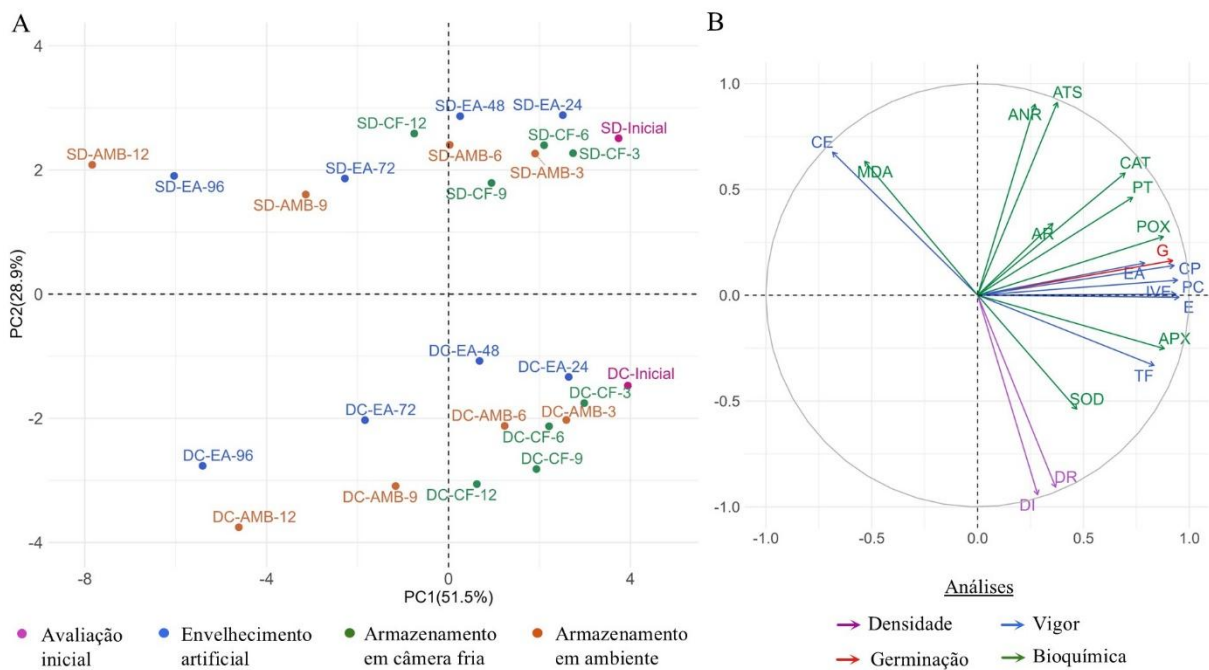


Figura 19. Análise de componentes principais (PCA) obtida pela combinação linear das variáveis relacionadas a densidade tecidual, qualidade fisiológica e caracterização bioquímica de sementes de duas cultivares de milho-doce, submetidas a diferentes períodos envelhecimento artificial e durante o armazenamento por 12 meses. Diagrama de ordenação (A) e círculo de correlação (B). DC: Doce Cristal; SD: Superdoce; CF: câmara fria; AMB: ambiente não controlado.

4.4. Classificação da qualidade de sementes de milho-doce por meio de FT-NIR

As sementes de milho-doce, de ambas cultivares, apresentaram teores de água semelhantes em todos os tratamentos. Para esse parâmetro, foram encontrados valores iniciais de 11,6% e 11,2%, para os lotes de sementes das cultivares Doce Cristal e Superdoce, respectivamente. Considerando os dois lotes, durante o envelhecimento natural, os valores

variaram de 10,7 % e 11,1% nas sementes de milho-doce armazenadas em câmara fria (CF) e de 11,0% a 12,4% nas que permaneceram em ambiente não controlado (AMB). Já as sementes submetidas ao envelhecimento artificial seguido da secagem natural, apresentaram valores entre 11,3% e 11,8%. Desta forma, a variação máxima no teor de água das sementes, entre os tratamentos, foi de 1,7 pontos percentuais (p.p.). Tal variação está dentro dos limites toleráveis de 2 p.p. sugeridos por Marcos-Filho (2015), permitindo a padronização das avaliações e obtenção de resultados confiáveis.

Pelos testes realizados para avaliação da qualidade das sementes, percebe-se que houve a diferenciação dessas em níveis de germinação e vigor (Figura 20). Para cv. Doce Cristal, nota-se que pelo teste de germinação foi possível classificar as sementes em três níveis de qualidade (Figura 20A). Com base neste teste, a qualidade das sementes envelhecidas artificialmente por 72 horas e armazenadas em ambiente não controlado (AMB) por 12 meses não diferiram entre si, todavia, essas apresentaram desempenho superior às submetidas ao envelhecimento por 96 horas e inferior às dos outros tratamentos. Resultado semelhante foi verificado na primeira contagem de germinação (PCG), exceto para os tratamentos constituídos por sementes envelhecidas artificialmente por 48 horas e armazenadas em AMB por 9 meses, que foram classificadas como de vigor intermediário (Figura 20B). Por outro lado, na classificação conforme o índice de velocidade de germinação (IVG) observa-se a estratificação dos tratamentos em quatro níveis de vigor, sendo possível identificar de forma mais nítida os efeitos dos diferentes períodos de envelhecimento artificial e do ambiente de armazenamento na qualidade das sementes (Figura 20C).

A PCG e o IVG são testes fisiológicos comumente realizados para avaliação do vigor das sementes. Ambos os testes estão relacionados ao desempenho de plântulas e analisam a velocidade de germinação das sementes (KRZYŻANOWSKI *et al.*, 2020). Desta forma, esses testes consideram o fato que sementes vigorosas apresentam maior velocidade de germinação, o que resulta em uma redução no tempo entre a semeadura e a emergência de plântulas e, consequentemente, em um estande uniforme e bem estabelecido. Porém, embora a finalidade dos testes seja a mesma, os procedimentos empregados para obtenção dos resultados diferem. Assim, a PCG permite a obtenção da porcentagem de plântulas normais somente em data estabelecida pelas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009). Já para o IVG são realizadas contagens diárias, possibilitando estimar o número médio de plântulas obtidas por dia (NAKAGAWA *et al.*, 1999).

Em relação aos resultados da cv. Superdoce, verifica-se que não houve diferença estatística entre sementes armazenadas em AMB por 12 meses e envelhecidas por 72 e 96 horas,

quanto à germinação, mas essas apresentaram um menor desempenho quando comparadas às demais (Figura 20D). Portanto, o teste de germinação permitiu a obtenção de duas classes de qualidade. Em contrapartida, a PCG e o IVG possibilitaram a formação de três e quatro classes de vigor, respectivamente (Figuras 20E e 20F). Assim, para a cv. Superdoce, pode-se afirmar que os testes de vigor, sobretudo o IVG, evidenciaram maiores diferenças na qualidade das sementes. Vale ressaltar, que a utilização de mais de um teste para avaliação do vigor é relevante e necessária, pois pode haver variação no comportamento das sementes em função do método empregado, principalmente nas que possuem qualidade mediana (MARCOS-FILHO, 2015).

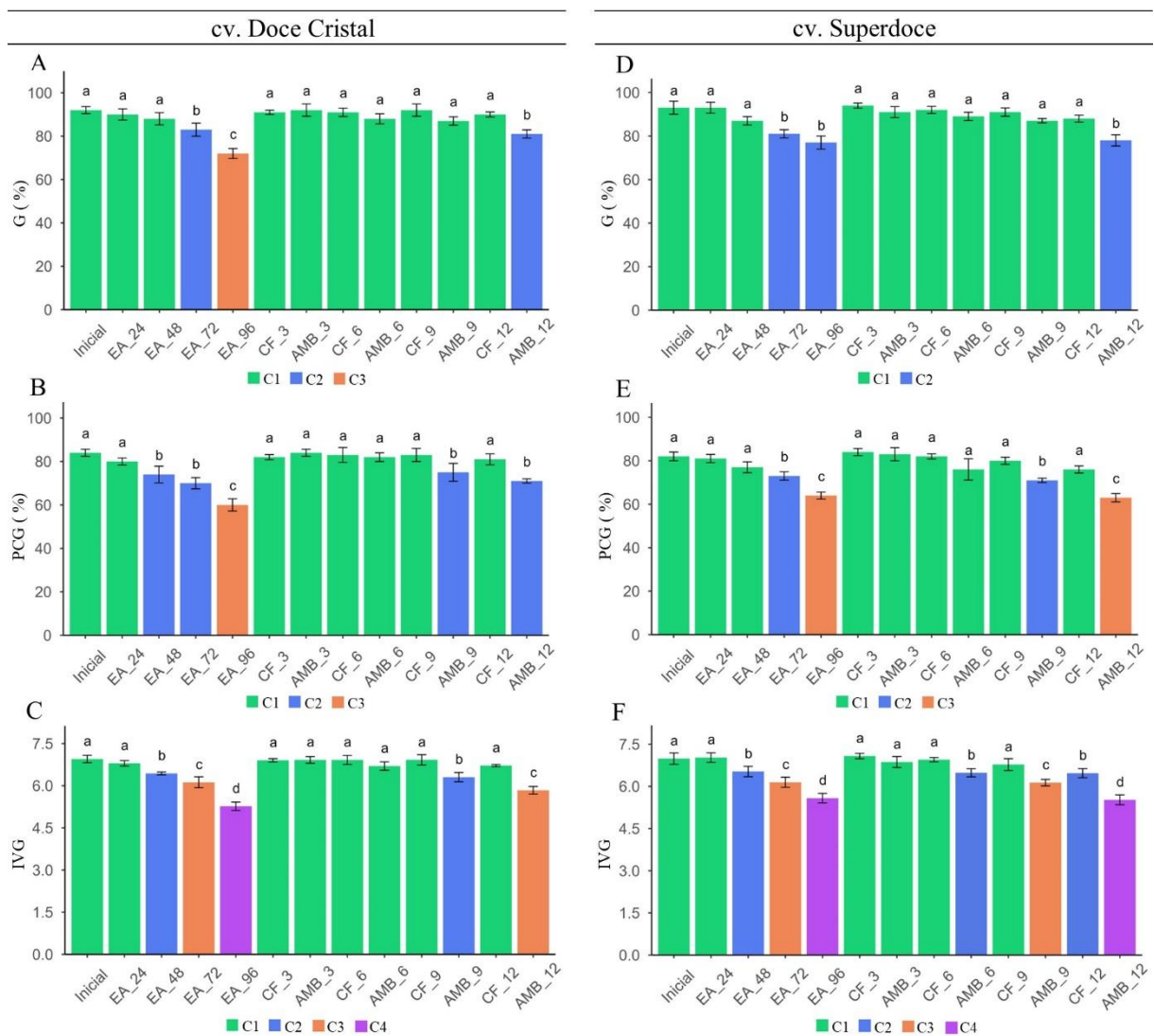


Figura 20. Definição das classes (C1 a C4) de germinação e vigor, conforme os níveis de qualidade das sementes obtidos pelo teste de germinação (A e D), primeira contagem de germinação (B e E) e índice de velocidade de germinação (C e F), para duas cultivares de milho-doce. EA: envelhecimento artificial; CF: câmara fria; AMB: ambiente não controlado. Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Barras: erro padrão.

Destaca-se que as classes de germinação e vigor apresentaram os mesmos intervalos de valores, entre as duas cultivares. As sementes pertencentes as classes C1, C2 e C3, apresentaram valores de germinação superiores a 85%, entre 75-85% e inferior a 75%, respectivamente (Figuras 20A e 20D). Para as classes de vigor, obtidas conforme resultado da PCG, foram encontrados os seguintes intervalos de valores por classe: C1 – porcentagem de plântulas normais superiores a 75%; C2 – porcentagem de plântulas normais de 65 a 75%; C3 – porcentagem de plântulas normais inferior a 65% (Figuras 20B e 20E). Já conforme o resultado do IVG, os intervalos apresentados foram: C1 – valores do índice superiores a 6,5; C2 – valores do índice de 6,3 a 6,5; C3 – valores do índice de 5,6 a 6,2; C4 – valores do índice inferiores a 5,6 (Figuras 20C e 20F).

