



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS**

**POTENCIAL FISIOLÓGICO E SANIDADE DE SEMENTES DE MILHO
REVESTIDAS COM QUITOSANA**

MARINA BARROS ZACHARIAS

**Araras
2022**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS

POTENCIAL FISIOLÓGICO E SANIDADE DE SEMENTES DE MILHO
REVESTIDAS COM QUITOSANA

MARINA BARROS ZACHARIAS

ORIENTADORA: Prof^ª. Dra. MARIANA ALTENHOFEN DA SILVA

COORIENTADOR: Prof. Dr. VICTOR AUGUSTO FORTI

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Produção
Vegetal e Bioprocessos Associados
como requisito parcial à obtenção do
título de MESTRE EM PRODUÇÃO
VEGETAL E BIOPROCESSOS
ASSOCIADOS

Araras

2022

Barros Zacharias, Marina

Potencial fisiológico e sanidade de sementes de milho
revestidas com quitosana / Marina Barros Zacharias --
2022.
55f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São
Carlos, campus Araras, Araras
Orientador (a): Mariana Altenhofen da Silva
Banca Examinadora: Mariana Altenhofen da Silva,
Francisco Guilhien Gomes Junior, Marcio Roberto Soares
Bibliografia

1. Biopolímeros. 2. Sementes. 3. Potencial fisiológico. I.
Barros Zacharias, Marina. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática
(SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Maria Helena Sachi do Amaral - CRB/8
7083



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Agrárias

Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Marina Barros Zacharias, realizada em 26/01/2022.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Mariana Altenhofen da Silva (UFSCar)

Prof. Dr. Francisco Guilhien Gomes Junior (ESALQ/USP)

Prof. Dr. Marcio Roberto Soares (UFSCar)

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

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof^a Dra. Mariana Altenhofen da Silva, gratidão e profunda admiração por sua generosidade, dedicação, ética e agradável convívio.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Victor Augusto Forti, gratidão e profunda admiração por sua generosidade, dedicação, ética e agradável convívio.

Aos meus pais Denise e Darwin, minha eterna gratidão pelo companheirismo, inspiração e amizade.

Aos meus familiares e amigos, pelo apoio e convivência.

À coordenadora Prof^a Dra. Sandra Ceccato Antonini e aos professores do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados do Centro de Ciências Agrárias (*Campus Araras*) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), pelo aprendizado e convívio acadêmico.

Ao Prof. Dr. Reinaldo Gaspar Bastos, por permitir o uso dos equipamentos do Laboratório de Microbiologia Aplicada e Controle (LABMAC) e ao Prof. Dr. Fernando César Sala, por disponibilizar o local para armazenamento das sementes.

Ao apoio técnico da Dra. Catarina Amorim Oliveira, do Laboratório de Microbiologia Aplicada e Controle (LABMAC), pela contribuição e convivência.

Às secretárias Mônica, Sirlene e Tereza Cristina, da Pós-Graduação do Centro de Ciências Agrárias (*Campus Araras*) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), pela orientação e apoio.

Aos funcionários do Centro de Ciências Agrárias (*Campus Araras*) da Universidade Federal de São Carlos, por estruturarem o ambiente universitário em prol do conhecimento e da formação acadêmica.

Aos professores Dra. Ana Novembre, Dr. Marcio Roberto Soares e Dra. Maria Gabriela Campos, pelas contribuições por ocasião do exame de qualificação.

Aos professores Dr. Marcio Roberto Soares e Dr. Francisco Guilhien Gomes Junior, pela disponibilidade em participar da banca examinadora da defesa de dissertação.

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

À Natureza, que nos oferece a grandiosa possibilidade de compreender a nossa insignificância sem retirar o brilho da vida.

SUMÁRIO

	Página
ÍNDICE DE TABELAS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
1 INTRODUÇÃO	01
2 OBJETIVOS	03
3 REVISÃO DA LITERATURA	04
3.1 Tecnologia do tratamento de sementes.....	04
3.2 Potencial fisiológico de sementes.....	05
3.3 Quitosana e sua aplicação no revestimento de sementes.....	06
4 MATERIAIS E MÉTODOS	11
4.1 Material.....	11
4.2 Avaliação das formulações à base de quitosana para revestimento das sementes de milho.....	11
4.3 Preparo das soluções de quitosana para revestimento das sementes de milho.....	13
4.4 Aplicação dos revestimentos nas sementes de milho.....	13
4.5 Avaliação física das sementes após aplicação da quitosana.....	14
4.5.1 Aspecto visual do revestimento.....	14
4.5.2 Teor de água.....	14
4.5.3 Massa de 1000 sementes.....	15
4.6 Avaliação do potencial fisiológico das sementes.....	15
4.6.1 Teste de germinação.....	15
4.6.1.1 Índice de Velocidade de Germinação (IVG).....	15
4.6.1.2 Comprimento de plântulas.....	15
4.6.2 Teste de frio em rolo de papel com terra.....	15
4.6.3 Teste de emergência de plântulas.....	16
4.6.3.1 Índice de Velocidade de Emergência (IVE).....	16
4.6.3.2 Altura de plântulas.....	16
4.6.3.3 Massa de matéria seca de raiz e parte aérea.....	16
4.7 Avaliação da sanidade das sementes.....	17

4.8	Forma de análise dos resultados.....	17
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18
5.1	Definição dos níveis das variáveis estudadas.....	18
5.2	Método de aplicação da solução de revestimento nas sementes.....	19
5.3	Avaliação física das sementes após aplicação de quitosana.....	22
5.3.1	Aspecto visual do revestimento.....	22
5.3.2	Teor de água e massa de 1000 sementes.....	23
5.4	Avaliação do potencial fisiológico das sementes.....	26
5.4.1	Germinação (1ª contagem e final), IVG, comprimento de raiz, comprimento de parte aérea e comprimento total de plântulas.....	27
5.4.2	Teste de frio.....	34
5.4.3	Teste de emergência, IVE, altura de plântulas e massa de matéria seca de raiz e de parte aérea de plântulas.....	36
5.5	Avaliação da sanidade das sementes.....	43
6	CONCLUSÕES.....	46
7	LITERATURA CITADA.....	47

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Variáveis e níveis utilizados no planejamento fatorial completo 2 ² com pontos axiais para a formulação do revestimento de quitosana.....	12
Tabela 2. Matriz de experimentos do Planejamento Fatorial Completo 2 ² com pontos axiais para a formulação das coberturas de quitosana em sementes de milho.....	12
Tabela 3. Classes de coloração das sementes de milho revestidas com quitosana.....	14
Tabela 4. Classificação do aspecto visual das sementes revestidas com quitosana (método de aplicação 2) de acordo com a intensidade de coloração.....	22
Tabela 5. Resultados de teor de água e massa de 1000 sementes para os revestimentos à base de quitosana em sementes de milho.....	24
Tabela 6. Resultados de germinação (1 ^a contagem e contagem final), índice de velocidade de germinação (IVG), comprimento de raiz, de parte aérea e comprimento total de plântulas para os revestimentos à base de quitosana em sementes de milho.....	28
Tabela 7. Resultados de germinação após o teste de frio para os revestimentos à base de quitosana em sementes de milho.....	35
Tabela 8. Resultados de emergência de plântulas, índice de velocidade de emergência (IVE), altura de plântulas e massa de matéria seca de raiz e de parte aérea para os revestimentos à base de quitosana em sementes de milho.....	37

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estruturas químicas da quitina (A) e quitosana (B) (Adaptado de Kumar <i>et al.</i> , 2019).....	08
Figura 2. Filmes de quitosana/glicerol dos tratamentos T7 (2,0/0) (A) e T8 (2,0/0,30) (B) em sementes de milho (método de aplicação 1).....	19
Figura 3. Sementes de milho revestidas (método de aplicação 2) com filmes de quitosana/glicerol em diferentes concentrações. Controle (A); T5 (0,6/0,30) (B); T4 (3,0/0,51) (C) e T6 (3,4/0,30) (D) e grupos de sementes dos tratamentos T5, com menor concentração de quitosana (E) e T6, com maior concentração de quitosana (F).....	21
Figura 4. Intensidade de coloração no pedúnculo (A), cotilédone (B) e endosperma (C) de sementes de milho revestidas com quitosana (método de aplicação 2), classificada em A: ausente (D); L: leve (E); M: moderado (F); I: intenso (G). Controle (G).....	23
Figura 5. Gráfico de Pareto (A) e superfície de resposta (B) para o efeito das variáveis concentração de quitosana e concentração de glicerol no teor de água.....	25
Figura 6. Gráfico de Pareto (A) e superfície de resposta (B) para o efeito das variáveis concentração de quitosana e concentração de glicerol na massa de 1000 sementes.....	26
Figura 7. Gráficos de Pareto para o efeito das variáveis concentração de quitosana e concentração de glicerol na germinação: (A) 1° e (B) 2° contagem.....	30
Figura 8. Gráfico de Pareto (A) e superfície de resposta (B) para o efeito das variáveis concentração de quitosana e concentração de glicerol no Índice de Velocidade de Germinação (IVG).....	31
Figura 9. Gráficos de Pareto para o efeito das variáveis concentração de quitosana e concentração de glicerol nos comprimentos da raiz (A) e total (B).....	32
Figura 10. Gráfico de Pareto (A) e superfície de resposta (B) para o efeito das variáveis concentração de quitosana e concentração de glicerol no comprimento da parte aérea.....	33

Figura 11. Gráfico de Pareto para o efeito das variáveis concentração de quitosana e concentração de glicerol no percentual de germinação após o teste de frio.....	36
Figura 12. Gráfico de Pareto para o efeito das variáveis concentração de quitosana e concentração de glicerol na emergência das plântulas.....	38
Figura 13. Gráfico de Pareto (A) e superfície de resposta (B) para o efeito das variáveis concentração de quitosana e concentração de glicerol no Índice de Velocidade de Emergência das plântulas (IVE).....	39
Figura 14. Gráfico de Pareto (A) e superfície de resposta (B) para o efeito das variáveis concentração de quitosana e concentração de glicerol na altura das plântulas.....	40
Figura 15. Gráficos de Pareto para o efeito das variáveis concentração de quitosana e concentração de glicerol na massa de matéria seca da raiz (A) e parte aérea (B).....	41
Figura 16. Ocorrência (%) de <i>Aspergillus</i> spp., <i>Fusarium</i> spp. e <i>Penicillium</i> spp. em sementes de milho sem e com revestimento de quitosana (2%).....	44

POTENCIAL FISIOLÓGICO E SANIDADE DE SEMENTES DE MILHO REVESTIDAS COM QUITOSANA

Autor: MARINA BARROS ZACHARIAS

Orientadora: Prof^a. Dra. MARIANA ALTENHOFEN DA SILVA

Coorientador: Prof. Dr. VICTOR AUGUSTO FORTI

RESUMO

Diversos efeitos nocivos ao meio ambiente podem ser atribuídos ao uso e descarte indiscriminados de produtos não renováveis e não biodegradáveis. A quitosana é um biopolímero com excelentes propriedades filmogênicas que vem sendo estudada no revestimento de sementes. O objetivo foi avaliar o efeito de formulações de revestimento de quitosana (concentração de quitosana 0,6-3,4% m/v e de glicerol 0-0,60 g/g quitosana) na qualidade de sementes de milho (*Zea mays* L.) mediante análise dos aspectos físicos (análise visual do revestimento, teor de água e massa de 1000 sementes), potencial fisiológico (teste de germinação, índice de velocidade de germinação, comprimento de plântulas, teste de frio, emergência de plântulas, índice de velocidade de emergência, altura de plântulas e massa de matéria seca de raiz e parte aérea) e sanidade (*Blotter test*). Foram testados dois métodos de aplicação do revestimento (1 – secagem das sementes imersas na solução polimérica e 2 – secagem após imersão e retirada imediata das sementes da solução). No método de aplicação 1 não houve germinação, portanto os resultados referiram-se ao método de aplicação 2. A solução de revestimento de quitosana associada ao glicerol não interferiu no teor de água, massa de 1000 sementes, porcentagem de germinação e de emergência, teste de frio e massa de matéria seca da raiz, mas concentrações mais altas podem reduzir o índice de velocidade de germinação, índice de velocidade de emergência, altura de plântulas e massa de matéria seca da parte aérea. O revestimento na condição selecionada (quitosana 2% e 0,30 g glicerol/g quitosana) reduziu a ocorrência de *Penicillium* spp. O potencial de uso da quitosana como revestimento de sementes de milho foi confirmado considerando os aspectos físicos e sem comprometer o potencial fisiológico.

Palavras-chave: Biopolímero; Potencial fisiológico; *Zea mays* L.; Peliculização.

PHYSIOLOGICAL POTENTIAL AND HEALTH QUALITY OF CORN SEEDS COATED WITH CHITOSAN

Author: MARINA BARROS ZACHARIAS

Adviser: Prof^a. Dra. MARIANA ALTENHOFEN DA SILVA

Co-adviser: Prof. Dr. VICTOR AUGUSTO FORTI

ABSTRACT

Several harmful effects to the environment can be attributed to indiscriminate use and disposal of non-renewable and non-biodegradable products. Chitosan is a biopolymer with excellent film forming properties that has been studied on seed coating. The objective was to evaluate the effect of chitosan coating formulations (0.6-3.4% w/v chitosan and 0-0.60 g glycerol/g chitosan) on the quality of corn seeds (*Zea mays* L.) through the analysis of physical aspects (visual analysis of the coating, water content and 1,000-seed mass), physiological potential (germination test, germination speed index, seedling length, cold test, seedling emergence, seedling emergence speed index, seedling height and root and shoot dry matter mass) and health quality (Blotter test). Two coating methods were also tested (1 – drying the seeds immersed in the polymeric solution and 2 – drying after immersion and immediate withdraw of the seeds from the solution). In application method 1 there was no germination, therefore the results referred to application method 2. Chitosan coating solution associated with glycerol did not interfere in water content, 1,000-seed mass, germination and emergence percentage, cold test and root dry matter mass, but higher concentrations can reduce germination speed index, emergence speed index, seedling height and shoot dry matter mass. Coating in the selected condition (chitosan 2% and 0.30 g glycerol/g chitosan) reduced the occurrence of *Penicillium* spp. The potential use of chitosan as a coating on corn seeds was confirmed considering the physical aspects and without compromising the physiological potential.

Key-words: Biopolymer; Physiological potential; *Zea mays* L.; Film-coating.

1 INTRODUÇÃO

Diante de um cenário global de mudanças climáticas torna-se urgente a busca por alternativas sustentáveis capazes de garantir a produção de alimentos e ainda atender aos desafios da crise hídrica, esgotamento da fertilidade do solo, contaminação da água e a pressão pelo surgimento de novas pragas. Esses fatores adversos têm afetado a produtividade dos cultivos, comprometendo os ganhos econômicos e a segurança alimentar da população (PATHAK *et al.*, 2018), ao mesmo tempo em que a produção agrícola mundial para alimentos e bioenergia precisa ser duplicada até 2050 (RAY *et al.*, 2013).

A otimização do uso de insumos na agricultura vem sendo constantemente buscada e tecnologias agrícolas inovadoras com base em sistemas de liberação lenta e/ou controlada de nutrientes e água têm contribuído para esse fim (DUHAN *et al.*, 2017). Dentre essas tecnologias, destaca-se o uso de polímeros naturais hidrofílicos, que funcionam como um revestimento superabsorvente de água e nutrientes, reduzindo a frequência de irrigação, aumentando a taxa de sobrevivência das plantas em campo e a economia com fertilizantes (ZHONG *et al.*, 2013).

Nos sistemas de liberação lenta e controlada, a imobilização de agentes ativos em matrizes poliméricas é um método promissor, inclusive para o controle de doenças fitopatogênicas (KIM *et al.*, 2012). A microencapsulação por meio da formação de microcápsulas ou de microesferas de quitosana tem sido eficiente na adsorção, proteção e liberação de compostos ativos (MATTÉ; da ROSA, 2013), sejam eles óleos essenciais, extratos vegetais e/ou nanomateriais (KUMAR *et al.*, 2020). A veiculação destes compostos em revestimentos à base de quitosana é interessante pois, além da manutenção da qualidade de sementes para garantia de uma boa germinação e estabelecimento de plântulas em campo, o revestimento com biopolímeros pode auxiliar na absorção de água e contribuir na busca por métodos mais sustentáveis.

A quitosana é um polissacarídeo proveniente da desacetilação da quitina, um dos biopolímeros mais abundantes na natureza, sendo encontrada em exoesqueletos de artrópodes e crustáceos e na parede celular de alguns fungos. A quitosana é insolúvel em água, mas solúvel em soluções diluídas de ácidos (PARK *et al.*, 2001) e apresenta vantagens de ser um biopolímero não tóxico,

biodegradável, bioativo e biocompatível (COMA *et al.*, 2002; HEMANTARANJAN *et al.*, 2014).

Diversos estudos envolvendo o uso da quitosana com finalidade agrícola vêm sendo realizados, incluindo trabalhos com condicionamento osmótico de sementes (AL-TAWAHA; AL-GHZAWI, 2013), fertilizantes (CERRI *et al.*, 2020), controle de doenças fitopatogênicas (AKTER *et al.*, 2018), controle biológico (CHANDRIKA *et al.*, 2019) e revestimento de sementes (HAAS *et al.*, 2018).

A manutenção da qualidade de sementes submetidas a revestimento com polímeros tem sido relatada em diversas culturas, como o milho (AVELAR *et al.*, 2012), a soja (AVELAR *et al.*, 2015), o arroz (FAGUNDES *et al.*, 2017) e o trigo (FREIBERG *et al.*, 2017).

Para a cultura do milho, uma planta da família Poaceae, de grande importância no Brasil para a alimentação animal, humana e geração de bioenergia (CARVALHO *et al.*, 2015), Carvalhais *et al.* (2018) verificaram que a quitosana possibilitou a formação de plântulas com maior biomassa seca sob déficit hídrico quando comparado às plântulas provenientes de sementes não tratadas. Martins (2016), estudando híbridos de milho, concluiu que a quitosana pode proporcionar bons resultados, tanto na germinação quanto na anatomia radicular e maior resistência e adaptação das plântulas às condições adversas.

Neste sentido, o presente trabalho propõe a avaliação do potencial do uso da quitosana no revestimento de sementes de milho, considerando aspectos físicos e seu efeito no potencial fisiológico e na sanidade das sementes. Esta temática alinha-se a dois dos Objetivos do Desenvolvimento Sustentável propostos pela Organização das Nações Unidas (ONU): consumo e produção responsáveis (objetivo nº12), que engloba “reduzir significativamente a liberação destes [produtos químicos] para o ar, água e solo, para minimizar seus impactos negativos sobre a saúde humana e o meio ambiente” e “reduzir substancialmente a geração de resíduos por meio da prevenção, redução, reciclagem e reuso”; fome zero e agricultura sustentável (objetivo nº2), no qual se pretende até 2030 “garantir sistemas sustentáveis de produção de alimentos e implementar práticas agrícolas resilientes, que aumentem a produtividade e a produção, que ajudem a manter os ecossistemas, que fortaleçam a capacidade de adaptação às mudanças climáticas (...)” (ONU, 2021).

2 OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar o potencial de uso da quitosana no revestimento de sementes de milho (*Zea mays* L.), considerando aspectos físicos, potencial fisiológico e sanidade das sementes.

Objetivos específicos

- Avaliar o método de aplicação da quitosana nas sementes.
- Avaliar o efeito das variáveis concentração de quitosana e concentração de glicerol na formulação da solução de revestimento e selecionar a mais adequada considerando os aspectos físicos e o potencial fisiológico de sementes de milho.
- Avaliar a sanidade das sementes de milho revestidas com quitosana na condição selecionada.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Tecnologia do tratamento de sementes

A tecnologia *Film-Coating* (revestimento de sementes) é uma prática vinculada ao tratamento de sementes (TS), na qual são usados polímeros com a função de fixar produtos antimicrobianos aplicados às sementes, auxiliando no desempenho destas quanto aos aspectos de qualidade física, fisiológica e sanitária e reduzindo o pó em sementes tratadas (ABRASEM, 2014), sendo comumente adotada em sementes de milho. Em propriedades de pequena escala, esse tratamento é realizado por equipamentos pouco sofisticados, como o tambor giratório ou a betoneira (FRANÇA-NETO *et al.*, 2016), enquanto para a indústria são utilizados atomizadores de grande escala.

O uso de sementes de alta qualidade tem grande importância quanto à uniformidade e rapidez na formação de plântulas vigorosas (ALVARENGA *et al.*, 2020) e, se aliado ao revestimento de sementes, pode reduzir a exposição das sementes a fitopatógenos e a condições ambientais adversas. O tratamento de sementes de milho é amplamente utilizado, tendo em vista produtos químicos antimicrobianos que promovam a manutenção da qualidade das sementes no armazenamento e previamente ao plantio (SILVA *et al.*, 2020).

Ainda é prática usual o tratamento com fungicidas em sementes para auxiliar na emergência das plântulas, visando maximizar a uniformidade e o estande da cultura sem afetar o potencial fisiológico das sementes (PINTO, 2007). Em milho e soja, a maioria das pesquisas com revestimento de sementes inclui a utilização de produtos sintéticos com efeito fungicida, tais como carbofurano, thiram e triadimenol, que limitam a disseminação de patógenos e asseguram a emergência das plântulas em condições ambientais adversas, porém podem causar problemas de saúde crônicos em humanos e animais (ITO, 2013; ZENG *et al.*, 2010). Alternativas ambientalmente seguras visando à obtenção de métodos alternativos ao tratamento químico de sementes são de grande interesse na busca por sistemas agrícolas mais sustentáveis (LUKSEVICIUTE; LUKSIENE, 2020).

A redução e a substituição de produtos químicos antimicrobianos, de alto custo e danosos ao ambiente, pelo uso da quitosana e seus oligossacarídeos promovem redução de custos aos produtores e a sua aplicação apresenta potencial de incremento nos rendimentos (HEMANTARANJAN *et al.*, 2014) e na manutenção

da qualidade de sementes. Nesse sentido, a quitosana apresenta potencial tanto em alternativa a esses produtos como atuando como barreira física a condições adversas.

3.2 Potencial fisiológico de sementes

A qualidade de sementes é determinada com base em aspectos físicos, fisiológicos, sanitários e genéticos, por meio de testes conduzidos em laboratório e em condições de campo. Dentro do aspecto fisiológico, o vigor é um componente fundamental da qualidade de sementes, sendo utilizado para mensurar seu potencial fisiológico (viabilidade e vigor) e identificar lotes que venham a apresentar bom desempenho, a exemplo da uniformidade e velocidade com que ocorre a germinação (TOLEDO *et al.*, 1999). Assim, o vigor pode ser compreendido como a “combinação de características que determinam o potencial para alta performance de sementes após o plantio” (MARCOS-FILHO, 2015a).

Dentre alguns testes de vigor, tem-se o teste de frio, considerado um teste de resistência representado pela probabilidade das plântulas sobreviverem em campo frente a condições de estresse, como baixa temperatura, alta umidade e agentes patogênicos, indicando o potencial fisiológico de um lote de sementes (PERES, 2010; MARCOS-FILHO, 2015a).

A primeira contagem de germinação é realizada juntamente ao teste de germinação (BRASIL, 2009a), de forma que maior vigor das sementes é observado quanto maior a porcentagem de plântulas normais nessa contagem, estando correlacionadas com a velocidade de germinação (PERES, 2010), esta que é determinada ao longo do período em que o teste de germinação ocorre e complementa as informações obtidas na primeira contagem e contagem final. Plântulas normais são consideradas aquelas que apresentam “todas as suas estruturas essenciais bem desenvolvidas, completas, proporcionais e sadias” (BRASIL, 2009a).

O teste de massa de matéria seca de plântulas possibilita determinar que plântulas com maiores massas médias de matéria seca apresentam maior vigor, em função da maior transferência de massa seca pelos tecidos de reserva das sementes para o eixo embrionário durante a germinação (KRZYZANOWSKI *et al.*, 2020).

Os testes de vigor devem ser associados ao teste de emergência das plântulas em campo para monitorar a sua eficiência. O teste de emergência de plântulas também tem como base a porcentagem de plântulas normais, indicando o vigor de plântulas com o diferencial de estabelecer condições mais semelhantes às encontradas em situações de campo (OLIVEIRA, 2009a).

No que diz respeito à viabilidade, a germinação de sementes compreende um processo vital de três fases: Fase I – embebição, em que a captação de água pela semente culmina na reativação de seu metabolismo, intensificando a respiração e a atividade de enzimas e hormônios; Fase II – indução do crescimento, fase de repouso que compreende o processo bioquímico de produção de energia a partir da respiração, a digestão das reservas mediante sistemas enzimáticos e a translocação e assimilação de nutrientes; Fase III – crescimento do embrião, com a protusão da raiz primária, síntese de DNA e divisão celular e desenvolvimento da plântula (MARCOS-FILHO, 2015b).

3.3 Quitosana e sua aplicação no revestimento de sementes

Diversos efeitos deletérios ao ambiente vêm sendo observados devido ao uso e descarte indiscriminado de produtos à base de polímeros derivados de petróleo, os quais não são renováveis e, em sua maioria, não biodegradáveis (OTONI *et al.*, 2017). Novos materiais biodegradáveis oriundos de matérias primas de origem renovável têm sido desenvolvidos, de modo a manter suas características físicas e mecânicas e, ao final de sua vida útil, serem transformados em materiais não tóxicos mediante a ação de microrganismos (VOX *et al.*, 2013).

As matrizes poliméricas biodegradáveis podem atuar como veículos, inclusive contribuindo para uma redução significativa nas quantidades de agroquímicos por meio de sua encapsulação em volumes superbaixos e liberação controlada, contribuindo para evitar a exposição do produto ao ambiente externo, bem como sua evaporação (PIRZADA *et al.*, 2020).

O uso de biopolímeros como revestimento de sementes vem ganhando destaque no meio científico, como a quitosana, que promoveu acréscimos na germinação de sementes de soja e na produtividade das plântulas (ZENG *et al.*, 2012), carboximetilcelulose e alginato de sódio, que mantiveram a viabilidade de sementes de feijão (OLIVEIRA *et al.*, 2009b), acetato de celulose (FRIULI *et al.*, 2020), além de misturas de biopolímeros que favoreceram a germinação de

sementes de milho (VERCELHEZE *et al.*, 2019), de forma que apresentam grande potencial no que tange a sua utilização como revestimentos de sementes alternativos aos produtos químico-sintéticos.

A eficácia de um material para uso no revestimento de sementes depende de sua taxa de degradabilidade, da composição e qualidade do revestimento para promover uma barreira à permeação de água e a produtos químicos, das propriedades mecânicas e espessura, assim como dos efeitos tóxicos em sementes devido à composição do revestimento (FRIULI *et al.*, 2020).