Ainda na Figura 20, observa-se que nas sementes armazenadas em câmara fria (CF), pelos diferentes períodos de envelhecimento natural, não houve redução da germinação, uma vez que essas permaneceram na mesma classe (C1) que às recém-colhidas (inicial), tanto para cultivar Doce Cristal como para Superdoce. A preservação da germinação das sementes armazenadas em CF pode ser explicada pela condição de baixa temperatura (10 °C) e umidade relativa (56%) em que essas foram expostas. Sabe-se que para sementes ortodoxas, a redução desses dois fatores, em níveis adequados, tende a contribuir para manutenção de menores taxas respiratórias e atividade metabólica das sementes durante o armazenamento, retardando a deterioração (EBONE; CAVERZAN; CHAVARRIA, 2019).

No envelhecimento artificial as sementes são submetidas à altas temperaturas e umidade relativa o que ocasiona em um rápido aumento na atividade metabólica das sementes e, conseqüentemente, acelera o processo de deterioração, que é mais intensificado com o tempo de exposição das sementes a essas condições (MARCOS-FILHO, 2020a; BEWLEY *et al.*, 2013). Fato esse que explica a deterioração mais drástica nas sementes envelhecidas artificialmente pelo maior período estudado (96 horas), classificando essas no nível mais baixo de qualidade, para ambas cultivares.

De modo geral, pode-se constatar que a principal diferença observada entre as duas cultivares, em relação à classificação das sementes, foi atribuída ao tratamento constituído por sementes armazenadas em ambiente não controlado por 12 meses. Assim, para cv. Doce Cristal, as sementes desse tratamento permaneceram nas classes intermediárias de qualidade fisiológica. Por sua vez, para cv. Superdoce, as sementes armazenadas em ambiente não controlado por 12 meses apresentaram uma maior deterioração, resultando na classificação dessas no nível inferior de germinação e vigor. Levando-se em consideração que os valores de desempenho entre as duas cultivares foram semelhantes na germinação, PCG e IVG, para

sementes recém-colhidas (inicial), pode-se relatar que as sementes da cv. Superdoce apresentaram uma queda de vigor mais intensa que as da cv. Doce Cristal durante o armazenamento em AMB. Uma explicação para esse resultado pode estar associada ao maior acúmulo de açúcares no endosperma de sementes das cultivares que possuem genes denominados de superdoce, quando comparado as provenientes do grupo doce (PEREIRA FILHO; TEIXEIRA, 2016). Durante o armazenamento, os açúcares redutores, podem reagir com proteínas e inativar enzimas vitais para o metabolismo das sementes (CASTELLIÓN *et al.*, 2010). Em consequência disso, sementes com altos teores de açúcares tendem a serem mais predispostas à rápida deterioração (MARCOS-FILHO, 2015).

A Figura 21 mostra os espectros brutos e sua respectiva média, para cada uma das classes de germinação e vigor definidas com base nos níveis de qualidade obtidos pelos testes de avaliação da qualidade fisiológica das sementes. Ao analisar os espectros médios, é possível identificar diferenças nos picos de absorvância entre as classes, para ambas cultivares. Em geral, os valores de absorvância mais elevados foram obtidos para os tratamentos constituídos por sementes de alta qualidade, em toda faixa espectral (1.000 a 2.500 nm). Nota-se uma nítida separação entre as classes de germinação e vigor, definidas conforme o teste de germinação e a PCG, respectivamente, sendo possível observar que sementes de qualidade inferior apresentaram valores de absorvâncias mais baixos que as intermediárias. No entanto, para as classes intermediárias de vigor (C2 e C3) atribuídas conforme os resultados do IVG, houve praticamente uma sobreposição dos espectros médios, dificultando a distinção dos valores de absorvância entre essas.

O número de acertos individuais por classe de qualidade, obtidos por meio da matriz de confusão, e as métricas de desempenho do modelo de classificação, via PLS-DA, para o banco de dados dos espectros originais, transformados pela primeira e segunda derivada de Savitzky-Golay (SG) são apresentados nas Tabelas 7, 8 e 9, respectivamente. Assim, comparando esses resultados, pode-se afirmar que os modelos construídos com dados dos espectros originais apresentaram menores previsões corretas e valores nas métricas de validação, indicando que ambos os pré-processamentos realizados, possibilitaram a obtenção de modelos mais satisfatórios para classificação da qualidade das sementes. Esse fato foi constatado para a cv. Doce Cristal e Superdoce. O melhor desempenho dos modelos usando dados tratados pode ser atribuído a supressão, pelo pré-processamento, de variações indesejadas intrínsecas do instrumento e das amostras.

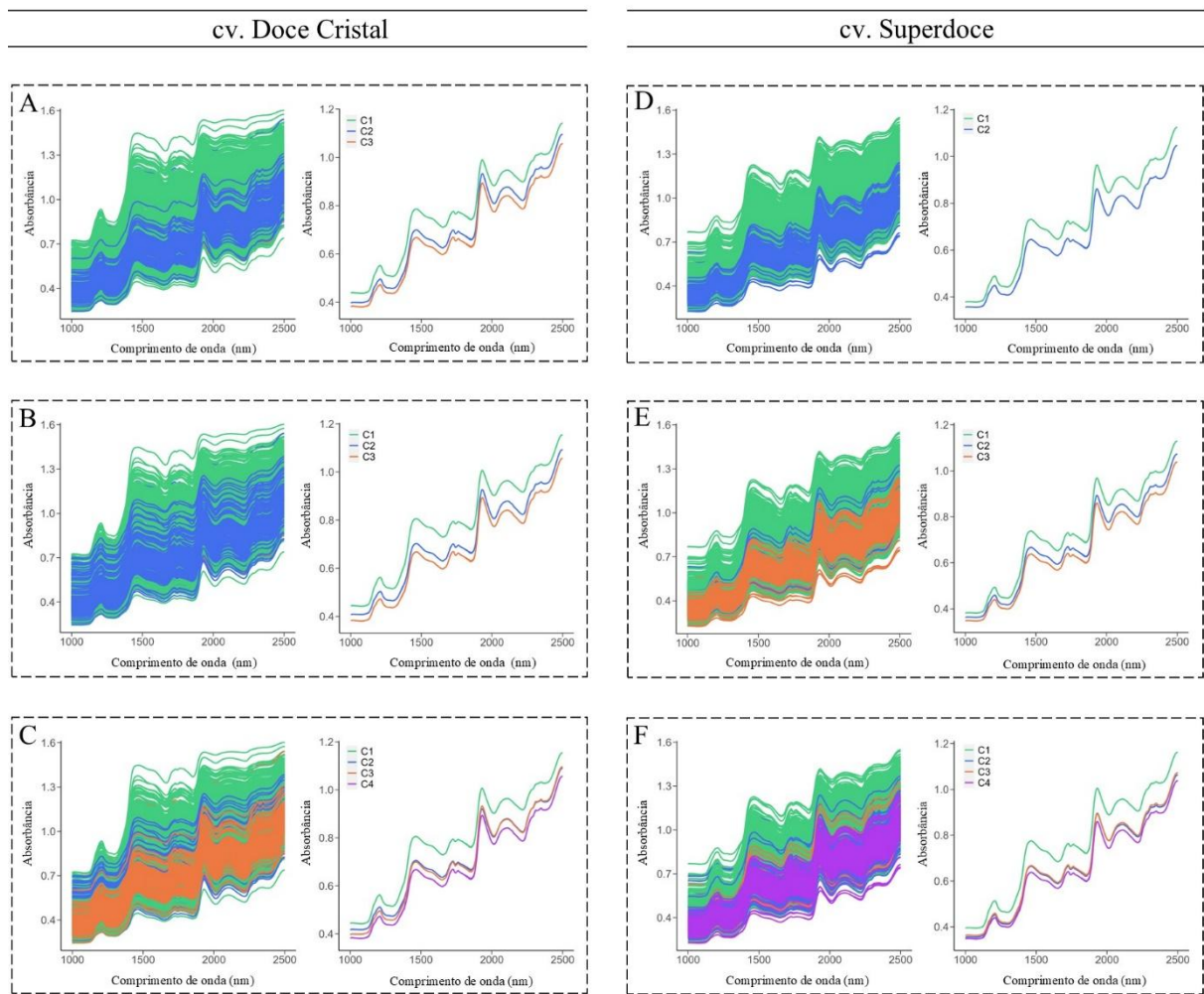


Figura 21. Espectros (bruto e média) FT-NIR de sementes de duas cultivares de milho-doce em suas respectivas classes atribuídas conforme os níveis de qualidade obtidos pelo teste de germinação (A e D), primeira contagem de germinação (B e E) e índice de velocidade de germinação (C e F).

Os métodos derivativos de Savitzky-Golay reduzem as variações indesejáveis por meio da eliminação de desvios de linha-base. Segundo Sena e Almeida (2018), a primeira derivada elimina desvios de linha-base aditivos (lineares). Já a segunda derivada, além dos efeitos aditivos, elimina também os multiplicativos (desvios não-lineares). Nesses métodos de pré-processamentos realiza-se uma suavização dos dados, aumentando a relação sinal-ruído dos espectros, conjuntamente com o uso de derivadas. Desta forma, ocorre um ajuste de um polinômio a cada parte/janela de dados, sendo calculada as derivadas desse, o que diminui o número de variáveis e destaca as regiões de interesse (SENA; ALMEIDA, 2018; ENGEL *et al.*, 2013). Salienta-se que, na presente pesquisa, o ajuste do tamanho da janela e a escolha do polinômio foi realizada com base em análises preliminares. Assim, foi adotada uma janela de tamanho 5 e utilizado o polinômio de terceiro grau para os dois pré-processamentos.

Tabela 7. Número de acertos individuais por classe de qualidade fisiológica das sementes e métricas do modelo de classificação PLS-DA, usando dados dos espectros originais (sem pré-tratamento).

Classes	Em relação à germinação		Em relação ao vigor			
	Teste de germinação (G)		Primeira contagem de germinação (PCG)		Índice de velocidade de germinação (IVG)	
	Calibração (n = 910)	Validação (n = 390)	Calibração (n = 910)	Validação (n = 390)	Calibração (n = 910)	Validação (n = 390)
cv. Doce Cristal						
C1	694 (700)	293 (300)	517 (560)	220 (240)	546 (560)	235 (240)
C2	3 (140)	2 (60)	142 (280)	55 (120)	54 (140)	26 (60)
C3	15 (70)	7 (30)	21 (70)	10 (30)	1 (140)	0 (60)
C4	-	-	-	-	24 (70)	7 (30)
Acurácia	0,7824	0,7743	0,7472	0,7308	0,6868	0,6872
Kappa	0,1280	0,1280	0,4554	0,4211	0,2955	0,2885
Sensibilidade	0,4090	0,4144	0,5768	0,5694	0,4277	0,4114
Especificidade	0,6940	0,6935	0,8042	0,7949	0,8099	0,8077
cv. Superdoce						
C1	677 (700)	294 (300)	617 (630)	261 (270)	373 (420)	158 (180)
C2	131 (210)	47 (90)	26 (140)	6 (60)	32 (210)	15 (90)
C3	-	-	29 (140)	13 (60)	28 (140)	9 (60)
C4	-	-	-	-	66 (140)	27 (60)
Acurácia	0,8879	0,8743	0,7385	0,7179	0,5483	0,5359
Kappa	0,6518	0,5866	0,2813	0,2077	0,2792	0,2594
Sensibilidade	0,9671	0,9800	0,4574	0,4278	0,4280	0,4111
Especificidade	0,6238	0,5222	0,7470	0,7227	0,8177	0,8135

Para os modelos construídos com dados pré-processados pela primeira derivada de Savitz-Golay e baseados na classificação de germinação, foi possível observar valores de acurácia, Kappa, sensibilidade e especificidade superiores a 0,94, para cv. Doce Cristal, e 0,95, para Superdoce (Tabela 8), tanto na calibração como validação. Porém, para esse mesmo pré-processamento, em relação à classificação quanto ao vigor, observa-se valores ligeiramente menores de acurácia, kappa e sensibilidade (entre 0,76 e 0,91) na validação, quando as classes foram definidas conforme o IVG, para ambas cultivares. Contudo, tal fato, não ocorreu para os modelos construídos com dados transformados pela segunda derivada de Savitz-Golay, sendo verificado para as cultivares de milho-doce, altos valores de métricas de desempenho (> 0,93) em todas as classificações realizadas conforme os níveis de qualidade obtidos pelo teste de germinação, PCG e IVG (Tabela 9). De maneira semelhante, Souza *et al.* (2023) observaram que o pré-processamento com a segunda derivada de Savitz-Golay permitiu a obtenção de maiores valores de acurácia e kappa, em modelos de previsão para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de *Urochloa decumbens*.