A formação de filmes poliméricos no revestimento de sementes pode favorecer a absorção de água e a germinação, além de servir à incorporação de agentes ativos, como compostos antimicrobianos e nutrientes, fornecer maior proteção à semente e favorecer o crescimento de plântulas, refletido no vigor (OLIVEIRA *et al.*, 2009b).

A quitosana é um polissacarídeo catiônico insolúvel em água, porém solúvel em soluções diluídas de ácidos fracos. A massa molar e o grau de desacetilação da quitosana, que indica a proporção de grupos amino presentes nas cadeias do polímero, variam de acordo com a fonte e com as condições do processo de desacetilação, dando origem a quitosanas com diferentes características funcionais (PARK *et al.*, 2001; KUMAR *et al.*, 2020). A obtenção de quitosana de baixa massa molar e oligossacarídeos de quitosana a partir da hidrólise da quitosana tem sido de interesse, uma vez que são formas solúveis em água (HEMANTARANJAN *et al.*, 2014).

A quitosana pode ser obtida comercialmente através da desacetilação da quitina, presente em resíduos do processamento de crustáceos e na parede celular de alguns fungos. O processo de obtenção de quitosana a partir de resíduos de crustáceos envolve as etapas de desmineralização, desproteínização e despigmentação, para obtenção da quitina purificada, seguidos da desacetilação por meio de tratamento com soluções alcalinas concentradas e altas temperaturas (KUMAR *et al.*, 2019). Na desacetilação, os grupos N-acetil (-COCH₃) da quitina (Figura 1 A) são removidos resultando na formação de grupamentos amínicos livres (-NH₂), dando origem ao copolímero de N-acetil-glucosamina e D-glucosamina, ou quitosana (Figura 1 B) (KUMAR *et al.*, 2020).

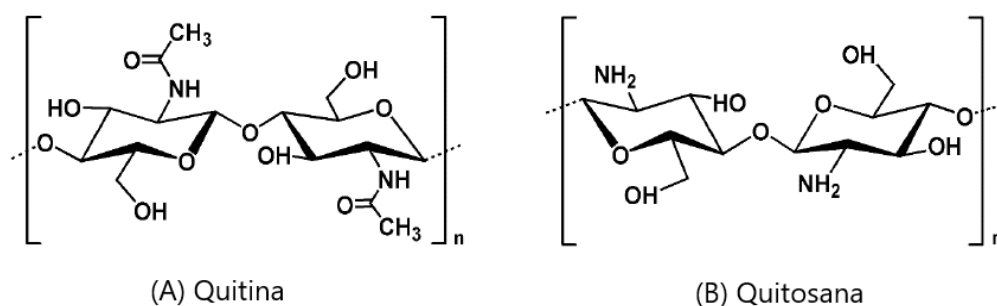


Figura 1. Estruturas químicas da quitina (A) e quitosana (B) (Adaptado de Kumar *et al.*, 2019).

O uso de quitina e seus derivados é justificável pelo seu menor custo de produção e por suas propriedades biocompatíveis e biológicas, como no controle de fungos, nematoides e vírus, sendo alternativa com grande potencial para uma agricultura sustentável e na adoção de uma nova abordagem frente à fitopatologia moderna (RAMÍREZ *et al.*, 2010). O controle de microrganismos patogênicos e deteriorantes com o uso da quitosana vem recebendo atenção desde a última década com aplicações em diversos setores, como farmacêutico, de alimentos, de tintas, têxtil, agrícola e no tratamento de água (AKTER *et al.*, 2018; KUMAR *et al.*, 2019, 2020).

A quitosana tem uso versátil e potencial como agente antimicrobiano, com utilidade na produção de filmes e revestimentos (COMA *et al.*, 2002; KUMAR *et al.*, 2020), sendo possível a sua associação ou mistura com outros biopolímeros, como alginato, carragena e pectina (polissacarídeos), caseína e gelatina (proteínas) ou lipídios, como forma de melhorar as propriedades funcionais dos materiais formados (KUMAR *et al.*, 2020).

A quitosana tem propriedades elicitoras que contribuem no controle das doenças fitopatogênicas (AL-TAWAHA; AL-GHZAWI, 2013; AKTER *et al.*, 2018) e por isso podem ser usadas no revestimento de sementes para reduzir danos às plântulas (HAAS *et al.*, 2018). As propriedades desses compostos desempenham importante função nas respostas de defesa nos tecidos das plantas (HEMANTARANJAN *et al.*, 2014) e na síntese de metabólitos secundários (MALERBA; CERANA, 2016). Dessa forma, a redução da vulnerabilidade a doenças pode justificar o uso da quitosana como revestimento, porém é primordial avaliar se o revestimento não promoverá uma redução no potencial fisiológico das sementes.

Devido a sua excelente capacidade de formação de filmes, a quitosana pode proporcionar uma proteção ao redor da superfície de sementes, minimizando perdas de nutrientes e fertilizantes e incrementando a eficiência do tratamento de sementes (ZENG *et al.*, 2010), uma vez que estes compostos podem ser incorporados na matriz polimérica e serem liberados no solo de forma lenta e controlada (KUSUMASTUTI *et al.*, 2019; CERRI *et al.*, 2020). A aplicação foliar da quitosana também tem sido proposta no controle de doenças em plantas, promovendo maior produtividade a diversas culturas (AKTER *et al.*, 2018) e contribuindo para a substituição ou redução do uso de fungicidas sintéticos (ZIANI *et al.*, 2010).

Embora o modo de ação da quitosana nas plantas não tenha sido completamente elucidado, as respostas biológicas promovidas pela sua utilização dependem tanto de sua composição química, como do tempo e taxa de aplicação (MALERBA; CERANA, 2016). Silva-Castro *et al.* (2018) estudaram revestimento de sementes de *Pinus* spp. com quitosana de baixa e média massa molar e sua associação com extrato etanólico de própolis e verificaram que tratamentos baseados em oligômeros de quitosana favoreceram a sobrevivência das plântulas, mediante a ativação de mecanismos de defesa evidenciados pela produção de compostos fenólicos e eliminação de radicais livres, sem afetar significativamente o percentual de germinação.

Silva Filho *et al.* (2021) afirmam que poucos são os trabalhos a respeito de alterações na fisiologia de sementes tratadas com quitosana, sendo relatados maior vigor quando a solução de quitosana é associada a aditivos químicos ou naturais (SILVA-CASTRO *et al.*, 2018) ou a microrganismos como *Trichoderma* spp. (CHANDRIKA *et al.*, 2019) e *Azospirillum brasilense* (VERCELHEZE *et al.*, 2019), embora comprovada sua ação antimicrobiana e seu potencial uso visando ao armazenamento a longo prazo. A antracnose em plantas de chilli (*C. capsici*) foi combatida sem o uso de fungicidas químicos, por meio do tratamento combinado de 1% de quitosana nas sementes e 0,5% de quitosana aplicado via foliar por spray, consistindo em medidas de controle mais sustentáveis (AKTER *et al.*, 2018).

Hirano *et al.* (1991), avaliando o crescimento de plântulas de pinheiro-preto (*Pinus thunbergii* Parl.) provenientes de sementes revestidas com quitosana despolimerizada, verificaram aumento de aproximadamente 1,5 vezes na atividade de quitinase em relação a sementes não recobertas. A expressão da enzima

quitinase pode ocorrer pela hidratação da semente, indicando a ativação de mecanismos de defesa da planta a estresses abióticos (SAMARAH *et al.*, 2020).

Carvalhais *et al.* (2018) estudaram o crescimento de plântulas de milho sob déficit hídrico por meio de condicionamento osmótico com quitosana (0,03 e 0,06% m/v) durante um período de 24 horas. Estes autores concluíram que o uso da quitosana reduziu os efeitos do déficit hídrico e gerou plântulas com maior biomassa seca, altura e comprimento de raiz em relação às plântulas não tratadas. Segundo Oliveira *et al.* (2009b), a maior absorção de água para a germinação de sementes revestidas com filmes poliméricos é favorável sob situações de estresse hídrico.

Viana *et al.* (2018), estudando a indução na tolerância à seca na germinação de sementes de milho, utilizando diferentes concentrações de quitosana em água e em polietilenoglicol em condicionamento fisiológico, verificaram que o índice de velocidade de germinação e o comprimento do sistema radicular não foram alterados quando o condicionamento foi realizado com solução aquosa de quitosana seguido da exposição das sementes em água. Al-Tawaha e Al-Ghzawi (2013) realizaram o condicionamento osmótico em sementes de lentilha sob diferentes graus de salinidade e concentrações de quitosana de 1, 3 e 6 g/L (pH 6,1) e verificaram maior porcentagem de germinação nas três concentrações testadas, principalmente com 3 g/L, independentemente da salinidade, o que se deve à maior tolerância adquirida a esse estresse abiótico após a exposição das sementes à quitosana.

Chandrika *et al.* (2019) obtiveram bons resultados na germinação e vigor de sementes de mamona revestidas com misturas de quitosana, polietilenoglicol e glicerol associadas a *Trichoderma* spp. Estes autores concluíram que essa solução filmogênica pode ser utilizada como revestimento das sementes, devido à atuação na regulação de trocas gasosas e de água, proteção do agente biológico e manutenção da germinação.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Material

Sementes de milho (*Zea mays* L.) comerciais da variedade Al-Piratininga provenientes da Coordenadoria de Desenvolvimento Rural Sustentável (CDRS, SP), e não tratadas previamente, foram armazenadas em local arejado e sem incidência direta de luz. Após realizados os tratamentos com quitosana, as sementes foram armazenadas em câmara fria a 10-12°C e umidade relativa a 30-40% até o início das avaliações. Para a solução de revestimento, foi utilizada quitosana proveniente da empresa Polymar® (Brasil) com massa molar média de $3,7 \times 10^5$ g/gmol e grau de desacetilação de 96,7%, ácido acético glacial (Synth®, Brasil) e glicerol (Synth®, Brasil). Os demais reagentes eram de grau analítico. O experimento foi desenvolvido na Universidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências Agrárias, no município de Araras (22°21'S e 47°27'O), SP, Brasil.

4.2 Avaliação das formulações à base de quitosana para revestimento das sementes de milho

Esta etapa teve como objetivo avaliar as formulações dos revestimentos de quitosana com melhores resultados para as sementes de milho em termos de potencial fisiológico. As variáveis independentes concentração de quitosana e concentração de glicerol foram estudadas através de um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2^2 com três repetições no ponto central e quatro pontos axiais, totalizando onze ensaios. O número de pontos axiais corresponde a $2 \times n$, onde “n” é o número de variáveis independentes. A distância dos pontos axiais, $\alpha = 1,41$, foi determinada pela Equação 1 (KHURI; CORNELL, 1987).

$$\alpha = (2^n)^{1/4} \quad (1)$$

Os níveis das variáveis independentes utilizados no planejamento experimental, definidos com base na literatura (IRISSIN-MANGATA *et al.*, 2001; PEÑA-DATOLI *et al.*, 2016) e em testes preliminares, estão apresentados na Tabela 1. A matriz de experimentos deste planejamento com os valores dos níveis reais e codificados das variáveis estudadas está apresentada na Tabela 2. As respostas

determinadas (variáveis dependentes) foram os aspectos físicos (análise visual do revestimento, teor de água e massa de 1000 sementes) e o potencial fisiológico (teste de germinação, índice de velocidade de germinação, comprimento de plântulas, teste de frio, emergência de plântulas, índice de velocidade de emergência de plântulas, altura de plântulas e massa de matéria seca de raiz e parte aérea) das sementes, cujos métodos de determinação estão descritos nos Itens 4.5 e 4.6. Os dados experimentais obtidos foram analisados por meio da Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) utilizando-se o *Software Statistica 7.0* (STATSOFT INC., 2004). Além dos tratamentos propostos, avaliou-se as respostas obtidas pelas sementes sem revestimento (controle).

Tabela 1. Variáveis e níveis utilizados no planejamento fatorial completo 2^2 com pontos axiais para a formulação do revestimento de quitosana.

	Variável	Nível				
		-1,41	-1	0	+1	+1,41
X_1	Concentração de quitosana (g/100 mL)	0,6	1,0	2,0	3,0	3,4
X_2	Concentração de glicerol (g/g quitosana)	0,0	0,09	0,30	0,51	0,60

Tabela 2. Matriz de experimentos do Planejamento Fatorial Completo 2^2 com pontos axiais para a formulação das coberturas de quitosana em sementes de milho.

Tratamento	X_1	X_2
T1	1,0 (-1)	0,09 (-1)
T2	3,0 (+1)	0,09 (-1)
T3	1,0 (-1)	0,51 (+1)
T4	3,0 (+1)	0,51 (+1)
T5	0,6 (-1,41)	0,30 (0)
T6	3,4 (+1,41)	0,30 (0)
T7	2,0 (0)	0,0 (-1,41)
T8	2,0 (0)	0,60 (+1,41)
T9	2,0 (0)	0,30 (0)
T10	2,0 (0)	0,30 (0)
T11	2,0 (0)	0,30 (0)

X_1 = Concentração de quitosana (g quitosana/100 mL), X_2 = concentração de glicerol (g glicerol/g quitosana). Valores entre parênteses são os níveis codificados das variáveis.

4.3 Preparo das soluções de quitosana para revestimento das sementes de milho

As soluções foram preparadas adicionando-se o glicerol (0 – 0,60 g/g quitosana) em solução aquosa de ácido acético (1,5% v/v) à temperatura ambiente sob agitação mecânica constante (1000 rpm) (Fisatom, modelo 713, Brasil) durante 3 minutos antes da adição da quitosana (0,6 – 3,4 g/100 mL). A solução foi mantida sob agitação mecânica constante durante 1 h, até completa dissolução do material.

O pH das soluções foi determinado em pHmetro (Digimed DM-22) à temperatura ambiente e ajustado a 4,7 (pH correspondente da solução de quitosana de concentração mais elevada) com hidróxido de sódio 1 mol/L adicionado gota a gota. As soluções foram mantidas em geladeira em recipientes de vidro fechados até utilização nas sementes.

4.4 Aplicação dos revestimentos nas sementes de milho

Dois métodos de revestimento das sementes foram testados, denominados método de aplicação 1 e 2.

Método de aplicação 1 – 20 mL de solução de quitosana de cada tratamento foram vertidos em placa de Petri de (150 x 15 mm) de forma a preencher o fundo da placa. Em seguida, 50 sementes de milho foram dispostas espaçadas entre si em aproximadamente 0,5 cm e recobertas com o restante do volume de solução (60 mL) até completa submersão. As placas foram mantidas em estufa por 24 horas a 38°C. Após a secagem, as sementes das placas de cada tratamento foram individualizadas e misturadas para uniformização.

Método de aplicação 2 – As sementes de milho foram imersas na solução de revestimento de cada tratamento com auxílio de pinça, retiradas imediatamente e 50 sementes foram dispostas em cada placa de Petri (150 x 15 mm), espaçadas entre si em aproximadamente 0,5 cm. Quatro placas de cada tratamento foram feitas, totalizando 200 sementes por tratamento. As placas foram mantidas em estufa durante seis horas a 38°C. Após a secagem, as sementes das placas de cada tratamento foram misturadas para uniformização.

4.5 Avaliação física das sementes após aplicação da quitosana

4.5.1 Aspecto visual do revestimento

Foram visualizadas 40 sementes por tratamento, observando-se o aspecto da quitosana aplicada à semente, a fim de avaliar características como aderência, homogeneidade e continuidade na cobertura. Para avaliar a continuidade do revestimento, as sementes foram imersas em solução de azul de metileno 1% (10 gotas do corante dissolvidas em 50 mL de água destilada) e retiradas imediatamente. Em seguida, foram imersas em álcool 70% duas vezes para retirada do excesso de corante e secas em papel-toalha. Foi elaborada uma tabela (Tabela 3) para verificar a presença ou não de coloração na região próxima da radícula (pedúnculo) e porcentagem de coloração no cotilédone e no endosperma das sementes em cada classe descrita. Considerando as porcentagens determinadas para cada tecido vegetal, as sementes foram agrupadas em quatro classes: Ausente (A), em que não houve coloração dos tecidos; Leve (L), em que o cotilédone apresentou coloração até <50% e uma ou ambas as faces do endosperma com coloração até 25-50%; Moderado (M), em que o cotilédone apresentou coloração $\geq 50\%$, ou cotilédone <50% e uma ou ambas as faces do endosperma com coloração >50%; e Intenso (I), em que foi observado 100% de coloração em todos os tecidos. Os resultados foram expressos em porcentagem de sementes para cada classe descrita.

Tabela 3. Classes de coloração das sementes de milho revestidas com quitosana.

Pedúnculo		Cotilédone			Endosperma (%)									
Sim	Não	(%)			Frente					Verso				
		0	<50	≥ 50	0	<25	25-50	>50	100	0	<25	25-50	>50	100

4.5.2 Teor de água

Amostras de todos os tratamentos foram mantidas por sete dias em câmara fria a 10-12°C e umidade relativa a 30-40% para estabilização e foram submetidas à determinação do teor de água pelo método da estufa a 105°C durante 24 horas, em triplicata. Os resultados foram expressos em porcentagem de água em base úmida (BRASIL, 2009a).

4.5.3 Massa de 1000 sementes

Após tratadas, foram pesadas em balança analítica 4 repetições de 100 sementes para cada tratamento e determinada a massa de 1000 sementes (BRASIL, 2009a). Em seguida, os valores de massa foram ajustados considerando um teor de água de 13% (CRIZEL *et al.*, 2015).

4.6 Avaliação do potencial fisiológico das sementes

4.6.1 Teste de germinação

Quatro repetições de 50 sementes de cada tratamento foram dispostas sobre duas folhas de papel tipo *Germitest* e cobertas com uma folha, sendo o papel previamente umedecido com volume de água correspondente a 2,5 vezes a massa do papel para a confecção dos rolos. Os rolos foram mantidos em câmara de germinação tipo BOD a 25°C por 7 dias. Foi considerada a porcentagem de germinação na primeira contagem, após 4 dias, e a porcentagem de germinação final, após 7 dias (BRASIL, 2009a).

4.6.1.1 Índice de Velocidade de Germinação (IVG): foi obtido junto com o teste de germinação, mediante a avaliação diária da germinação, pela Equação 2.

$$IVG = (G_1/T_1)+(G_2/T_2)+\dots+(G_i/T_i) \quad (2)$$

em que G_1 até G_i é o número de plântulas normais a cada dia e T_1 até T_i é o tempo (dias) (MAGUIRE, 1962).

4.6.1.2 Comprimento de plântulas: após a contagem final (7º dia), foi realizada medição de raiz e parte aérea das plântulas normais com auxílio de régua (precisão $\pm 0,1$ cm).

4.6.2 Teste de frio em rolo de papel com terra

Quatro repetições de 50 sementes de cada tratamento foram dispostas sobre duas folhas de papel tipo *Germitest* previamente umedecido com volume de água correspondente a 2,5 vezes a massa do papel, cobertas com fina camada de terra peneirada (60 mL) proveniente de área agriculturável e uma terceira folha para a

confeção dos rolos. Os rolos foram mantidos em sacos plásticos vedados em câmara de germinação tipo BOD a 10°C por 7 dias (CICERO; VIEIRA, 2020). Após o período de resfriamento, os rolos foram colocados sem a vedação em câmara BOD a 25°C e foi quantificada a porcentagem de plântulas normais após 7 dias.

4.6.3 Teste de emergência de plântulas

Para avaliar o crescimento das plântulas em terra, quatro repetições de 50 sementes de cada tratamento foram semeadas em bandejas de 30,3 x 22,1 x 7,5 cm preenchidas com areia grossa e terra argilosa peneirada proveniente de área agriculturável na proporção 2:1. Previamente à semeadura, foi quantificada a capacidade de campo (CC) do substrato colocando-se 200 mL de água sobre uma amostra da mistura de areia e terra disposta em filtro de pano, calculando-se a diferença entre o volume de água adicionado e o percolado. A semeadura foi feita a, no máximo, 1 cm de profundidade e as bandejas irrigadas com volume de água correspondente a 60% da CC (DIAS *et al.*, 2015). Foi avaliada a porcentagem de plântulas que emergiram a cada dia até a estabilização, que ocorreu aos 9 dias após semeadura, obtendo-se ao final o índice de velocidade de emergência.

4.6.3.1 Índice de Velocidade de Emergência (IVE): foi obtido mediante a avaliação de plântulas emergidas realizada diariamente, conforme Equação 3.

$$IVE = (E_1/T_1) + (E_2/T_2) + \dots + (E_i/T_i) \quad (3)$$

em que E_1 até E_i é o número de plântulas emergidas a cada dia e T_1 até T_i é o tempo (dias) (MAGUIRE, 1962).

4.6.3.2 Altura de plântulas: ao final do teste de emergência (9º dia), foi realizada a medição de altura das plântulas normais com auxílio de régua (precisão $\pm 0,1$ cm), considerando desde o nível do substrato até a extremidade da folha mais alta.

4.6.3.3 Massa de matéria seca de raiz e parte aérea: finalizado o teste de emergência, as plântulas foram retiradas das bandejas e lavadas, seguida de separação da semente, raiz e parte aérea. Raízes e parte aérea de cada tratamento

foram colocadas separadamente em sacos de papel e levadas à estufa a 65°C durante 4 dias. Após a secagem, foi realizada a pesagem do material em balança analítica (KRZYŻANOWSKI *et al.*, 2020).

4.7 Avaliação da sanidade das sementes

O teste de sanidade (*Blotter test*) foi adaptado do Manual de Análise Sanitária de Sementes (BRASIL, 2009b). Oito repetições de 25 sementes de milho revestidas com quitosana foram dispostas sobre 3 discos de papel filtro umedecido (volume de água equivalente a 2,5 vezes a massa do papel) em placas de Petri esterilizadas e mantidas vedadas em câmara BOD sob fotoperíodo de 12h a 20°C durante 7 dias. Após este período, as sementes foram examinadas em estereomicroscópio (30-80x) e, para confirmação da identificação, foi utilizado microscópio ótico (400x). Os resultados foram expressos em porcentagem de ocorrência dos fungos observados.

4.8 Forma de análise dos resultados

O experimento foi conduzido sob delineamento inteiramente casualizado. Os dados obtidos foram submetidos a Análise de Variância (ANOVA), ao nível de 5% de probabilidade, seguido de aplicação de teste de comparação de médias de Tukey ($p < 0,05$), para determinar diferenças significativas entre as médias, por meio do software *Statistica V.7* (STATSOFT INC., 2004). A comparação de médias para o teste de sanidade (*Blotter test*) foi realizada por meio do teste t-Student ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Definição dos níveis das variáveis estudadas

Em testes preliminares foi possível verificar a faixa de concentração de quitosana que resultava em soluções com viscosidades adequadas para garantir a cobertura da semente. O processo de revestimento envolve o umedecimento da superfície do material e espalhamento da solução de cobertura, seguido da possível adesão (CASARIEGO *et al.*, 2008). Observou-se que acima de 3,4% a solução ficava excessivamente viscosa dificultando a imersão e revestimento das sementes pela solução. Abaixo de 0,6% a solução era muito fluida, dificultando a adesão na superfície da semente. Logo, optou-se por avaliar a faixa entre 0,6 e 3,4% m/v.

Apesar de ótima habilidade da quitosana em formar filmes e coberturas, estes tendem a ser quebradiços. A rigidez da matriz polimérica é principalmente determinada pela força das interações polímero-polímero, as quais podem ser controladas pela adição de um plastificante (RODRÍGUEZ-NÚÑEZ *et al.*, 2014). Plastificantes são moléculas de baixa massa molar, tais como polióis (glicerol, sorbitol e polietilenoglicol), que penetram e se intercalam entre as cadeias poliméricas estabelecendo ligações de hidrogênio com os grupos reativos do polímero, aumentando a sua flexibilidade e permeabilidade ao vapor de água e a gases dos filmes (KIM *et al.*, 2008). O glicerol, um dos plastificantes mais utilizados, é uma molécula hidrofílica de baixa massa molar que pode facilmente se encaixar entre as cadeias poliméricas e reduzir as interações intermoleculares, uma vez que estas ocorrerão preferencialmente entre os grupos OH do glicerol e os grupos hidroxílicos e amínicos da quitosana (PAVINATTO *et al.*, 2020; WAHBA, 2020). Estudos demonstram que a concentração e o tipo de plastificante afetam as propriedades dos filmes e coberturas (RODRÍGUEZ-NÚÑEZ *et al.*, 2014; WAHBA, 2020), e as concentrações geralmente variam entre 0 e 60 g/100g de massa seca dependendo da rigidez do polímero, sendo esta a faixa estudada no presente trabalho.

5.2 Método de aplicação da solução de revestimento nas sementes

Em relação aos dois métodos de aplicação da solução de quitosana para revestimento das sementes, observou-se que o método de aplicação 1, em que as sementes permaneciam imersas na solução durante todo o período de secagem, promoveu um revestimento eficiente das sementes uma vez que a solução secava diretamente em contato com a superfície da semente formando um filme contínuo ao redor das mesmas (Figura 2). Porém, percebeu-se que este método inviabilizou a germinação de sementes (avaliado por meio do teste de germinação).



Figura 2. Filmes de quitosana/glicerol dos tratamentos T7 (2,0/0) (A) e T8 (2,0/0,30) (B) em sementes de milho (método de aplicação 1).

O tempo prolongado de exposição das sementes à solução (acima de 12 horas), devido à lentidão na secagem da matriz polimérica no método 1, pode ter provocado o início da germinação e a transição para a fase II do padrão trifásico de hidratação da semente (BEWLEY; BLACK, 1985).

A germinação tem início com a embebição da semente, de modo que um nível de hidratação adequado permite a ativação dos processos metabólicos associados ao processo germinativo (FONSECA; PEREZ, 2003). O decréscimo da germinação pode ser ocasionado pelo excesso de umidade, devido ao impedimento na entrada de oxigênio, ou por uma rápida embebição que leva ao atraso ou impedimento da germinação (BARROS NETO *et al.*, 2014).

A fase I do padrão trifásico consiste na ativação de mecanismos para reparação de danos decorrentes de processos anteriores, como maturação, secagem e armazenamento, ao passo que na fase II a embebição promove aumento da respiração das sementes e reorganização das membranas para mobilização de reservas e entrada de água para alongamento do embrião (MARCOS-FILHO, 2015b).

A fase I da curva de absorção de água para milho finaliza, em média, 12 horas após a hidratação das sementes (PRAZERES; COELHO, 2017). Como o período de embebição das sementes até a completa secagem na matriz polimérica se prolongou por 24 horas, os mecanismos de reparo das membranas podem não ter retornado ao estado cristalino-líquido, como descrito por Oliver *et al.* (1998), diminuindo o potencial de tolerância das sementes à dessecação e inviabilizando as sementes.