Tabela 8. Número de acertos individuais por classe de qualidade fisiológica das sementes e métricas do modelo de classificação PLS-DA, usando dados de espectros transformados pela primeira derivada de Savitzky-Golay.

Classes	Em relação à germinação		Em relação ao vigor			
	Teste de germinação (G)		Primeira contagem de germinação (PCG)		Índice de velocidade de germinação (IVG)	
	Calibração (n = 910)	Validação (n = 390)	Calibração (n = 910)	Validação (n = 390)	Calibração (n = 910)	Validação (n = 390)
cv. Doce Cristal						
C1	700 (700)	299 (300)	554 (560)	227 (240)	550 (560)	231 (240)
C2	139 (140)	58 (60)	278 (280)	117 (120)	136 (140)	57 (60)
C3	68 (70)	26 (30)	66 (70)	24 (30)	140 (140)	59 (60)
C4	-	-	-	-	35 (70)	7 (30)
Acurácia	0,9967	0,9821	0,9868	0,9436	0,9462	0,9077
Kappa	0,9912	0,9517	0,9746	0,8917	0,9031	0,8320
Sensibilidade	0,9881	0,9433	0,9750	0,9069	0,8634	0,7823
Especificidade	0,9952	0,9795	0,9915	0,9649	0,9728	0,9536
cv. Superdoce						
C1	700 (700)	298 (300)	630 (630)	268 (270)	419 (420)	179 (180)
C2	210 (210)	86 (90)	139 (140)	56 (60)	154 (210)	65 (90)
C3	-	-	140 (140)	59 (60)	140 (140)	55 (60)
C4	-	-	-	-	60 (140)	28 (60)
Acurácia	1,0000	0,9846	0,9989	0,9821	0,8495	0,8385
Kappa	1,0000	0,9563	0,9977	0,9617	0,7783	0,7615
Sensibilidade	1,0000	0,9933	0,9976	0,9698	0,7899	0,7750
Especificidade	1,0000	0,9555	0,9988	0,9841	0,9497	0,9452

As métricas de desempenho do modelo são calculadas a partir dos resultados obtidos na matriz de confusão que mostra as previsões para cada classe definida. Geralmente, na linha dessa matriz são apresentadas as instâncias da classe real e nas colunas as da classe prevista, sendo os acertos por classe, realizados pelo modelo, atribuídos a diagonal principal. Portanto, a matriz de confusão reúne informações sobre os verdadeiros positivos (instância é positiva, sendo classificada corretamente como positiva), verdadeiros negativos (instância é negativa, sendo classificada corretamente como negativa), falsos positivos (instância é negativa, sendo classificada incorretamente como positiva) e falsos negativos (instância é positiva, sendo classificada incorretamente como negativa) (SILVA; PERES; BOSCAROLI, 2016).

Dentre as métricas de avaliação do modelo, a acurácia é amplamente usada para classificações de aprendizado de máquina, sendo definida pela razão entre o número de previsões realizadas corretamente pelo modelo e o número total de previsões (THARWAT, 2021). Entretanto, essa métrica não leva em consideração os erros de previsões em cada uma das classes e, conseqüentemente, pode ser muito influenciada pela proporção de dados em cada

classe (SOUZA *et al.*, 2023). Desse modo, para dados desbalanceados o coeficiente kappa de Cohen, tende a ser uma métrica mais interessante pois, diferentemente da acurácia, considera todas as discrepâncias além da diagonal principal da matriz de confusão.

O coeficiente kappa fornece uma medida de concordância ajustada pela chance de acordo aleatório (confiabilidade) interobservadores, para variáveis categóricas nominais (COHEN, 1960). Nesse sentido, o kappa leva em consideração a frequência com que um observador real e o modelo de classificação concordam (verdadeiros positivos e negativos) e discordam (falsos positivos e negativos), retirando o efeito da atribuição a uma classe específica ter sido aleatória. Neste estudo, para a cultivar Doce Cristal os modelos de classificação PLS-DA construídos a partir de dados transformados pela segunda derivada de SG, apresentaram valores de kappa superiores a 0,99 na calibração e a 0,93 na validação, em relação à germinação e ao vigor (Tabela 9). Para cultivar Superdoce, verifica-se valores ainda maiores de kappa (entre 0,98 e 0,97) na validação dos modelos desenvolvidos para predição do vigor em comparação com o para germinação (0,94). De acordo com as categorias de níveis de concordância estabelecidos por Landis e Koch (1977), pode-se relatar que houve uma concordância quase perfeita entre as predições do modelo e os níveis, de germinação e vigor, definidos por meio dos testes já rotineiramente utilizados para avaliação da qualidade das sementes. A equivalência entre os resultados de uma nova técnica com testes já estabelecidos é fundamental para confirmação da eficiência dessa para a finalidade desejada.

A sensibilidade é o número de amostras previstas como pertencentes a uma dada classe dividido pelo número de amostras que pertencem a essa mesma classe (THARWAT, 2021). Assim, essa métrica indica a proporção de acertos dentre os positivos reais (HOSSIN; SULAIMAN, 2015). Já a especificidade é a razão entre o número de amostras previstas que não estão em uma dada classe e o número real que não está nessa mesma classe (THARWAT, 2021), possibilitando uma avaliação de quão preciso o modelo é contra falsos positivos (SAITO; REHMSMEIER, 2015). No geral, as previsões dos modelos obtidos com dados pré-processados pela segunda derivada de SG atingiram altos valores de sensibilidade ($> 0,95$) e de especificidade (entre 0,94 e 1,00), para as duas cultivares (Tabela 9), o que confirma o potencial da técnica de espectroscopia FT-NIR para classificar as sementes de milho-doce quanto à germinação e ao vigor.

Tabela 9. Número de acertos individuais por classe de qualidade fisiológica das sementes e métricas do modelo de classificação PLS-DA, usando dados de espectros transformados pela segunda derivada de Savitzky-Golay.

Classes	Em relação à germinação		Em relação ao vigor			
	Teste de germinação (G)		Primeira contagem de germinação (PCG)		Índice de velocidade de germinação (IVG)	
	Calibração (n = 910)	Validação (n = 390)	Calibração (n = 910)	Validação (n = 390)	Calibração (n = 910)	Validação (n = 390)
cv. Doce Cristal						
C1	700 (700)	297 (300)	560 (560)	232 (240)	559 (560)	237 (240)
C2	139 (140)	58 (60)	280 (280)	116 (120)	138 (140)	57 (60)
C3	69 (70)	28 (30)	70 (70)	29 (30)	140 (140)	59 (60)
C4	-	-	-	-	70 (70)	27 (30)
Acurácia	0,9978	0,9821	1,0000	0,9667	0,9967	0,9744
Kappa	0,9942	0,9524	1,0000	0,9362	0,9942	0,9544
Sensibilidade	0,9929	0,9633	1,0000	0,9667	0,9960	0,9552
Especificidade	0,9968	0,9822	1,0000	0,9790	0,9982	0,9861
cv. Superdoce						
C1	700 (700)	297 (300)	630 (630)	267 (270)	419 (420)	177 (180)
C2	210 (210)	85 (90)	140 (140)	60 (60)	210 (210)	88 (90)
C3	-	-	140 (140)	60 (60)	136 (140)	58 (60)
C4	-	-	-	-	140 (140)	60 (60)
Acurácia	1,0000	0,9795	1,0000	0,9923	0,9945	0,9821
Kappa	1,0000	0,9418	1,0000	0,9839	0,9920	0,9739
Sensibilidade	1,0000	0,9900	1,0000	0,9963	0,9923	0,9819
Especificidade	1,0000	0,9444	1,0000	0,9970	0,9976	0,9935

Para milho comum, Ambrose *et al.* (2016) estudaram a possibilidade de detecção da viabilidade das sementes utilizando espectroscopia FT-NIR combinada com o método PLS-DA e obtiveram modelos com acurácias próximas a 100% na calibração e superior a 95% na validação. Da mesma forma, Qiu *et al.* (2018) conseguiram detectar sementes viáveis e inviáveis, de milho superdoce, danificadas por superaquecimento e envelhecimento artificial, com taxas de classificação correta superiores a 98%. Silva *et al.* (2024a) relataram que os modelos construídos para avaliação do vigor de sementes de soja envelhecidas artificialmente e naturalmente, por meio da técnica FT-NIR, apresentaram valores de acurácia, sensibilidade e especificidade próximos a 1. Em contraste, Medeiros *et al.* (2020b), evidenciam que não foi possível estimar com segurança o vigor de sementes de *Urochloa brizantha*, utilizando essa técnica, uma vez que os modelos desenvolvidos apresentaram valores de 0,61, 0,47, 0,77, para acurácia, sensibilidade e especificidade, respectivamente.

Com base nos dados espectrais transformados pela segunda derivada de SG, que permitiram altos números de acertos e valores de métricas de desempenho para todos os

modelos desenvolvidos para classificação da qualidade das sementes, foram construídos gráficos relativos à importância das variáveis para cada classe. Verifica-se que os picos de comprimento de onda variaram entre as classes de qualidade em relação à sua importância (Figuras 22, 23 e 24).

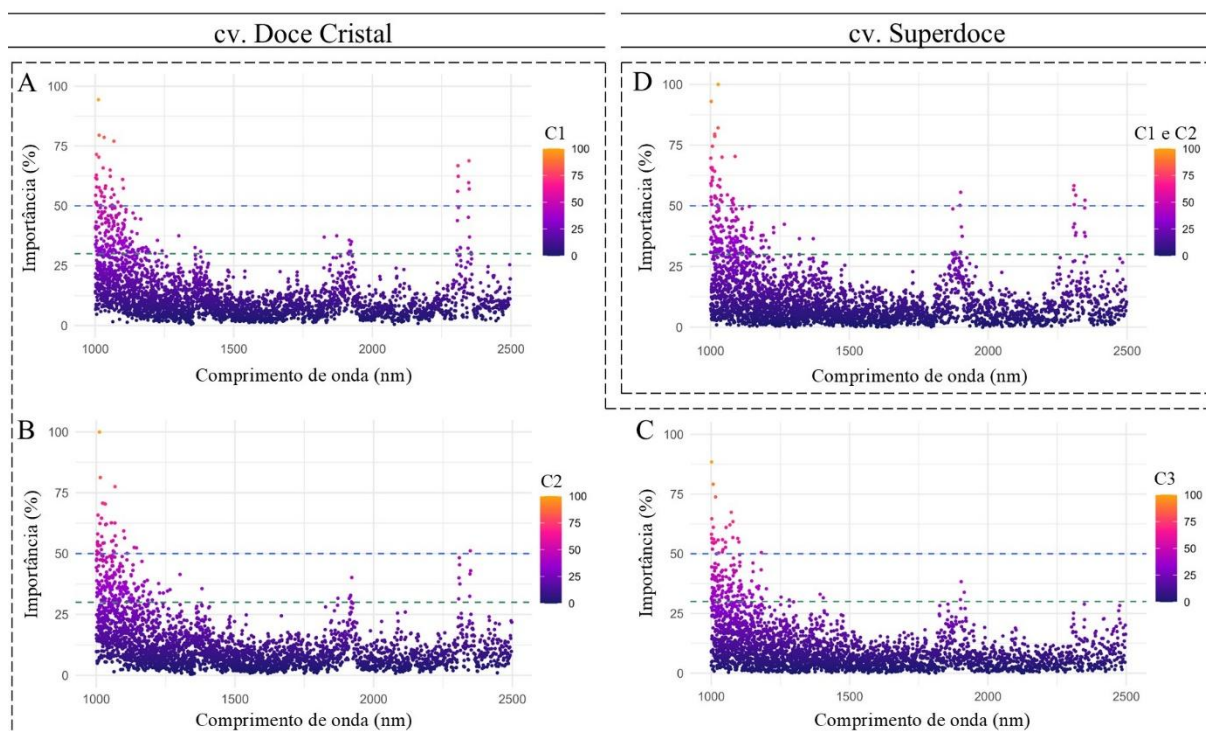


Figura 22. Importância das variáveis de comprimento de onda para classificação, via PLS-DA, da qualidade fisiológica de sementes, das cultivares Doce Cristal (A, B, C) e Superdoce (D), envelhecidas naturalmente e artificialmente. Espectros pré-processados pela segunda derivada de Savitzky-Golay e classificados conforme os níveis de qualidade obtidos pelo teste de germinação.