Por essa razão, optou-se por adotar um segundo método de revestimento que consistia na imersão das sementes na solução de quitosana com posterior retirada e secagem das sementes em placa de Petri (método de aplicação 2). Assim, todos os resultados apresentados a seguir referem-se às sementes submetidas a este procedimento (Figura 3).

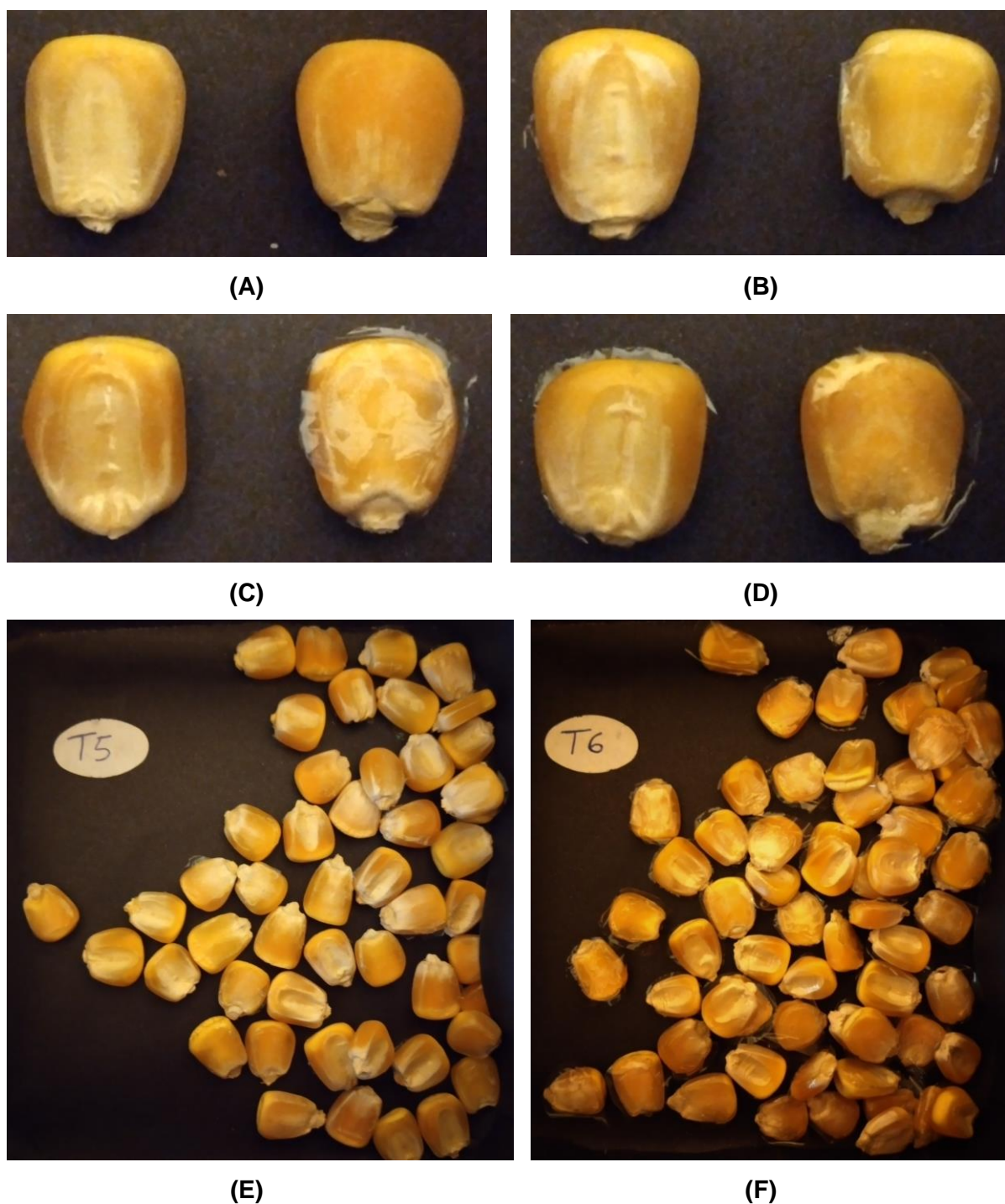


Figura 3. Sementes de milho revestidas (método de aplicação 2) com filmes de quitosana/glicerol em diferentes concentrações. Controle (A); T5 (0,6/0,30) (B); T4 (3,0/0,51) (C) e T6 (3,4/0,30) (D) e grupos de sementes dos tratamentos T5, com menor concentração de quitosana (E) e T6, com maior concentração de quitosana (F).

5.3 Avaliação física das sementes após aplicação de quitosana

5.3.1 Aspecto visual do revestimento

O aspecto visual das sementes revestidas pelas soluções de quitosana pode ser observado na Tabela 4 e na Figura 4. Pelo teste de coloração das sementes com solução de azul de metileno é possível atestar a presença e efetividade do revestimento, comparando com as sementes sem revestimento (controle), que ficavam completamente coloridas.

Tabela 4. Classificação do aspecto visual das sementes revestidas com quitosana (método de aplicação 2) de acordo com a intensidade de coloração.

Tratamento (quit/glicerol)	Aspecto visual (%)			
	A	L	M	I
T1 (1/0,09)	0	52,5	47,5	0
T2 (3/0,09)	2,5	77,5	20,0	0
T3 (1/0,51)	0	60,0	40,0	0
T4 (3/0,51)	0	82,5	17,5	0
T5 (0,6/0,30)	0	37,5	62,5	0
T6 (3,4/0,30)	0	72,5	27,5	0
T7 (2/0)	0	62,5	37,5	0
T8 (2/0,60)	0	85,0	15,0	0
T9 (2/0,30)	0	72,5	27,5	0
T10 (2/0,30)	0	70,0	30,0	0
T11 (2/0,30)	0	77,5	22,5	0
Controle	0	0	0	100,0

A: ausente; L: leve; M: moderado; I: intenso.

Os resultados indicam que os tratamentos com maior concentração de quitosana (T2, T4, T6) e o T8, apresentaram melhor qualidade do revestimento de sementes de milho, tendo em vista a maior porcentagem de sementes classificadas como levemente coloridas. Revestimentos com menores concentrações de quitosana (T1, T3, T5) apresentaram percentuais mais elevados de sementes moderadamente coloridas, o que pode indicar maiores falhas no revestimento no entorno da semente. Apenas o controle apresentou 100% das sementes avaliadas

na classe de coloração Intenso (I). Dessa forma, é possível afirmar que todos os tratamentos com quitosana revestiram as sementes em maior ou menor grau.

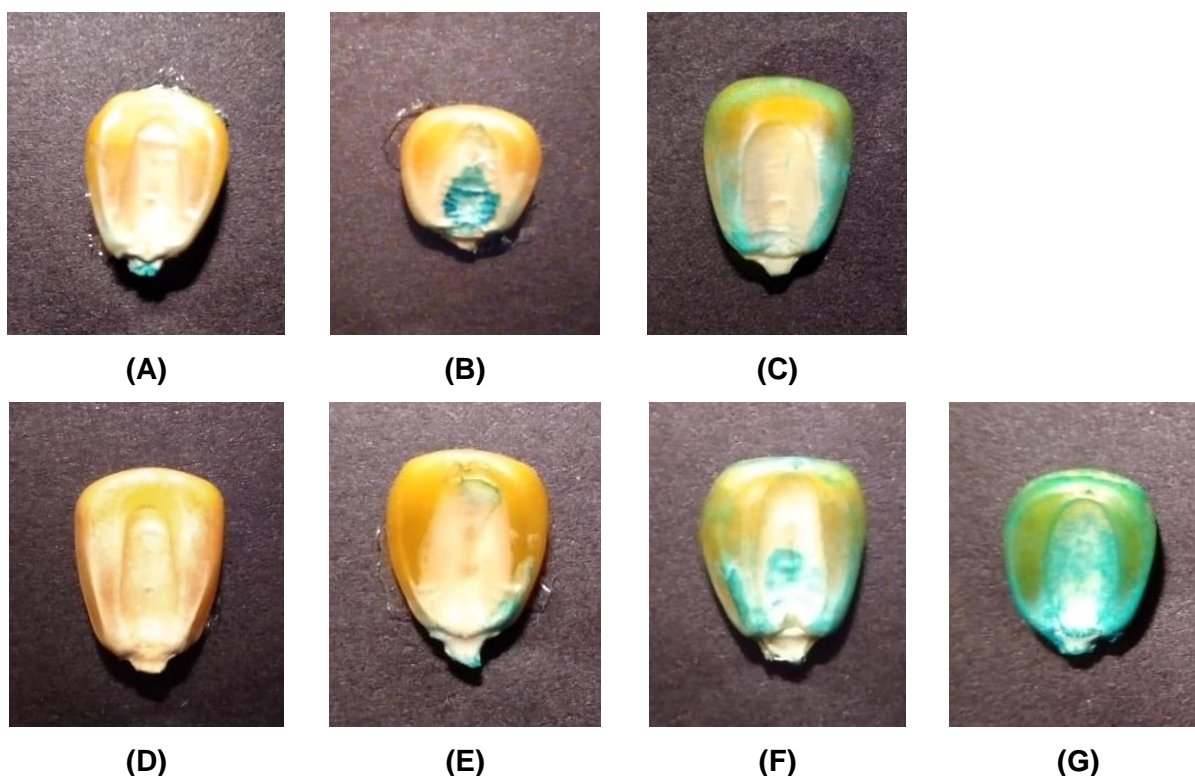


Figura 4. Intensidade de coloração no pedúnculo (A), cotilédone (B) e endosperma (C) de sementes de milho revestidas com quitosana (método de aplicação 2), classificada em A: ausente (D); L: leve (E); M: moderado (F); I: intenso (G). Controle (G).

5.3.2 Teor de água e massa de 1000 sementes

A Tabela 5 apresenta os resultados do teor de água e massa de 1000 sementes para os tratamentos e o controle. Observa-se que os tratamentos T4 e T6, que tinham as maiores concentrações de quitosana e glicerol, foram os que apresentaram os maiores teores de água, diferindo significativamente ($p < 0,05$) em relação ao controle. Isso pode estar relacionado com a característica hidrofílica da quitosana e do glicerol, proporcionando uma maior absorção e retenção de moléculas de água na matriz formada ao redor da semente. A característica hidrofílica do glicerol provoca o afrouxamento das forças intermoleculares poliméricas, promovendo maior capacidade de ligação com a água (SILVA, 2009). Em tecnologia de sementes, o teor de água tem importância fundamental, uma vez que teores baixos (até 12% aproximadamente) são adequados às condições de armazenamento de sementes ortodoxas (maior tolerância à dessecação), como o milho (ASAE, 1980). Teores de água acima dos limites tolerados para cada espécie

podem levar a uma maior propensão das sementes à colonização por fungos de armazenamento, como *Penicillium* spp. e *Aspergillus* spp., comprometendo a qualidade do material e levando à ocorrência de micotoxinas (DOMIN *et al.*, 2020). Em função dos resultados, os teores de água obtidos para todos os tratamentos estão em níveis adequados ao armazenamento das sementes.

Quanto à massa de 1000 sementes, esses mesmos tratamentos, apesar de apresentarem tendência semelhante ao teor de água, ou seja, de aumento com o aumento da concentração de quitosana e glicerol, não diferiram significativamente em relação ao controle.

Tabela 5. Resultados de teor de água e massa de 1000 sementes para os revestimentos à base de quitosana em sementes de milho.

Tratamento (quit/glicerol)	Teor Água (gH ₂ O/100g)*	Massa 1000 sementes (g)**
T1 (1,0/0,09)	10,20 ± 0,1 ^{abc}	426,5 ± 7,7 ^a
T2 (3,0/0,09)	10,07 ± 0,1 ^{bc}	432,0 ± 3,4 ^a
T3 (1,0/0,51)	10,01 ± 0,3 ^c	434,4 ± 3,0 ^a
T4 (3,0/0,51)	10,62 ± 0,1 ^a	438,4 ± 3,4 ^a
T5 (0,6/0,30)	10,35 ± 0,2 ^{abc}	429,4 ± 3,5 ^a
T6 (3,4/0,30)	10,49 ± 0,2 ^{ab}	433,9 ± 6,0 ^a
T7 (2,0/0)	10,30 ± 0,2 ^{abc}	431,6 ± 5,7 ^a
T8 (2,0/0,60)	10,15 ± 0,1 ^{bc}	433,8 ± 3,4 ^a
T9 (2,0/0,30)	10,13 ± 0,2 ^{bc}	429,4 ± 3,1 ^a
T10 (2,0/0,30)	10,16 ± 0,2 ^{abc}	429,2 ± 4,1 ^a
T11 (2,0/0,30)	10,01 ± 0,1 ^c	433,2 ± 8,0 ^a
Controle	9,96 ± 0,1 ^c	427,5 ± 4,1 ^a

Média ± desvio padrão de 3* e 4** determinações experimentais; letras iguais na coluna indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias pelo teste de Tukey.

Os efeitos das variáveis independentes sobre as respostas teor de água e massa de 1000 sementes podem ser visualizados nos gráficos de Pareto e superfícies de resposta das Figuras 5 e 6, respectivamente. Observa-se que na faixa estudada, para um intervalo de confiança de 95%, o termo de interação das variáveis concentração de quitosana e concentração de glicerol apresentou efeito significativo no teor de água, indicando que o comportamento da concentração de quitosana é influenciado pela concentração de glicerol (e vice-versa). O efeito foi

positivo indicando que um aumento na concentração de quitosana de 0,6 para 3,4% e glicerol de 0 para 0,60 g/g quitosana tendem a aumentar o teor de água. Por outro lado, somente o termo linear da concentração de glicerol apresentou efeito significativo e positivo na massa de 1000 sementes.

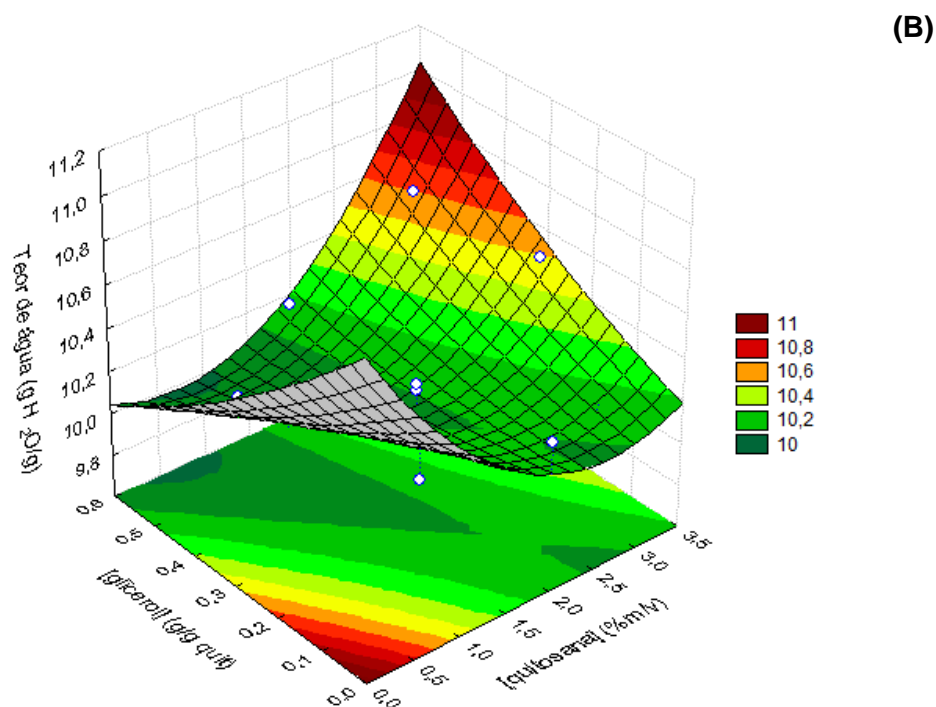
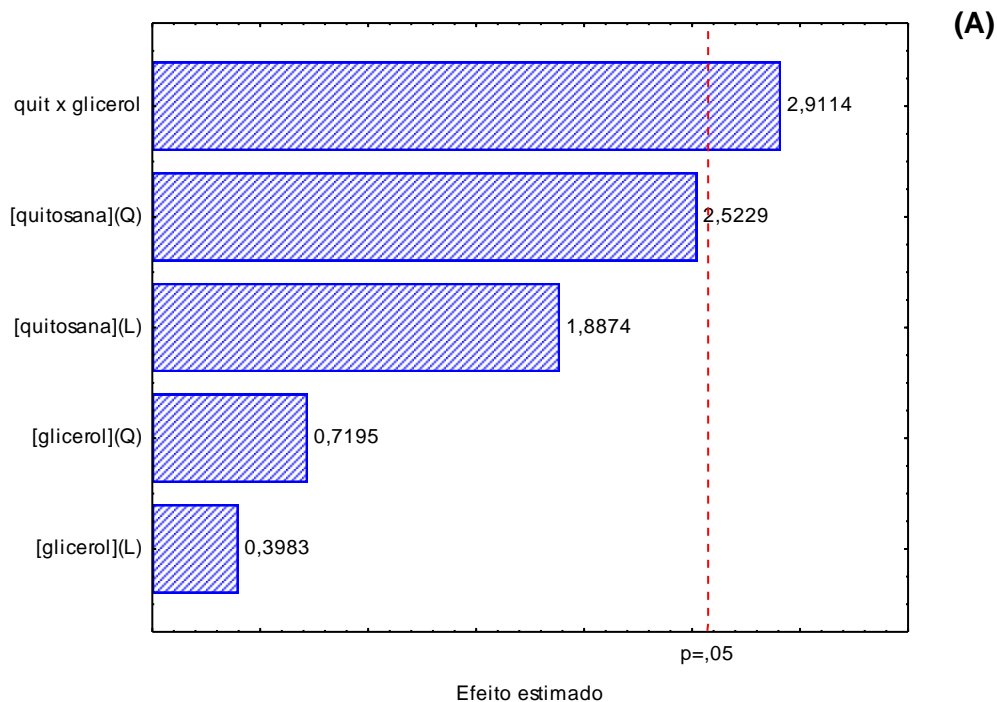


Figura 5. Gráfico de Pareto (A) e superfície de resposta (B) para o efeito das variáveis concentração de quitosana e concentração de glicerol no teor de água.

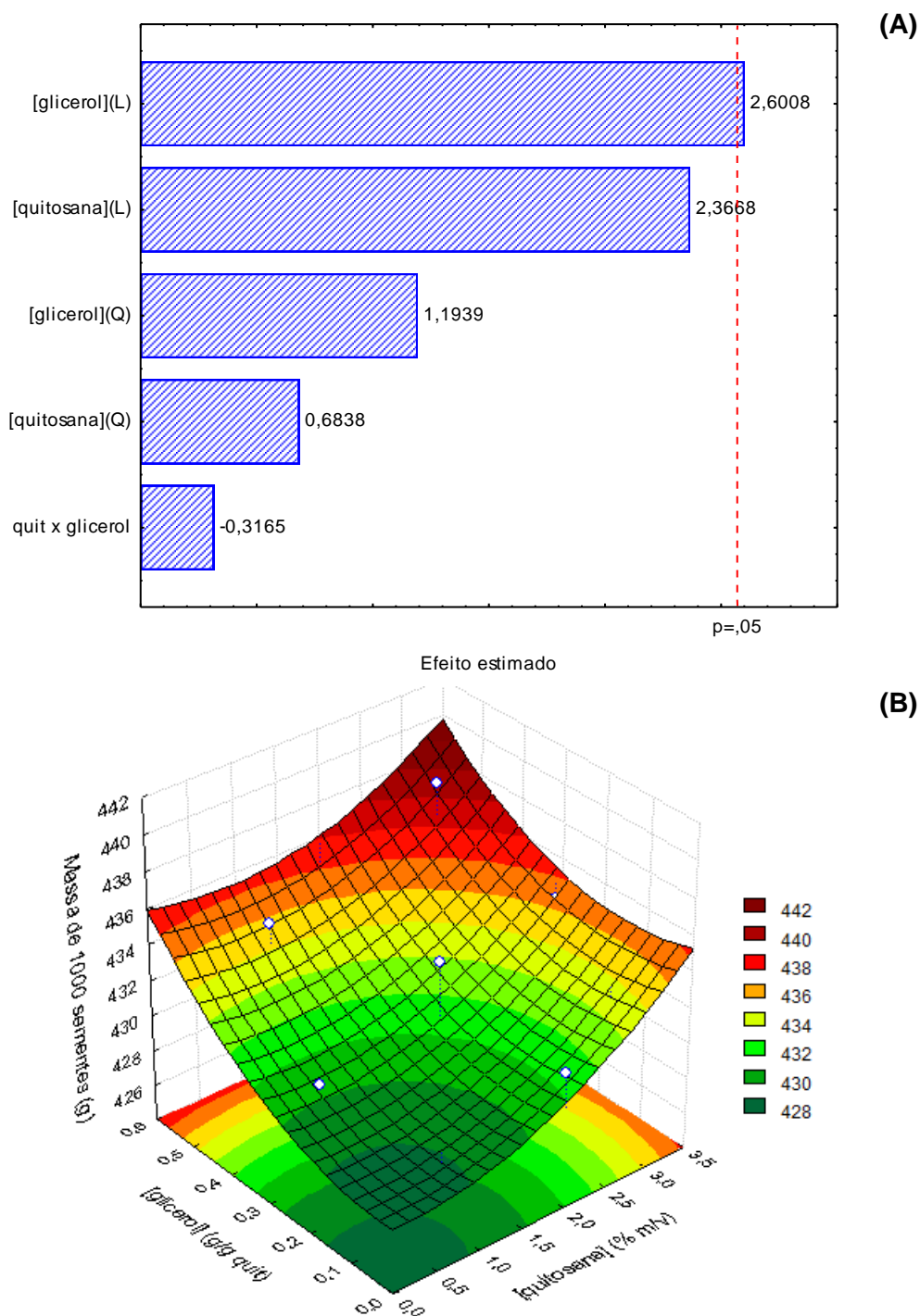


Figura 6. Gráfico de Pareto (A) e superfície de resposta (B) para o efeito das variáveis concentração de quitosana e concentração de glicerol na massa de 1000 sementes.

5.4 Avaliação do potencial fisiológico das sementes

Os valores obtidos para germinação foram considerados altos (>90,0%), como observado no controle (Tabela 6).

5.4.1 Germinação (1ª contagem e final), IVG, comprimento de raiz, comprimento de parte aérea e comprimento total de plântulas

A Tabela 6 contém os resultados obtidos nos ensaios de germinação, índice de velocidade de germinação e comprimento das plântulas (raiz, parte aérea e total) para os diferentes tratamentos e o controle. Embora o tratamento T6 (3,4/0,30) tenha sido prejudicado na primeira contagem, percebe-se que não houve diferença significativa na germinação das sementes entre o controle e os demais tratamentos com os revestimentos de quitosana, tanto para a primeira contagem quanto para a contagem final. Esse resultado é positivo, uma vez que possibilita o uso dos revestimentos de quitosana sem afetar a viabilidade.

No caso do milho, a germinação da semente é uma etapa crítica, pois durante esse período a plântula fica susceptível a agentes externos e condições edafoclimáticas adversas devido a seu reduzido sistema radicular e área foliar escassa. Lizárraga-Paulín *et al.* (2013) também não observaram diferença significativa na germinação de sementes de milho com o revestimento com quitosana (2%). Ziani *et al.* (2010) avaliaram o efeito de coberturas de quitosana em concentrações de 3 e 4% m/v e com e sem adição de Span 80 (surfactante) em sementes de alcachofra e apontaram que, de maneira geral, os tratamentos com quitosana não interferiram no percentual de germinação das sementes em relação ao controle. No entanto, os autores verificaram que quando o tratamento com quitosana foi associado ao fungicida TMTD (dissulfeto de tetrametiltiuram) a porcentagem de germinação tendeu a aumentar, de forma que a combinação da quitosana com o fungicida em baixas concentrações resultou em um forte efeito protetor, com boa germinação e desempenho de plântulas, indicando um potencial de uso da quitosana para redução das quantidades de fungicidas. Em um trabalho recente, Mohamed *et al.* (2020) observaram que sementes de milho revestidas com soluções de quitosana 0,25% e 0,5% apresentaram maior percentual de germinação e tamanho das plântulas em relação ao controle (sem revestimento).

Porém, em termos de velocidade de germinação, observa-se que todos os tratamentos tenderam a apresentar índices menores comparados ao controle, exceto T8 (2,0/0,60), T9 (2,0/0,30) e T10 (2,0/0,30), que não diferiram do controle. O menor valor de IVG foi obtido para o tratamento que continha a maior concentração de quitosana. Este efeito também foi observado por Peña-Datoli *et al.* (2016), que testaram revestimentos de quitosana em concentrações de 1, 3 e 5%. Os autores

relatam que esse efeito sobre a velocidade de germinação pode ser explicado pela barreira física imposta pelo revestimento em maiores concentrações, fazendo com que as sementes levem mais tempo para germinar, embora não tenham verificado interferência da quitosana no vigor e na germinação de sementes de milho.

Tabela 6. Resultados de germinação (1ª contagem e contagem final), índice de velocidade de germinação (IVG), comprimento de raiz, de parte aérea e comprimento total de plântulas para os revestimentos à base de quitosana em sementes de milho.