Para cultivar Doce Cristal pode-se constatar que as regiões espectrais que mais contribuíram para classificação da germinação, por meio da PLS-DA, foram as faixas de comprimento de onda entre 1.000-1.200 nm e 2.275-2.375 nm, para classe de alta germinação (C1), apresentando importâncias superiores a 50% (Figura 22A). No entanto, para essa mesma classe, também foram observados picos nos comprimentos de ondas entre 1.200 nm-1.300 nm, 1.350-1.450 nm e 1.800-1.900 nm, com uma importância superior a 30%. Comportamento semelhante em relação à importância das variáveis foi notado para a classe de germinação intermediária (C2) (Figura 22B). Porém, para classe de baixa germinação (C3) a região espectral de 1.000 a 1.200 foi a única que apresentou importância superior a 50% (Figura 22C). Já para a cv. Superdoce, as maiores importâncias para definição do modelo de germinação situaram-se entre as regiões de 1.000-1.200 nm, 1.800-1.900 nm e 2.275-2.375 nm (> 50%), para as classes C1 e C2 (Figura 22D).

Em relação à classificação quanto ao vigor, para ambas cultivares, os comprimentos de onda exibiram picos de importância nas faixas de 1.000-1.200 nm, 1.200 nm-1.300 nm, 1.350-1.450 nm, 1.800-1.900 nm e na região próxima a 2.500 nm (Figuras 23 e 24). Considerando a cv. Doce Cristal, para os modelos construídos conforme a definição de classes obtida pela PCG e IVG foram observadas importância superiores a 50% e 30% (exceto entre 1.000-1.200 nm), respectivamente, para classe de alto vigor (C1) (Figuras 23A e 24A). Para cv. Superdoce, pode-se verificar maiores picos de importância (> 50%), nas regiões de 1.000-1.200 nm e 1.800-1.900 nm, para os modelos desenvolvidos conforme os níveis de vigor obtidos pela PCG e IVG (Figuras 23D e 24E). Além disso, nota-se que a região de 2.275-2.375 nm apresentou importância inferior a 30%, para algumas classes intermediárias e para todas de baixo vigor, tanto para cv. Doce Cristal como para Superdoce. Desse modo, fica evidente a importância que essa região apresentou na distinção entre as classes superiores e inferiores de vigor.

Em síntese, pode-se destacar que as faixas de comprimento de onda entre 1.000-1.200 nm, 1.800-1.900 nm e 2.275-2.375 nm foram as que, coincidentemente, apresentaram maior relevância na classificação das sementes de milho-doce quanto à germinação e ao vigor. Entretanto, para os modelos construídos conforme a definição de classes de vigor, é possível relatar que a região de 1.350-1.450 nm apresentou maior importância relativa, principalmente para cv. Doce Cristal. As regiões de comprimento de onda citadas são associadas a grupos funcionais que podem indicar a presença de compostos químicos no interior das sementes.

Workman e Weyer (2007) relatam que um pico de absorção da radiação em 1.009 nm corresponde ao terceiro harmônico O-H e pode ser um indicativo da presença de sacarídeos. Por sua vez, comprimentos de ondas entre 1.000-1.185 nm foram descritos como relacionados a moléculas proteicas (AL-ALMERY *et al.*, 2018). Regiões em torno de 1.180 nm correspondem ao segundo harmônico C-H, associado aos ácidos graxos (HOURANT *et al.*, 2000). Além disso, picos próximos a 1.200 nm já foram relatados como característicos de carboidratos (WANG *et al.*, 2020). A faixa entre 1.330-1.392 nm, bem como picos no comprimento de onda de 1.414 nm representam bandas associadas a lipídios (MUKASA *et al.*, 2019; HOURANT *et al.*, 2000). Já picos em 1.365 nm, 1.375 nm e 1.400 nm apresentam importância para diferenciar o conteúdo de proteína solúvel em semente (SILVA *et al.*, 2024a).

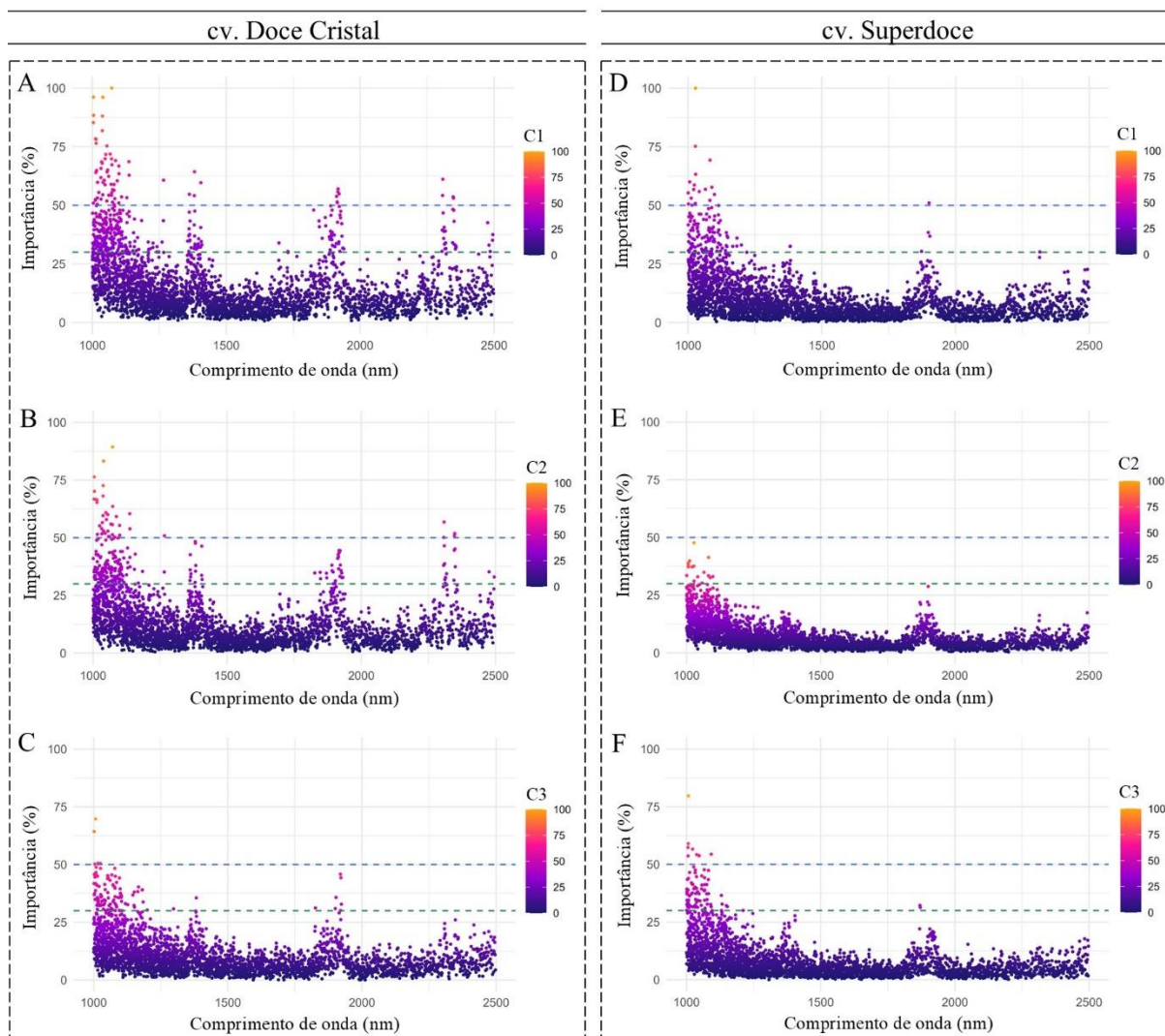


Figura 23. Importância das variáveis de comprimento de onda para classificação, via PLS-DA, da qualidade fisiológica de sementes, das cultivares Doce Cristal (A, B, C) e Superdoce (D, E, F), envelhecidas naturalmente e artificialmente. Espectros pré-processados pela segunda derivada de Savitzky-Golay e classificados conforme os níveis de qualidade obtidos pela primeira contagem de germinação.

Absorção entre 1.820 nm corresponde a uma combinação de vibração e estiramento do O-H e do terceiro harmônico do C-O que está associado com celulose (WORKMAN; WEYER, 2007). Comprimentos de ondas entre 1.880-1.930 nm correspondem ao grupo funcional O-H (HOURANT *et al.*, 2000), e podem representar o conteúdo de carboidrato (SOUZA *et al.*, 2023; AMBROSE *et al.*, 2016). De acordo com Aenugu *et al.* (2011), picos em 2.275 nm também são característicos do alongamento O-H, associados a carboidratos. Picos em 2.310 nm, 2.330 nm e 2.350 nm correspondem a combinação de bandas -CH₃, -CH₂ e -CH, respectivamente, e estão relacionados aos carboidratos (QIU *et al.*, 2018). Na faixa entre 2.270-2.532 nm pode ser identificado grupos peptídicos associados a proteínas (WORKMAN; WEYER, 2007).

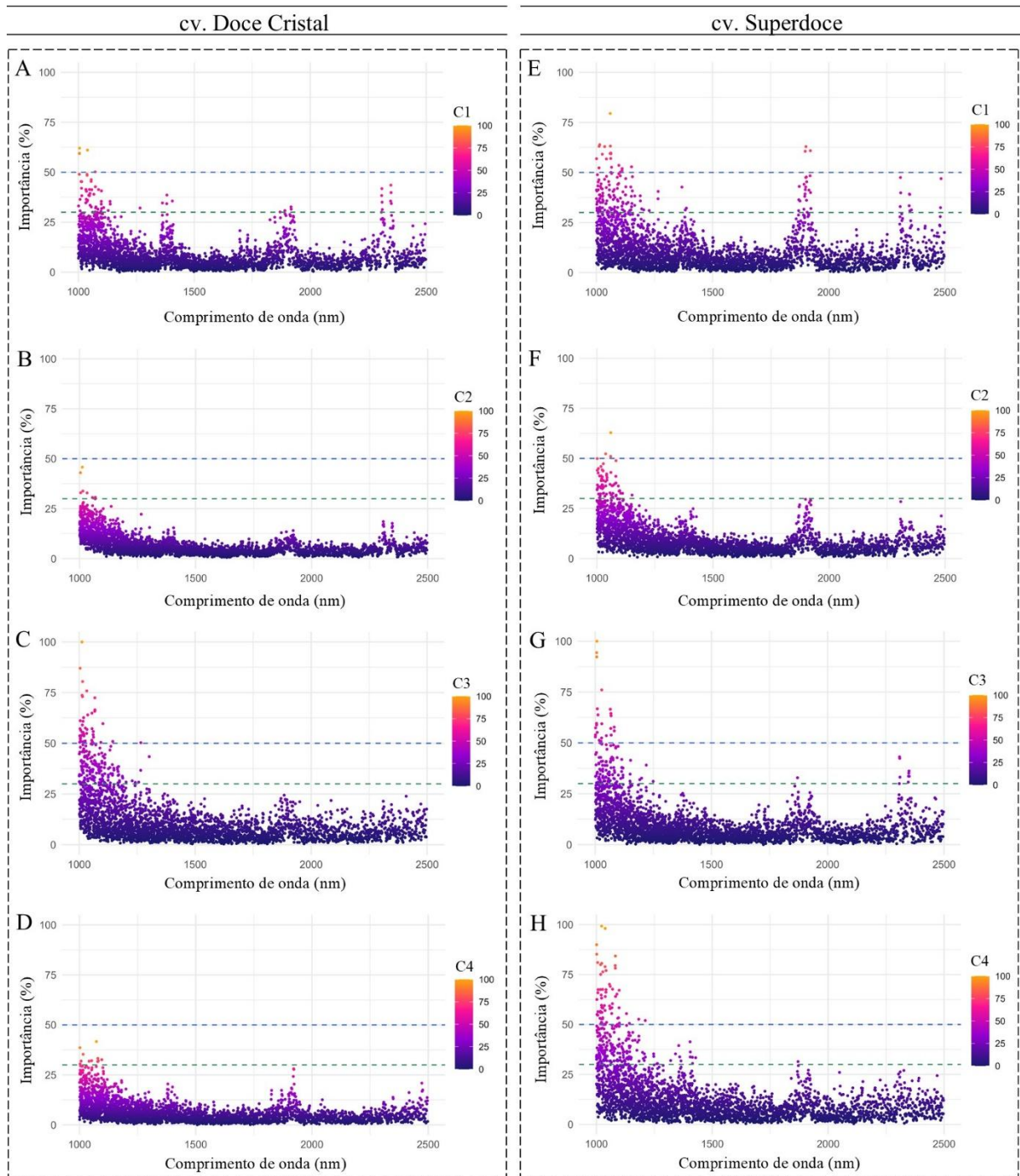


Figura 24. Importância das variáveis de comprimento de onda para classificação, via PLS-DA, da qualidade fisiológica de sementes, das cultivares Doce Cristal (A, B, C e D) e Superdoce (E, F, G e H), envelhecidas naturalmente e artificialmente. Espectros pré-processados pela segunda derivada de Savitzky-Golay e classificados conforme os níveis de qualidade obtidos pelo índice de velocidade de germinação.