Tratamento (quit/glicerol)	Germinação (%)		IVG	Comprimento (cm)		
	1ª C.	C. Final		Raiz	P. Aérea	Total
T1 (1,0/0,09)	94,0 ± 1,6 ^a	98,5 ± 1,9 ^a	14,6 ± 0,3 ^{bcd}	10,9 ± 0,5 ^{ab}	6,7 ± 0,7 ^{ab}	17,6 ± 1,2 ^{ab}
T2 (3,0/0,09)	95,0 ± 2,6 ^a	97,0 ± 2,0 ^a	14,2 ± 0,4 ^{cde}	12,4 ± 0,2 ^a	7,2 ± 0,2 ^a	19,6 ± 0,3 ^a
T3 (1,0/0,51)	94,5 ± 3,4 ^a	99,5 ± 1,0 ^a	14,4 ± 0,5 ^{bcde}	9,4 ± 0,5 ^{bc}	6,5 ± 0,7 ^{ab}	15,9 ± 1,1 ^{bc}
T4 (3,0/0,51)	94,5 ± 2,5 ^a	98,0 ± 1,6 ^a	14,0 ± 0,4 ^{def}	7,5 ± 0,7 ^d	6,1 ± 0,3 ^b	13,6 ± 0,8 ^d
T5 (0,6/0,30)	90,0 ± 2,0 ^a	97,3 ± 2,3 ^a	13,2 ± 0,1 ^{fg}	7,7 ± 0,2 ^{cd}	6,1 ± 0,3 ^b	13,8 ± 0,2 ^{cd}
T6 (3,4/0,30)	81,5 ± 2,5 ^b	94,5 ± 1,9 ^a	12,6 ± 0,3 ^g	8,1 ± 0,1 ^{cd}	6,5 ± 0,4 ^{ab}	14,6 ± 0,4 ^{cd}
T7 (2,0/0)	89,0 ± 2,6 ^a	94,0 ± 1,6 ^a	13,6 ± 0,3 ^{ef}	8,7 ± 0,8 ^{cd}	6,6 ± 0,2 ^{ab}	15,3 ± 0,9 ^{cd}
T8 (2,0/0,60)	90,5 ± 5,0 ^a	97,5 ± 3,8 ^a	15,0 ± 0,5 ^{abc}	7,6 ± 1,2 ^{cd}	6,1 ± 0,1 ^b	13,7 ± 1,2 ^{cd}
T9 (2,0/0,30)	91,5 ± 5,0 ^a	98,0 ± 2,8 ^a	14,7 ± 0,4 ^{abcd}	8,5 ± 0,8 ^{cd}	6,1 ± 0,2 ^b	14,6 ± 0,9 ^{cd}
T10 (2,0/0,30)	94,5 ± 1,0 ^a	98,5 ± 1,9 ^a	15,2 ± 0,2 ^{ab}	8,2 ± 1,0 ^{cd}	5,9 ± 0,1 ^b	14,1 ± 1,1 ^{cd}
T11 (2,0/0,30)	92,0 ± 2,8 ^a	98,0 ± 0,0 ^a	14,6 ± 0,2 ^{bcd}	8,1 ± 0,8 ^{cd}	6,2 ± 0,1 ^b	14,3 ± 1,0 ^{cd}
Controle	95,5 ± 2,5 ^a	97,0 ± 3,5 ^a	15,6 ± 0,4 ^a	12,6 ± 0,8 ^a	6,2 ± 0,2 ^b	18,8 ± 0,9 ^a

Média ± desvio padrão de 4 determinações experimentais; letras iguais na coluna indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias pelo teste de Tukey.

Para as faixas de concentração de quitosana e glicerol estudadas, não se observou efeito significativo na germinação (contagem final), conforme pode ser visto na Tabela 6 e nos gráficos de Pareto da Figura 7 A e B, respectivamente, indicando que qualquer concentração poderia ser usada considerando a manutenção da viabilidade das sementes. A redução ($p < 0,05$) observada no tratamento T6 (3,4/0,30) aponta para uma influência da maior concentração de quitosana na 1ª contagem, todavia a germinação foi recuperada na contagem final.

Porém, conforme esperado, o IVG foi influenciado negativamente pelo aumento da concentração de quitosana de 0,6 para 3,4% (Figura 8A). A superfície de resposta obtida indica que os maiores valores de IVG são obtidos em concentração intermediária de quitosana e maiores concentrações de glicerol (Figura 8B). No entanto, não foram observadas diferenças significativas no IVG pelo teste de Tukey (Tabela 6) entre tratamentos com mesma concentração de quitosana e diferentes concentrações de glicerol, exceto em T7 (2,0/0), em que a ausência de glicerol levou a menor IVG.

O comprimento de raiz e comprimento total foram significativamente menores que o controle em todos tratamentos, exceto em T1 (1,0/0,09) e T2 (3,0/0,09). Somente o tratamento T2 (3,0/0,09) apresentou maior comprimento de parte aérea em comparação ao controle e aos demais tratamentos ($p < 0,05$) (Tabela 6). Isso demonstra que, apesar da menor velocidade de germinação das sementes revestidas com quitosana, o desenvolvimento da plântula não foi afetado em concentrações de até 3% de quitosana com baixa concentração de glicerol. O efeito das variáveis concentração de quitosana e concentração de glicerol, nas faixas estudadas, no comprimento das plântulas pode ser observado nos gráficos de Pareto das Figuras 9 A, B e 10 A. Em um intervalo de confiança de 95%, o termo linear da concentração de glicerol apresentou efeito significativo negativo no comprimento da parte aérea, indicando que o aumento da concentração de glicerol de 0 até 0,60 g/g quitosana tendeu a diminuir no comprimento da parte aérea das plântulas (Figura 10 A e B).

Estes resultados indicam que a baixa concentração de glicerol proporcionou a manutenção do comprimento de raiz, independentemente da concentração de quitosana (Tabela 6). Supõe-se que pode ter havido um efeito tóxico do glicerol em maiores concentrações para o parâmetro comprimento de parte aérea (Figura 10 A), porém este efeito precisaria ser melhor investigado, uma vez que não se verificou diferenças ($p < 0,05$) entre os tratamentos e o controle, à exceção de T2.

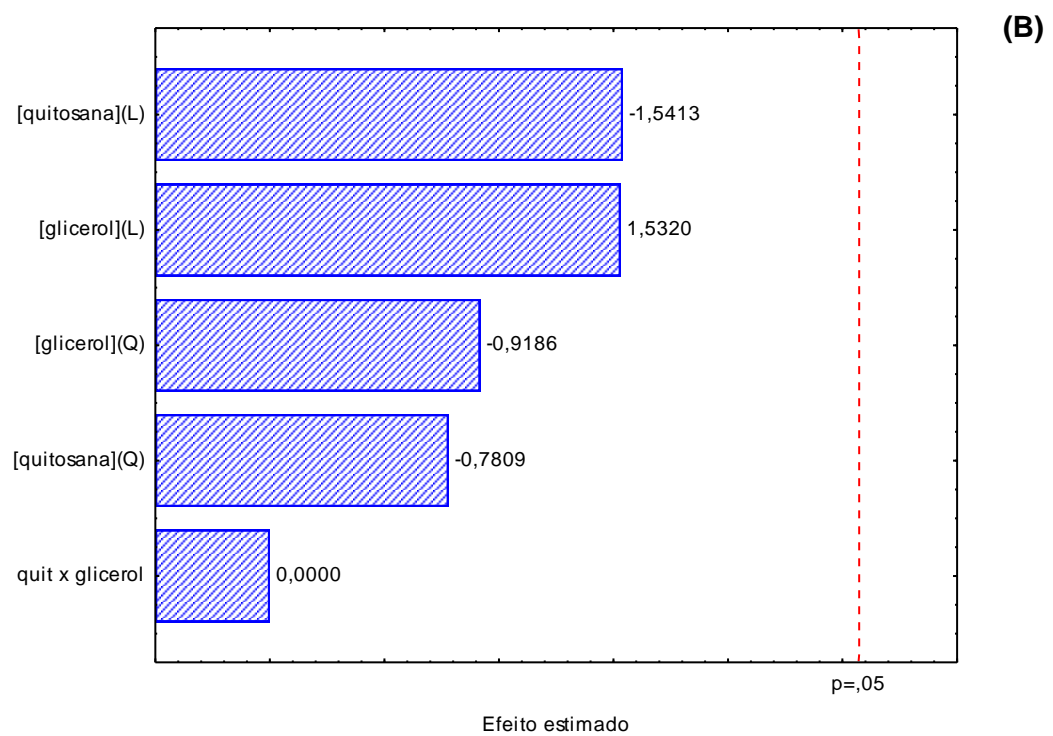
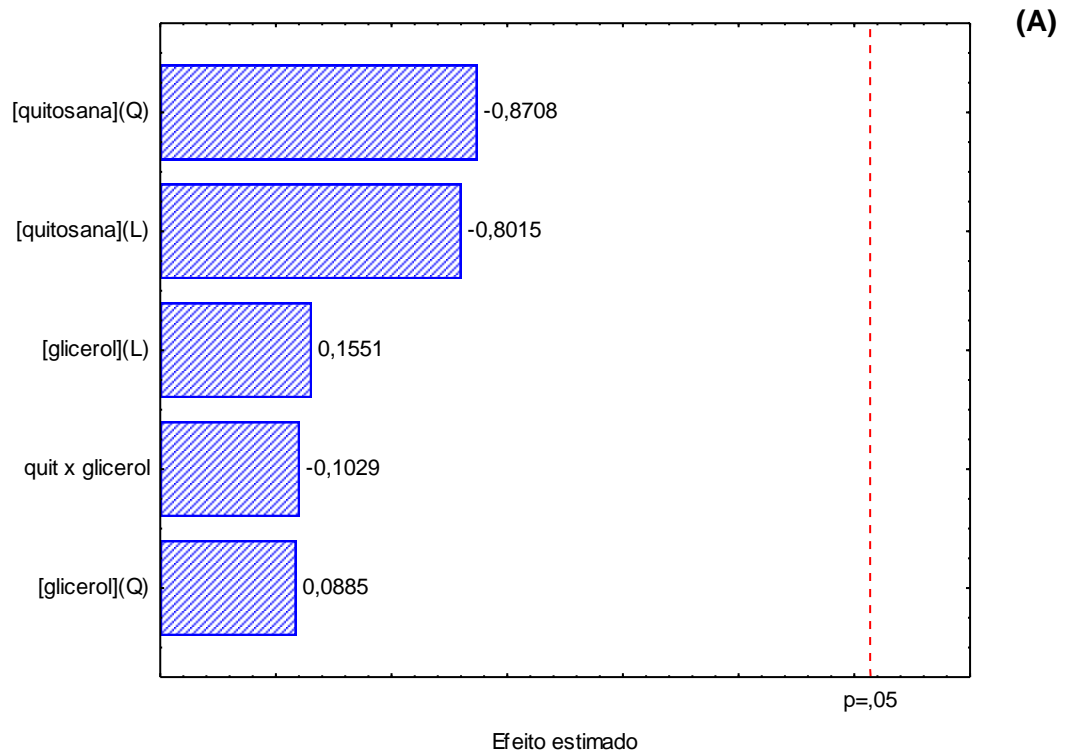


Figura 7. Gráficos de Pareto para o efeito das variáveis concentração de quitosana e concentração de glicerol na germinação: (A) 1º e (B) 2º contagem.

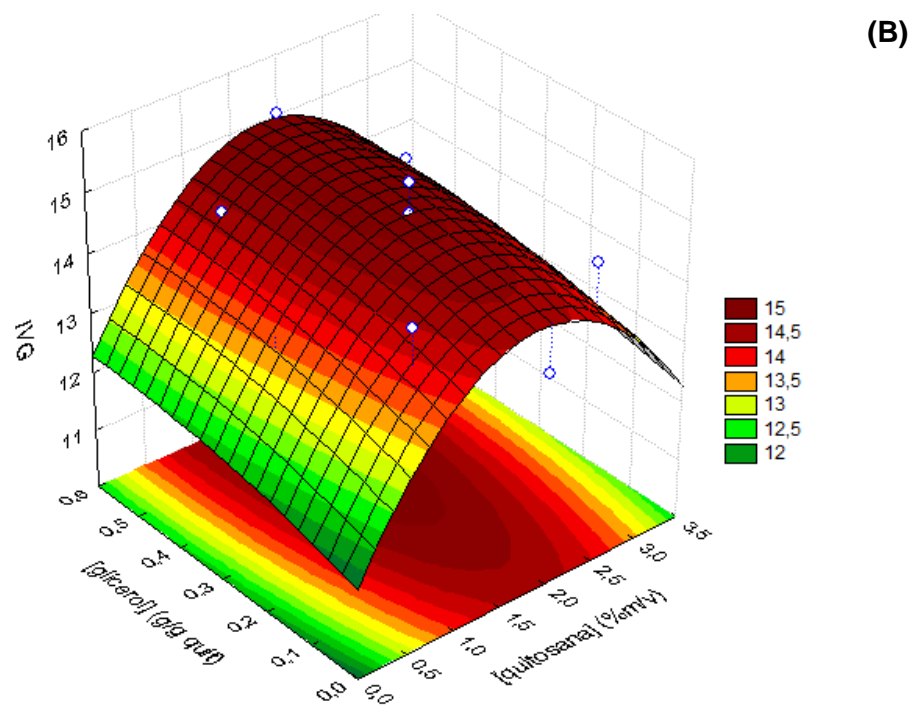
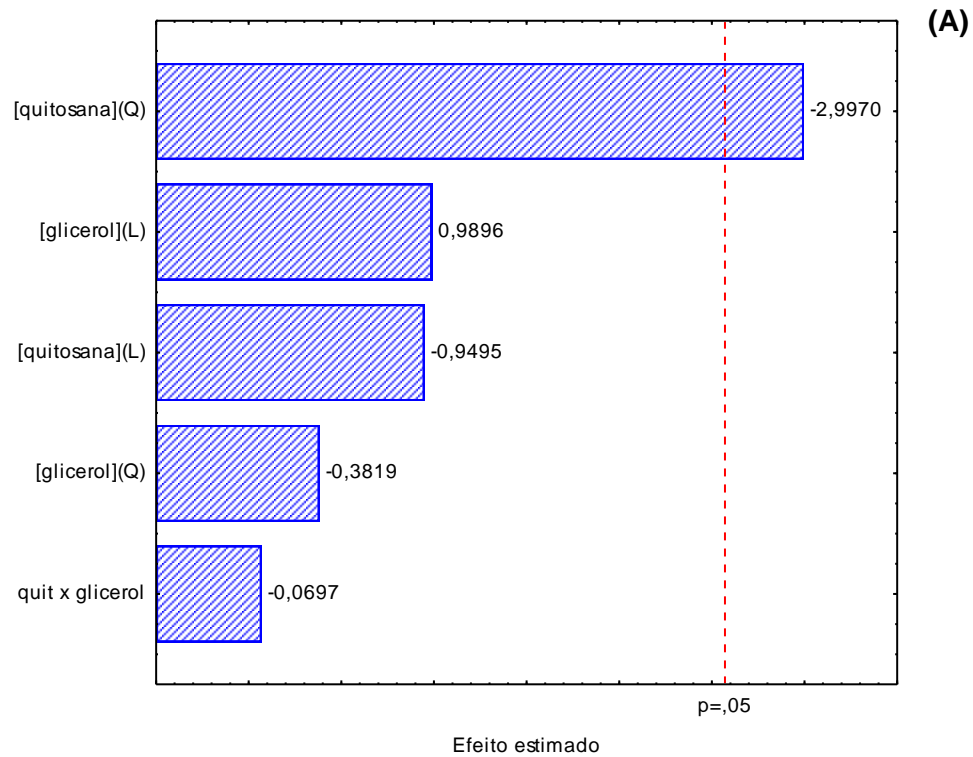


Figura 8. Gráfico de Pareto (A) e superfície de resposta (B) para o efeito das variáveis concentração de quitosana e concentração de glicerol no Índice de Velocidade de Germinação (IVG).