Considerando que, neste estudo, uma região importante para detecção de carboidratos e proteínas (2.275-2.375 nm) possibilitou a distinção entre sementes de milho-doce de alto e baixo vigor, pode-se admitir a hipótese que ocorreu alterações nesses compostos, durante a deterioração, que foram detectáveis pela técnica de espectroscopia FT-NIR. Essa hipótese se

torna mais consistente ao levar-se em consideração que carboidratos e proteínas são as frações de reservas mais prevalentes em sementes dessa espécie (QIU *et al.*, 2018). Além de alterações no metabolismo de reservas, no processo de deterioração, ocorrem mudanças relacionadas à taxas de síntese de compostos, sistemas enzimáticos e de membranas, respiração e ácidos nucléicos (MARCOS-FILHO, 2015). Desta forma, vale ressaltar que todas essas manifestações bioquímicas envolvem grupos funcionais que também podem ter sido relevantes na absorção da radiação NIR pelas sementes.

Diante dos resultados apresentados, observa-se que a classificação de sementes de milho-doce em relação à sua qualidade fisiológica é possível, de maneira confiável, por meio da espectroscopia NIR combinada com o algoritmo de aprendizado de máquina PLS-DA, quando se coleta espectros de sementes individuais e realiza-se o pré-processamento dos dados. Ademais, foi possível identificar regiões no espectro eletromagnético do infravermelho próximo mais importantes para classificação quanto à germinação e vigor. Assim, a espectroscopia FT-NIR pode ser uma opção de ferramenta interessante para auxiliar na otimização da tomada de decisão, por empresas de sementes, relacionada à aprovação ou descartes dos lotes, bem como na monitoração da qualidade das sementes durante o armazenamento, de forma rápida, não-destrutiva e menos subjetiva. A espectroscopia no infravermelho próximo também pode ser uma alternativa para avaliação da qualidade de bancos de sementes de conservação *ex situ* de germoplasma. Além disso, a técnica FT-NIR pode apresentar grande aplicabilidade para diversas pesquisas relacionadas à bioquímica de sementes de milho-doce. A importância dessa técnica para essa finalidade se torna ainda mais relevante ao considerar o fato que técnicas convencionais de análises bioquímicas tendem a serem caras, demoradas e geram resíduos.

5. CONCLUSÕES

O envelhecimento natural (armazenamento) e artificial ocasionam decréscimos na germinação, no vigor, nas atividades das enzimas antioxidantes, bem como nos teores de proteínas e açúcares solúveis totais das sementes de milho-doce.

No armazenamento em câmara fria ($10\text{ °C} \pm 2,6$ e $56\% \pm 5,3$ de UR) a germinação das sementes foi mantida por 12 meses, com redução do vigor após nove meses. Sob condição ambiente ($23,5\text{ °C} \pm 1,8$ e $64\% \pm 6,2$ de UR), há preservação da germinação até nove meses e redução do vigor a partir de seis meses de armazenamento. Por outro lado, não ocorrem diferenças expressivas nas alterações físicas das sementes entre ambos os ambientes de armazenamento.

A qualidade fisiológica das sementes de milho-doce nos primeiros nove meses de armazenamento em câmara fria pode ser estimada com base no envelhecimento artificial (41 °C e 100% UR) por 24 h. Já a predição da armazenabilidade em condição ambiente pode ser realizada com base no envelhecimento artificial por 48 horas, sendo a germinação das sementes submetidas a esse tratamento similar à das sementes armazenadas por nove meses.

A atividade das enzimas peroxidases (APX e POX) está associada com o vigor das sementes de milho-doce.

A espectroscopia FT-NIR, combinada com o algoritmo PLS-DA e baseada em coleta de dados espectrais de sementes individuais, apresenta potencial para classificar sementes de milho-doce quanto à germinação e ao vigor, sobretudo quando se realiza o pré-processamento dos dados por meio da segunda derivada de Savitzky-Golay.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AENUGU, H.P.R.; KUMAR, D.S.; SRISUDHARSON, N.P.; GHOSH, S.S.; BANJI, D. Near infrared spectroscopy—An overview. **International Journal of ChemTech Research**, v.3, n.2, p.825-836, 2011.

AL-ALMERY, M.; GENEVE, R.L.; SANCHES, M.F.; ARMSTRONG, P.R.; MAGHIRANG, E.B.; LEE, C.; VIEIRA, R.D.; HILDEBRAND, D.F. Near-infrared spectroscopy used to predict soybean seed germination and vigour. **Seed Science Research**, v.28, p.245-252, 2018.

AMARO, H.T.R.; ARAUJO, E.F.; ARAUJO, R.F.; DIAS, L.A.S.; DAVID, A.M.S.S.; SILVA, F.W.S. Secagem e armazenamento de sementes de culturas oleaginosas. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v.25, n.1/2, p.105-119, 2019.

AMBROSE, A.; LOHUMI, S.; LEE, W.; CHO, B.K. Comparative nondestructive measurement of corn seed viability using Fourier transform near-infrared (FT-NIR) and Raman spectroscopy. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v.224, p.500-506, 2016.

ANDERSON, M. D.; PRASAD, T. K.; STEWART, C. R. Changes in Isozyme Profiles of Catalase, Peroxidase, and Glutathione Reductase during Acclimation to Chilling in Mesocotyls of Maize Seedlings. **Plant physiology**, v.109, n.4, p.1247-1257, 1995.

ANDRADE, G.C.; COELHO, C.M.M.; PADILHA, M.S. Seed reserves reduction rate and reserves mobilization to the seedling explain the vigour of maize seeds. **Journal of Seed Science**, v.41, n.4, p.488-497, 2019.

ARAÚJO, E.F.; ARAÚJO, R.F.; SOAFIATTI, V.; SILVA, R.F. Qualidade fisiológica de sementes de milho-doce colhidas em diferentes épocas. **Bragantia**, Campinas, v.65, p.687-692, 2006a.

ARAÚJO, E.F.; ARAÚJO, R.F.; SOAFIATTI, V.; SILVA, R.F. Maturação de sementes de milho-doce – grupo super doce. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.28, p.69-76, 2006b.

ARAÚJO, E.F.; SILVA, R.F.; CORRÊA, P.C. Efeitos imediatos e latentes da temperatura e da umidade relativa do ar de secagem na qualidade fisiológica de sementes de milho-doce, cultivar BR 400. **Revista Brasileira de Sementes**, v.22, n.2, p.21-30, 2000.

ARAÚJO, J.O.; PINHEIRO, D.T.; QUEIROZ, G.B.; SOARES, J.M.; HOSHIDE, A.K.; MORAIS JUNIOR, V.T.M.; ROCHA, S.J.S.S.; DIAS, D.C.F.S. Selection of Superior Senna macranthera Seeds, Carbon Stock, and Seedling Survival, and Costs for Habitat Restoration. **Sustainability**, v.15, 9875, p.1-17, 2023.

AZANZA, F.; BAR-ZUR, A.; JUVIK, J. A. Variation in sweet corn kernel characteristics associated with stand establishment and eating quality. **Euphytica**, v.87, n.1, p.7-18, 1996.

BAILLY, C. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. **Seed Science Research**, v.14, n.2, p.93-107, 2004.

BAILLY, C., BENAMAR, A., CORBINEAU, F., CÔME, D. Changes in malondialdehyde content and in superoxide dismutase, catalase and glutathione reductase activities in sunflower seeds as related to deterioration during accelerated aging. **Physiologia Plantarum**, v.97, p.104-110, 1996.

BALLESTEROS, D.; WALTERS C. Detailed characterization of mechanical properties and molecular mobility within dry seed glasses: relevance to the physiology of dry biological systems. **Plant Journal**, v.68, n.4, p.607-619, 2011.

BARBOSA, L.C.A. **Espectroscopia no infravermelho na caracterização de compostos orgânicos**. Viçosa: Ed. UFV, 2007.189p.

BARRETO, L.C.; GARCIA, Q.S.; Accelerated ageing and subsequent imbibition affect seed viability and the efficiency of antioxidant system in macaw palm seeds. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.39, n.72, p.1-8, 2017.

BASAVARAJAPPA, B.S.; SHETTY, H.S.; PRAKASH, H.S. Membrane deterioration and other biochemical changes associated with accelerated ageing of maize seeds. **Seeds Science and Technology**, v.19, n.2, p.279-286, 1991.

BASU, S.; GROOT, S.P.C. Seed Vigour and Invigoration. In: DADLANI M.; YADAVA, D.K. (Eds). **Seed Science and Technology: Biology, Production, Quality**. Singapore: Springer, 2023. p.67-89.

BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v.44, n.1, p.276-287, 1971.

BERNAL-LUGO, I.; LEOPOLD, A.C. Changes in soluble carbohydrates during seed storage. **Plant physiology**, v.98, n.3, p.1207-1210, 1992.

BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. New York: Plenum Press, 1994, 445p.

BEWLEY, J. D.; BRADFORD, K. J.; HILHORST, H. W. M.; NONOGAKI, H. **Seeds: physiology of development, germination and dormancy**. 3. ed. New York: Springer, 2013. 407 p.

BILIA, D. A. C.; FANCELLI, A.L.; MARCOS-FILHO, J. Comportamento de sementes de milho híbrido durante o armazenamento sob condições variáveis de temperatura e umidade relativa do ar. **Scientia Agricola**, v.51, n.1, p.153-157, 1994.

BOWLER, C.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D. Superoxide dismutase and stress tolerance. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.43, p.83-116, 1992.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, n.1-2, p.248-254, 1976.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA/ACS, 2009. 395p.

BRASIL. Congresso Nacional. Instrução Normativa nº 45, de 17 de setembro de 2013. Dispõe sobre os padrões para a produção e a comercialização de sementes. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 set. 2013. Seção 1, p.16.

BRERETON, R. G.; LLOYD, G. R. Partial least squares discriminant analysis: taking the magic away. **Journal of Chemometrics**, v.28, p.213-225, 2014.

CAMARGO, R.; CARVALHO, M.L.M. Armazenamento a vácuo de sementes de milho doce. **Revista Brasileira de Sementes**, v.30, n.1, p.131-139, 2008.

CAPILHEIRA, A.F.; SILVA, J.G.; PINTO, K.V.A.; GADOTTI, G.I.; CARVALHO, I.R. Corn seeds stored under varying storage conditions. **Engenharia Agrícola**, v.44, 2024.

CASTELLIÓN, M.; MATIACEVICH, S.; BUERA, P.; MALDONADO, S. Protein deterioration and longevity of quinoa seeds during long-term storage. **Food Chemistry**, v.121, p.952-958, 2010.

CASTRO, E.V.R.; SILVA, R.C. Fundamentos de Espectroscopia no Infravermelho e Aplicações. In: **Fundamentos de Espectroscopia e Aplicações**. Rio de Janeiro: Atheneu, 2018. p.73-97.

CHANCE, B.; MAEHLI, A. C. Assay of catalases and peroxidases. **Methods in Enzymology**, v.2, p.764-775, 1955.

CHANDEL R.K.; KHAN, Z.; GANDOTRA, S. Alterations in protein and isozymes profiles during accelerated ageing in soybean (*Glycine max* (L.) Merrill), **Journal of Functional and Environmental Botany**, v.5, n1, p.64-69, 2015.

CHANG, C.S.; CONVERSE, H.H.; STEELE, J.L. Modeling of moisture content of grain during storage with aeration. **Transactions of the ASAE**, v.37, n.6, p.1891-1898, 1994.

CHEN, L.Q. Sweet sugar transporters for phloem transport and pathogen nutrition. **New Phytologist**, v.201, p.1150-1155, 2014.

CICERO, S.M.; VIEIRA, R.D. Teste de frio. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA-NETO, J.B.; MARCOS-FILHO, J. (Eds.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 2020. p.277-316.

COAN, M.M.D.; PINTO, R.J.B.; SCAPIM, C.A. Melhoramento de milho especiais. In: LIMA, R.; BORÉM, A. (Eds.). **Melhoramento de milho**. Viçosa: Editora UFV, 2018. p.252-294.

COHEN, J. A coefficient of agreement for nominal scales. **Educational and Psychological Measurement**, v.20, n.1, p.37-46, 1960.

COIMBRA, R.A.; MARTINS, C.C.; TOMAZ, C.A.; NAKAGAWA, J. Testes de vigor utilizados na avaliação da qualidade fisiológica de lotes de sementes de milho-doce (*sh2*). **Ciência Rural**, v.39, n.9, p.2402-2408, 2009.

COOLBEAR, P. Mechanisms of seed deterioration. In: BASRA, A.S. (Ed.). **Seed quality: basic mechanisms and agricultural implications**. New York, The Haworth Press Inc. p.223-277, 1995.

COPELAND, L.O.; MCDONALD, M.B. **Principles of seed science and technology**. New York: Chapman e Hall. 3.ed. 1995. 409p.

CUI, H.; YU, J.; ZHAI, Y.; FENG, L.; CHEN, P.; HAYAT, K.; XU, Y.; ZHANG, X.; HO, C. Formation and fate of Amadori rearrangement products in Maillard reaction. **Trends in food science & technology**, v.115, p.391-408, 2021.

DADLANI M.; GUPTA A.; SINHA S.N.; KAVALI R. Seed Storage and Packaging. In: DADLANI M.; YADAVA, D.K. (Eds). **Seed Science and Technology: Biology, Production, Quality**. Singapore: Springer, 2023. p.239-266.

DANTAS, A.F.; FASCINELI, M.L.; JOSÉ, S.C.B.R.; PÁDUA, J.G.; GIMENES, M.A.; GRISOLIA, C.K. Loss of genetic integrity in artificially aged seed lots of rice (*Oryza sativa* L.) and common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Mutat Res Gen Tox Em**, v.846, p. 1-6, 2019.

DE GARA, L. Class III peroxidases and ascorbate metabolism in plants. **Phytochemistry Reviews**, v.3, n.1, p.195-205, 2004.

DEL LONGO, O. T. et al. Antioxidant Defences under Hyperoxygenic and Hyperosmotic Conditions in Leaves of Two Lines of Maize with Differential Sensitivity to Drought. **Plant and Cell Physiology**, v.34, n.7, p.1023-1028, 1993.

DELOUCHE, J.C.; BASKIN, C.C. Accelerated aging techniques for predicting the relative storability of seed lots. **Seed Science e Tecnologia**, v.1, n.2, p.427-452, 1973.

DELOUCHE, J.C.; MATTHES, R.K.; DOUGHERTY, G.M.; BOYD, A.H. Storage of seed in sub-tropical and tropical regions. **Seed Science and Tecnologia**, v.1, n.3, p.671-700, 1973.

DOLL, N. M.; ROYEK, S.; FUJITA, S.; OKUDA, S.; CHAMOT, S.; STINTZI, A.; WIDIEZ, T.; HOTHORN, M.; SCHALLER, A.; GELDNER, N.; INGRAM, G. A two-way molecular dialogue between embryo and endosperm is required for seed development. **Science**, v.367, n.6476, p.431-435, 2020.

DOORN, W.G.V.; KETSA, S. Cross reactivity between ascorbate peroxidase and phenol (guaiacol) peroxidase. **Postharvest Biology and Technology**, v.95, p.64-69, 2014.

DOUGLASS, S. K.; JUVIK, J. A.; SPLITTSTOESSER, W. E. Sweet corn seedling emergence and variation in kernel carbohydrate reserves. **Seed Science and Technology**, v.21, n.2, p.433-436, 1993.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v.28, n.3, p.350-356, 1956.

EBONE, L.A.; CAVERZAN, A.; CHAVARRIA, G. Physiologic alterations in orthodox seeds due to deterioration processes. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.145, p.34-42, 2019.

ENGEL, J.; GERRETZEN, J.; SZYMANSKA, E.; JANSEN, J.J.; DOWNEY, G.; BLANCHET, L.; BUYDENS, L.M.C. Breaking with trends in pre-processing? **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v.50, p.96-106, 2013.

FALADE, T.D.O.; SULTANBAWA, Y.; FLETCHER, M.T.; FOX, G. Near Infrared Spectrometry for Rapid Non-Invasive Modelling of Aspergillus-Contaminated Maturing Kernels of Maize (*Zea mays* L.). **Agriculture**, v.7, n.9, p.1-13, 2017.

FANTAZZINI, T.B.; ROSA, S.D.V.F.; PEREIRA, C.C.; PEREIRA, D.S.; CIRILLO, M.A.; OSSANI, P.C. Association between the artificial aging test and the natural storage of coffee seeds. **Journal of Seed Science**, v.40, n.2, p.164-172, 2018.

FARIA, J. C. T.; MELO, L. A.; ASSUMPCÃO, C. R. M.; BRONDANI, G. E.; BREIER, T. B.; FARIA, J. M. R. Physical quality of seeds of *Moquiniastrum polymorphum*. **Brazilian Journal of Biology**, v.79, n.1, p.63-69, 2019.

FARIA, L. A. L.; NASCIMENTO, W. M. Produção de sementes de milho-doce. In: NASCIMENTO, W (Ed.). **Produção de sementes de hortaliças – volume I**. Brasília: Embrapa, 2014. p.241-278.

FERREIRA, R.A.; OLIVEIRA, A.A.; SILVA, V.N.; PEREIRA, A.A.S.; BERNARDES, M.M.; BICALHO, E.M. Watching the days go by: Aging during sunflower seed storage under distinct oxygen availability. **Ciência e Agrotecnologia**, v.45, p.1-11, 2021.

FESSEL, S.A.; VIEIRA, R.D.; CRUZ, M.C.P.; PAULA, R.C.; PANOBIANCO, M. Electrical conductivity testing of corn seeds as influenced by temperature and period of storage. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.10, p.1551-1559, 2006.

FINNEY, E.; NORRIS, K. Determination of Moisture in Corn Kernels by Near-Infrared Transmittance Measurements. **Transactions of the ASAE**, v.21, n.3, p.581-584, 1978.

FOTOUO-M, H.; VORSTER, J.; DU TOIT, E.S.; ROBBERTSE, P.J. The effect of natural long-term packaging methods on antioxidant components and malondialdehyde content and seed viability *Moringa oleifera* oilseed. **South African Journal of Botany**, v.129, p.17-24, 2020.

FREITAS, R.A.; DIAS, D.C.F.S.; DIAS, L.A.S.; OLIVEIRA, M.G.A. Testes fisiológicos e bioquímicos na estimativa do potencial de armazenamento de sementes de algodão. **Revista Brasileira de Sementes**, v.26, n.1, p.84-91, 2004.

FREITAS, R.A.; DIAS, D.C.F.S.; OLIVEIRA, M.G.A.; DIAS, L.A. S.; JOSÉ, I C. Physiological and biochemical changes in naturally and artificially aged cotton seeds. **Seed Science & Technology**, v.34, p.253-264, 2006.

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

GIACOMO, D.R.; STEFANIA, D.Z. A multivariate regression model for detection of fumonisins content in maize from near infrared spectra. **Food Chemistry**, v.141, n.4, p.4289-4294, 2013.

GILL, S.S.; ANJUM, N.A; GILL, R.; YADAV, S.; HASANUZZAMAN, M.; FUJITA, M.; MISHRA, P.; SABAT, S.C. TUTEJA, N. Superoxide dismutase—mentor of abiotic stress tolerance in crop plants. **Environmental Science and Pollution Research**, v.22, n.14, p.10375-10394, 2015.

GONÇALVES, C.; RODRIGUES-JASSO, M. R.; GOMES, N.; TEIXEIRA, J. A.; BELO, I. Adaptation of dinitrosalicylic acid method to microtiter plates. **Analytical Methods**, v.2, p.2046-2048, 2010.

GONÇALVES, G.M.B; PEREIRA, M.G.; JÚNIOR, J.A.F.; SCHWANTES, I.A.; DURÃES, N.N.L.; CREVELARI, J.A.; JUNIOR, A.T.A. Development and selection of super-sweet corn genotypes (*sh2*) through multivariate approaches. **Bragantia**, v.77, n.4, p.536-545, 2018.

HAVIR, E. A; MCHALE, N. A. Biochemical and Developmental Characterization of Multiple Forms of Catalase in Tobacco Leaves. **Plant Physiology**, v.84, n.2, p.450-455, 1987.

HEATH, R.L.; PACKER, L. Photo peroxidation in isolated chloroplast. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.125, n.1, p.189-198, 1968.

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

HENZ, G.P.; MORETTI, C.L. Manuseio pós-colheita do milho-doce. In: PEREIRA FILHO, I.A.; TEIXEIRA, F.F. (Eds.). **O cultivo de milho-doce**. Brasília: Embrapa, 2016. p.251-273.

HODGE, J. E. Dehydrated foods, chemistry of browning reactions in model systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.1, n.15, p.625-651, 1953.

HOSSIN, M.; SULAIMAN, M.N. A review on evaluation metrics for data classification evaluations. **International journal of data mining & knowledge management process**, v.5, n.2, p.1-11, 2015.

HOURANT, P.; BAETEN, V.; MORALES, M. T.; MEURENS, M.; APARICIO, R. Oil and fat classification by selected bands of near-infrared spectroscopy. **Applied Spectroscopy**, v.54, p.1168-1174, 2000.

HU, Y. et al. Genome assembly and population genomic analysis provide insights into the evolution of modern sweet corn. **Nature Communications**, v.12, n.1227, p.1-13, 2021.

JHA, S. K.; SINGH, N. K.; AGRAWAL, P. K. Complementation of sweet corn mutants: a method for grouping sweet corn genotypes. **Journal of genetics**, v.95, n.1, p.183-187, 2016.

JIA, S.; YANG, L.; AN, D.; LIU, Z.; YAN, Y.; LI, S.; ZHANG, X.; ZHU, D.; GU, J. Feasibility of analyzing frost-damaged and non-viable maize kernels based on near infrared spectroscopy and chemometrics. **Journal of Cereal Science**, v.69, p.145-150, 2016.

JIANG, H.Y.; ZHU, Y.J.; WEI, L.M.; DAI, J.R.; SONG, T.M.; YAN, Y.L.; CHEN, S.J. Analysis of protein, starch and oil content of single intact kernels by near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) in maize (*Zea mays* L.). **Plant Breeding**, v.126, n.5, p.492-497, 2007.

JOLLIFFE, I.; CADIMA, J. Principal component analysis: a review and recent developments. **Philosophical transactions of the royal society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v.374, n.2065, p.1-16, 2016.

KAPILAN, R. Accelerated aging declines the germination characteristics of the maize seeds. **Scholars Academic Journal of Biosciences**, v.3, n.8, p.708-711, 2015.

KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, Peroxidase, and Polyphenoloxidase Activities during Rice Leaf Senescence. **Plant physiology**, v.57, n.2, p.315-319, 1976.

KAVITHA, S.; MENAKA, C.; SRINIVASAN, S.; YUVARAJA, A. Accelerated ageing test in maize: pattern of seed deterioration. **Madras Agriculture Journal**, v.104, p.41-44, 2017.

KIBINZA, S.; BAZIN, J.; BAILLY, C.; FARRANT, J.M.; CORBINEAU, F. Catalase is a key enzyme in seed recovery from ageing during priming. **Plant Science**, v.181, p.309-315, 2011.

KOSTER, K.L.; LEOPOLD, A.C. Sugars and Desiccation Tolerance in Seeds. **Plant Physiology**, v.88, n.3, p.829-832, 1988.

KRZYZANOWSKI, F.C.; FRANÇA-NETO, J.B.; GOMES-JUNIOR, F.G.; NAKAGAWA, J. Teste de vigor baseados em desempenho de plântulas. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA-NETO, J.B.; MARCOS-FILHO, J. (Eds.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 2020. p.80-140.

KUMAR, S. P. J.; PRASAD, S. R.; BANERJEE, R.; THAMMINENI, C. Seed birth to death: dual functions of reactive oxygen species in seed physiology. **Annals of Botany**, v.116, n.4, p.663-668, 2015.

KUSUMANINGRUM, D.; LEE, H.; LOHUMI, S.; MO, C.; KIM, L.S.; CHO, B. Non-destructive technique for determining the viability of soybean (*Glycine max*) seeds using FT-NIR spectroscopy. **Journal of Food and Agriculture**, v.98, n.5, p.1734-1742, 2018.

KWIATKOWSKI, A.; CLEMENTE, E. Characteristics of sweet corn (*Zea mays* L.) for industrialization. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v.1, n.2, p.93-103, 2007.

LABBÉ, L. M. B; VILLELA, F. A.; PESKE, S.T. Armazenamento de sementes. In: PESKE, S.T.; VILLELA, F.A.; MENEGHELLO, G.E. (eds). **Sementes: fundamentos científicos e tecnológicos**. 4 ed. Pelotas: Ed. Becker e Peske, p.465-559, 2019.

LANDIS, R.J.; KOCH, G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, v.33, n.1, p.159-174, 1977.

LAOSATIT, K.; AMKUL, K.; SOMTA, P.; TANADUL, O.; KERDSRI, C.; MONGKOL, W.; JITLAKA, C.; SURIHARN, K.; JOMPUK, C. Genetic diversity of sweet corn inbred lines of public sectors in Thailand revealed by SSR markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.22, n.11, p.1-22, 2022.

LARIOS, G.; NICOLODELLI, G.; RIBEIRO, M.; CANASSA, T.; REIS, A.R.; OLIVEIRA, S.L.; ALVES, C.Z.; MARANGONIA, B.S.; CENA, C. Soybean seed vigor discrimination by infrared spectroscopy and machine learning algorithms. **Analytical Methods**, v.12, n.35, p. 4303-4309, 2020.

LEOPOLD, A.C.; SUN, W.Q.; BERNAL-LUGO, I. The glassy state in seeds: analysis and functions. **Seed Science Research**. v.4, n.3, p.267-274, 1994.

LEPRINCE, O.; PELLIZZARO, A.; BERRIRI, S.; BUITINK, J. Late seed maturation: drying without dying. **Journal of Experimental Botany**, v.68, n.4 p.827-841, 2017.

LI, Y.; WANG, Y.; XUE, H.; PRITCHARD, H.W.; WANG, X. Changes in the mitochondrial protein profile due to ROS eruption during ageing of elm (*Ulmus pumila* L.) seeds. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.114, p.72-87, 2017.

LOPES, N.F.; LIMA, M.G.S. **Fisiologia da produção**. Viçosa: UFV, 2015. 492p.

LUZ, J.M.Q.; CAMILO, J.S.; BARBIERI, V.H.B.; RANGEL, R.M.; OLIVEIRA, R.C. Produtividade de genótipos de milho doce e milho verde em função de intervalos de colheita. **Horticultura Brasileira**, v.32, n.2, p.163-167, 2014.

LV, Y.; TIAN, P.; ZHANG, S.; WANG, J.; HU, Y. Dynamic proteomic changes in soft wheat seeds during accelerated ageing. **PeerJ**, v.6, p.1-16, 2018.

MAGALHÃES, P.C.; LAVINSKY, A.O.; SOUZA, T.C. Aspectos fisiológicos do milho-doce. In: PEREIRA FILHO, I.A.; TEIXEIRA, F.F. (Eds.). **O cultivo de milho-doce**. Brasília: Embrapa, 2016. p.37-52.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination - aid in selection and evaluation for Seedling emergence and vigor. **Crop Science**. v.2, n.2, p.176-177, 1962.

MANSOURI-FAR, C.; GOODARZIAN-GHAHFAROKHI, M.; SAEIDI, M.; ABDOLI, M. Antioxidant enzyme activity and germination characteristics of different maize hybrid seeds during ageing. **Environmental and Experimental Biology**, v.13, p.177-182, 2015.

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

MARCOS-FILHO, J. Teste de envelhecimento acelerado. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA-NETO, J.B.; MARCOS-FILHO, J. **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 2020a. p.185-246.

MARCOS-FILHO, J. Testes de vigor: importância e utilização. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA-NETO, J.B.; MARCOS-FILHO, J. (Eds.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 2020b. p.17-77.

MATILLA, A.J. The Orthodox Dry Seeds Are Alive: A Clear Example of Desiccation Tolerance. **Plants**, v.11, n.1, p.1-20, 2022.

MEDEIROS, A.D.; ARAÚJO, J.O.; LEÓN, M.J.Z.; SILVA, L.J.; DIAS, D.C.F.S. Parameters based on X-ray images to assess the physical and physiological quality of *Leucaena leucocephala* seeds. **Ciência e Agrotecnologia, Lavras**, v.42, n.6, p.643-652, 2018.

MEDEIROS, A.D.; MARTINS, M.S.; SILVA, L.J.; PEREIRA, M.D.; LEÓN, M.J.Z.; DIAS, D.C.F.S. X-ray imaging and digital processing application in non-destructive assessing of melon seed quality. **Journal of Seed Science**, v.42, n.5, p.1-13, 2020a.

MEDEIROS, A.D.; SILVA, L.J.; RIBEIRO, J.P.O.; FERREIRA, K.C.; ROSAS, J.T.F.; SANTOS, A.A.; SILVA, C.B. Machine Learning for Seed Quality Classification: An Advanced

Approach Using Merger Data from FT-NIR Spectroscopy and X-ray Imaging. **Sensors**, v.20, n.15, p.1-12, 2020b.

MEDEIROS, A. D.; ZAVALA-LEÓN, M. J., ARAÚJO, J.O.; PEREIRA, M. D.; DIAS, D. C. F. D. S.; SILVA, L. J. Relationship between internal morphology and physiological quality of *Leucaena leucocephala* seeds using image analysis. **Revista Árvore**, v.43, n.2, p. 1-9, 2019.

MILLIGAN, G.W; COOPER, M.C. An examination of procedures for determining the number of clusters in a data set. **Psychometrika**, v.50, p.159-179, 1985.

MITTLER, R. ROS Are Good. **Trends in Plant Science**, v.22, n.1, p.11-19, 2017.

MITLLER R.; BLUMWALD E. Estresse Abiótico. In: TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I.M.; MURPHY, A. **Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal**. 6ª Ed. Porto Alegre: Artmed, cap.24, p.731-761, 2017.

MOJENA, R. Hierarchical grouping methods and stopping rules: an evaluation. **The Computer Journal**, v.20, n.4, p.359-363, 1977.

MORAES, L.F.S.; CARVALHO, E.R.; LIMA, J.M.E.; COSSA, N.H.S.; MEDEIROS, J.C. Physiological quality of corn seeds treated with insecticides and stored at different temperatures. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.57, e02665, 2022.

MUKASA, P.; WAKHOLI, C.; MO, C.; OH, M.; JOO, H.; SUH, H. K.; CHO, B. Determination of viability of retinispora (*Hinoki cypress*) seeds using FT-NIR spectroscopy. **Infrared Physics and Technology**, v.98, p.62-68, 2019.

MURTHY, U.M.N.; KUMAR, P.P.; SUN, W.Q. Mechanisms of seed ageing under different storage conditions for *Vigna radiata* (L.) Wilczek: lipid peroxidation, sugar hydrolysis, Maillard reactions and their relationship to glass state transition. **Journal of Experimental Botany**, v.54, n.384, p.1057-1067, 2003.

NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados no desempenho das plântulas. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA-NETO, J.B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, Cap. 2, p.1-21, 1999.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate-specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, v.22, n.5, p.867-880, 1981.

NIHEI, T.H.; BERTAGNA, F.A.B.; KUKI, M.C.; SCAPIM, C.A.; PINTO, R.J.B.; JÚNIOR, A.T.A. Testers in supersweet corn lines. **Ciência Rural**, v.50, n.3, p.1-7, 2020.

NOCTOR, G.; REICHHELD, J.; FOSTER, C.H. ROS-related redox regulation and signaling in plants. **Seminars in Cell & Development Biology**, v.80, p.3-12, 2018.

NUMOTO, A. Y.; VIDIGAL FILHO, P. S.; SCAPIM, C. A.; FRANCO, A. A. N.; ORTIZ, A.H. T.; MARQUES, O. J.; PELLOSO, M. F. Agronomic performance and sweet corn quality as a function of inoculant doses (*Azospirillum brasilense*) and nitrogen fertilization management in summer harvest. **Bragantia**, v.78, n.1, p.26-37, 2019.

OLIVEIRA, T.L.; PINHO, R.G.V.; SANTOS, H.O.; SILVA, K.M.J.; PEREIRA, E.M.; SOUZA, J.L.D. Biochemical changes and physiological quality of corn seeds subjected to

different chemical treatments and storage times. **Journal of Seed Science**, v.42, n.38, p.1-15, 2020.

OHTO, M. A.; STONE, S. L.; HARADA, J. J. Genetic control of seed development and seed mass. **Annual Plant Reviews**, v.27, p.1-24, 2018.

PADILHA, M.S.; COELHO, C.M.M.; EHRHARDT-BROCARDO, N.C.M. Viability and performance of wheat seedlings after artificial seed aging. **Journal of Seed Science**, v.44, n.37, p.1-10, 2022.

PARAGINSKI, R.T.; ROCKENBACH, B. A.; SANTOS, R. F.; ELIAS, M.C.; OLIVEIRA, M. Qualidade de grãos de milho armazenados em diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.19, n.4, p.358-363, 2015.

PASQUINI, C. Near infrared spectroscopy: A mature analytical technique with new perspectives – A review. **Analytica Chimica Acta**, v.1026, p.8-36, 2018.

PEARSON, T.C.; WICKLOW, D.T.; MAGHIRANG, E.B.; XIE, F.; DOWELL, F.E. Detecting aflatoxin in single corn kernels by transmittance and reflectance spectroscopy. **Transactions of the ASAE**, v.44, n.5, p.1247-1254, 2001.

PEIXOTO, P. H. P., CAMBRAIA, J., SANT'ANNA, R., MOSQUIM, P. R., & MOREIRA, M. A. Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.11, n.3, p.137–143, 1999.

PEREIRA, C.C. Sweet corn seeds treatment and deterioration under modified atmosphere. **Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.** p. 98, 2021.

PEREIRA FILHO, I.A.; TEIXEIRA, F.F. (Eds.). **O cultivo do milho-doce**. Brasília: Embrapa, 2016. 298p.

PESSOA, H.B.S.V. Produção de sementes genéticas de milho doce (*Zea mays* var. *sacharata*, L.): um exemplo com a cultivar superdoce. **Informativo ABRATES**, Brasília, v.6, n.1, p.62-72, 1996.

PINHEIRO, D. T.; CAPOBIANGO, N. P.; MEDEIROS, A. D.; CAIAFA, K. F.; DIAS, D. C. F.S.; PINHEIRO, A. L. Assessment of the physical and physiological quality of *Piptadenia gonoacantha* seeds (Mart.) JF Macbr. using image analysis. **Revista Árvore**, v.44, n.26, p.1-9, 2020.

PRIYA, T.S.R.; MANICKAVASAGAN, A. Characterising corn grain using infrared Imaging and spectroscopic techniques: a review. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v.15, p.3234-3249, 2021.

QIU, G.; LÜ, E.; LU, H.; XU, S.; ZENG, F.; SHUI, Q. Single-kernel FT-NIR spectroscopy for detecting supersweet corn (*Zea mays* L. *Saccharata* sturt) seed viability with multivariate data analysis. **Sensors**, v.18, n.4, e.1010, 2018.

QIU, G.; LÜ, E.; WANG, N.; LU, H.; WANG, F.; ZENG, F. Cultivar Classification of Single Sweet Corn Seed Using Fourier Transform Near-Infrared Spectroscopy Combined with Discriminant Analysis. **Applied Sciences**, v.9, n.8, 2019.

QUEIROZ, G.B. Testes de vigor e espectroscopia no infravermelho próximo em sementes de milho-doce (*Zea mays* L. *saccharata*). **Dissertação** (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade federal de Viçosa, Viçosa. p. 96, 2022.

R CORE TEAM. **R: A Language and Environment for Statistical Computing**, Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2023.

RAHMAWATI; AQIL, M. The effect of temperature and humidity of storage on maize seed quality. IOP Conf. Series: **Earth and Environmental Science**, 484, p.1-6, 2020.

RANGANATHAN, U.; GROOT, S. P. C. Seed longevity and deterioration. In: DADLANI M.; YADAVA, D.K. (Eds). **Seed Science and Technology: Biology, Production, Quality**. Singapore: Springer, 2023. p. 91-108.

RATAJCZAK, E.; MALECKA, A.; CIERESZKO, I.; STASZAK, A.M. Mitochondria are important determinants of the aging of seeds. **International Journal of Molecular Sciences**, v.20, n.7, 2019.

REJ, S.; BANERJEE, S.; LAL, S.K.; KUMAR, P.R. Understanding the Significance of Raffinose Family Oligosaccharides in Seed Physiology. **Journal of Advances in Biology & Biotechnology**, v.27, n.9, p.1463-1476, 2024.

REVILLA, P.; ANIBAS, C.M.; TRACY, W.F. Sweet Corn Research around the World 2015–2020. **Agronomy**, v.11, 534, p. 1-49, 2021.

RIBEIRO, A.S.; NERI, T.F.S.; MEDEIROS, A.D.; MILAGRES, C.C.; SILVA, L.J. Use of radiographic images for rapid and non-destructive assessment of crambe seed quality. **Journal of Seed Science**, v.43, n.1, p.1-12, 2021.

RIVERA, A.A.C.; PINHO, R.G.V.; GUIMARÃES, R.M.; VEIGA, A.D.; PEREIRA, G.S.; PINHO, I.V.V. Efeito do ácido giberélico na qualidade fisiológica de sementes redondas de milho doce, sob diferentes condições de armazenamento. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.10, n.3, p.247-256, 2011.

RIVERA-TALAMANTES, C.F.J.; MICHCHENKO, A.; BUDAGOVSKY, A.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, G.; GROSHEVA, E. Influence of red laser radiation on the vigour of tomato seeds affected by aging. **Agrociencia**, v.56, n.1, p.1-11, 2022.

ROBERTS, E.H. Storage Environment and the Control of Viability. In: **Viability of Seeds**. Dordrecht: Springer Netherlands, 1972. p.14-58.

ROHLF, F.J. Adaptive hierarchical clustering schemes. **Systematic Biology**, v.19, n.1, p.58-82, 1970.

SAITO, T.; REHMSMEIER, M. The precision-recall plot is more informative than the ROC plot when evaluating binary classifiers on imbalanced datasets. **PloS one**, v.10, n.3, 2015.

SANO, N.; RAJJOU, L.; NORTH, H. M.; DEBEAUJON, I.; MARION-POLL, A.; SEO, M. Staying alive: molecular aspects of seed longevity. **Plant Cell Physiology**, v.54, n.4, p.660-674, 2016.

SANTOS, C.M.R.; MENEZES, N.L.; VILLELA, F.A. Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de feijão envelhecidas artificialmente. **Revista Brasileira de sementes**, v.26, n.1, p.110-119, 2004.

SCANDALIOS, J. G. Oxygen Stress and Superoxide Dismutases. **Plant Physiology**, v.101, n.1, p.7-12, 1993.

SENA, M.M.; ALMEIDA, M.R. Quimiometria aplicada aos dados espectrais no infravermelho próximo. In: TIBOLA, C. S.; MEDEIROS, E. P.; SIMEONE, M. L. F.; OLIVEIRA, M. A. (Eds.). **Espectroscopia no infravermelho próximo para avaliar indicadores de qualidade tecnológica e contaminantes em grãos**. Brasília: Embrapa, 2018. p.31-50.

SHAHEIN, A. M. E. A; SHALABY, N. E. Longevity of Maize Seed (*Zea mays* L.) under Different Storage Conditions. **Journal of Sustainable Agricultural Sciences**, v.47, n.4, p.45-55, 2021.

SHARMA, P.; JHA, A. B.; DUBEY, R. S.; PESSARAKLI, M. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. **Journal of Botany**, v.2012, p.1-26, 2012.

SHARMA, S.; KAUR, A.; BANSAL, A.; GILL, B. S. Positional effects on soybean seed composition during storage. **Journal of food science and technology**, v.50, n.2, p.353-359, 2013.

SILVA, J. A.; MEDEIROS, A. D.; PEREIRA, M. D.; RAMOS, A. K. F.; SILVA, L. J. Seed quality analysis of *Senna siamea* Lam. using image analysis techniques. **Journal of Seed Science**, v.42, n.42, p.1-10, 2020.

SILVA, L. A.; PERES, S. M.; BOSCARIOLI, C. **Introdução à Mineração de Dados: com Aplicações em R**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

SILVA, L. J., MEDEIROS, A. D.; OLIVEIRA, A. M. S. SeedCalc, a new automated R software tool for germination and seedling length data processing. **Journal of Seed Science**, v. 41, n.2, p.250-257, 2019.

SILVA, M.F.; ROQUE, J.V.; SOARES, J.M.; MOURA, L.O.; MEDEIROS, A.D.; SILVA, F.L.; SILVA, L.J. Near infrared spectroscopy for the classification of vigor level of soybean seed. **Revista Ciência Agronômica**, v.55, e20238703, 2024a.

SILVA, M.F.; SOARES, J.M.; MARTINS, M.S.; SILVA, F.C.S.; SILVA, F.L.; SILVA, L.J. Artificial aging for predicting the storability of soybean seeds via GGE biplot. **Journal of Seed Science**, v. 46, n.1, p.1-11, 2024b.

SILVA, M.F.; SOARES, J.M.; XAVIER, W.A.; SILVA, F.C.S.; SILVA, F.L.; SILVA, L.J. The role of the biochemical composition of soybean seeds in the tolerance to deterioration under natural and artificial aging. **Heliyon**, v.9, n.12, p.1-12, 2023.

SMIRNOFF, N. Ascorbic acid metabolism and functions: A comparison of plants and mammals. **Free Radical Biology and Medicine**, v.122, p.116-129, 2018.

SOARES, J.M.; BATISTA, T.B.; SILVA, M.F.; RODRIGUES, N.S.; DIAS, D.C.F.; SILVA, L.J. Classification of the physiological potential of soybean seed lots using infrared spectroscopy and chemometric methods. **Journal of Seed Science**, v.46, n.9, p.1-10, 2024.

SOUZA, L.R.; LIMÃO, M.A.R.; PINHEIRO, D.T.; PERIS, G.C.O.; DIAS, D.C.F.S.; DIAS, L.A.S. Near infrared spectroscopy and seedling image analysis to evaluate the physiological potential of *Urochloa decumbens* (Stapf) R.D. Webster seeds. **Journal of Seed Science**, v. 45, n.32, 2023.

SPIELBAUER, G.; ARMSTRONG, P.; BAIER, J.W.; ALLEN, W.B.; RICHARDSON, K.; SHEN, B.; SETTLES, A.M. High-Throughput Near-Infrared Reflectance Spectroscopy for Predicting Quantitative and Qualitative Composition Phenotypes of Individual Maize Kernels. **Cereal Chemistry**, v.86, n.5, p.556-564, 2009.

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

STRELECA, I., UGRIC-HARDI, Z., HLEVNJAK, M. Accumulation of Amadori and Maillard products in wheat seeds aged under different storage conditions. **Croatica Chemica Acta**, v.81, n.1, p.131-137, 2008.

STYER, R.C.; CANTLIFFE, D.J. Dependence of seed vigor during germination on carbohydrate source in endosperm mutants of maize. **Plant Physiology**, v.76, n.1, p.196-200, 1984.

SUN, W.Q. Glassy state and seed storage stability: the WLF kinetics of seed viability loss at $T > T_g$ and the plasticization effect of water on storage stability. **Annals of Botany**, v.79, n.3, p.291-297, 1997.

SURESH, A.; SHAH, N.; KOTECHEA, M.; ROBIN, P. Evaluation of biochemical and physiological changes in seeds of *Jatropha curcas* L. under natural aging, accelerated aging and saturated salt accelerated aging. **Scientia Horticulturae**, v. 255, p.21-29, 2019.

THARWAT, A. Classification assessment methods. **Applied computing and informatics**, v.17, n.1, p.168-192, 2021.

TIMÓTEO, T.S.; MARCOS-FILHO, J. Seed performance of different corn genotypes during storage. **Journal of Seed Science**, v.35, n.2, p.207-215, 2013.

VENKATESAN, S.; MASILAMANI, P.; JANAKI, P.; EEVERA, T.; SUNDARESWARAN, S.; RAJKUMAR, P. Role of Near - Infrared Spectroscopy in Seed Quality Evaluation: A Review. **Agricultural Reviews**, v.41, p.106-115, 2020.

VENTURA, L., DONÀ, M.; MACOVEI, A.; CARBONERA, D.; BUTTAFAVA, A.; MONDONI, A.; ROSSI, G.; BALESTRAZZI, A. Understanding the molecular pathways associated with seed vigor. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.60, p.196-206, 2012.

VESELOVA, T.V.; VESELOVSKY, V.A.; OBROUCHEVA, N.V. Deterioration mechanisms in air-dry pea seeds during early aging. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.87, p.133-139, 2015.

VIEIRA, R. D.; MARCOS-FILHO, J. Teste de condutividade elétrica. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA-NETO, J.B.; MARCOS-FILHO, J. (Eds.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 2020. p.333-388.

WANG, B.; YANG, R.; JI, Z.; ZHANG, H.; ZHENG, W.; ZHANG, H.; FENG, F. Evaluation of biochemical and physiological changes in sweet corn seeds under natural aging and artificial accelerated aging. **Agronomy**, v.12, n.5, p.1-13, 2022.

WANG, Y.; PENG, Y.; ZHUANG, Q.; ZHAO, X. Feasibility analysis of NIR for detecting sweet corn seeds vigor. **Journal of Cereal Science**, v.93, 102977, p.1-7, 2020.

WILSON, D.O.; MCDONALD, M.B. The lipid peroxidation model of seed ageing. **Seed Science and Technology**, v.14, p.269-300,1986.

WORKMAN, J. JR.; WEYER, L. **Practical guide to interpretive near-infrared spectroscopy**. Boca Raton: CRC Press: Taylor & Francis Group, 2007. 346 p.

WU, X.; ZENG, S.; FU, H. WU, B.; ZHOU, H.; DAI, C. Determination of corn protein content using near-infrared spectroscopy combined with A-CARS-PLS. **Food Chemistry: X**, v.18, p.1-7, 2023.

XIA, Y.; XU, Y.; LI, J.; ZHANG, C.; FAN, S. Recent advances in emerging techniques for non-destructive detection of seed viability: A review. **Artificial Intelligence in Agriculture**, v.1, p.35-47, 2019.

XIE, Y.; LIU, S.; JIA, L.; GAO, E.; SONG, H. Effect of different storage temperatures on respiration and marketable quality of sweet corn. **Advanced Engineering and Technology**, v.3, p.219-224, 2017.

XING, M.; LONG, Y.; WANG, Q.; TIAN, X.; FAN, S.; ZHANG, C.; HUANG, W. Physiological alterations and nondestructive test methods of crop seed vigor: a comprehensive review. **Agriculture**, v.13, p.1-25, 2023.

ZHANG, K.; ZHANG, Y.; SUN, J.; MENG, J.; TAO, J. Deterioration of orthodox seeds during ageing: Influencing factors, physiological alterations and the role of reactive oxygen species. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.158, p. 475-485, 2021.