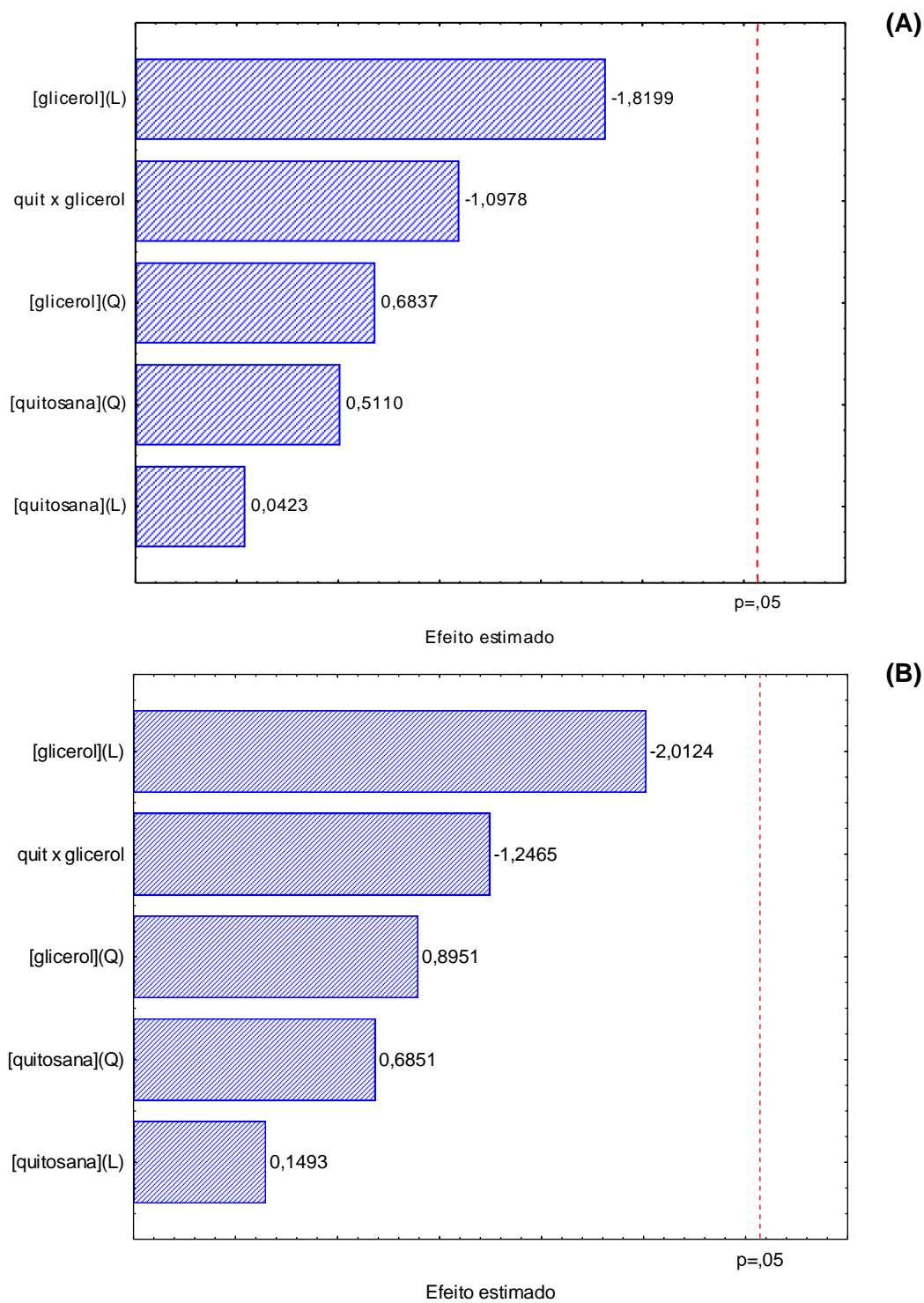


Figura 9. Gráficos de Pareto para o efeito das variáveis concentração de quitosana e concentração de glicerol nos comprimentos da raiz (A) e total (B).

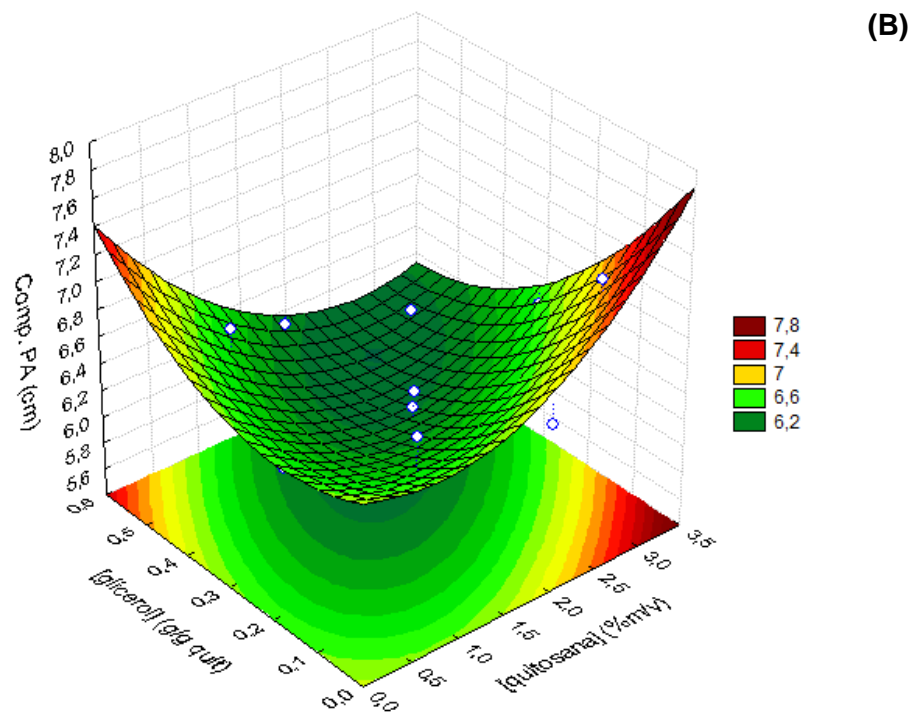
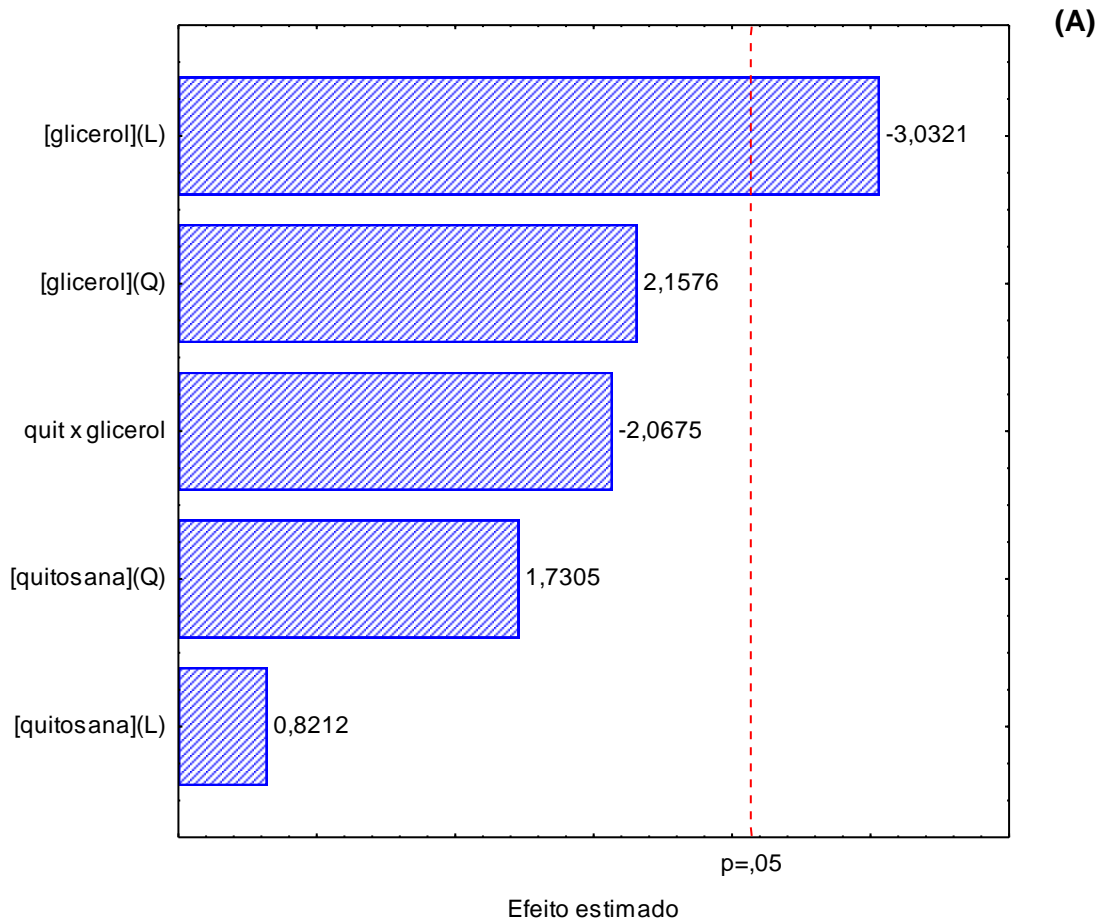


Figura 10. Gráfico de Pareto (A) e superfície de resposta (B) para o efeito das variáveis concentração de quitosana e concentração de glicerol no comprimento da parte aérea.

Viana *et al.* (2018), estudando os efeitos de concentrações de quitosana (0; 0,15; 0,30 e 0,45% m/v) no condicionamento fisiológico de sementes de milho, expostas durante um minuto à solução de quitosana e posteriormente às condições de água e polietilenoglicol (PEG), não verificaram alterações no índice de velocidade de germinação (IVG) em água.

O condicionamento osmótico, por sua vez, é uma técnica que favorece as condições para expressão da germinação e do vigor de sementes por meio da hidratação controlada em soluções com potenciais hídricos negativos, como o polietilenoglicol e o glicerol, que possibilitam uma entrada mais lenta de água nas sementes, sem que ocorra protusão da raiz primária (MARCOS-FILHO, 2015b), assim a mistura quitosana/glicerol torna-se uma opção interessante no revestimento de sementes, embora no presente trabalho não se tenha realizado esta técnica, e sim uma imersão instantânea das sementes na solução de revestimento.

Martins (2016), avaliando o efeito de diferentes concentrações de quitosana (0,005; 0,015; 0,03; 0,06; 0,12 e 0,24% m/v) em sementes de milho expostas durante 48h sobre folhas de papel filtro umedecidas com a solução, verificou maior porcentagem de germinação em altas concentrações, sugerindo que a quitosana não apresenta efeito tóxico para o milho e que sua aplicação levou a modificações anatômicas relacionadas à sobrevivência e proteção contra estresses ambientais, como verificado no espessamento da epiderme radicular.

5.4.2 Teste de frio

A Tabela 7 apresenta os resultados dos percentuais de germinação após o teste de frio para as sementes revestidas com quitosana e o controle. Observa-se que não houve diferença significativa entre o controle e os tratamentos. Em relação aos fatores concentração de quitosana e concentração de glicerol também não foram observados efeitos significativos nas faixas avaliadas (Figura 11).

Mediante o teste de frio, observou-se que nenhum tratamento interferiu significativamente no vigor de sementes, indicando o revestimento de sementes de milho com solução de quitosana não prejudica o desenvolvimento das plântulas sob condições de estresse ambiental.

Evangelista *et al.* (2007), estudando desempenho de sementes de soja peliculizadas com polímeros sintéticos em solo com diferentes teores de água, verificaram aumento no percentual de emergência e no índice de velocidade de

emergência, porém ao realizarem teste de frio concluíram que, em condições de estresse, a peliculização pode reduzir o vigor de sementes.

Samarah *et al.* (2020), realizaram teste de frio em sementes de pimenta (*Capsicum annuum* L.) tratadas com quitosana (0,01; 0,05; 0,1; 0,3 e 0,5% m/v) e verificaram incremento na porcentagem de emergência e crescimento de parte aérea das plântulas e sugeriram que um aumento nas atividades de quitinase e glucanase induziu de forma sistêmica a resistência das sementes a condições adversas. Segundo os autores, essas enzimas são expressas durante a germinação de sementes, podendo atuar na degradação do endosperma para protusão da raiz primária ou na proteção das sementes contra patógenos e estresses abióticos, por meio da ativação de mecanismos de defesa da planta.

Tabela 7. Resultados de germinação após o teste de frio para os revestimentos à base de quitosana em sementes de milho.

Tratamento (quit/glicerol)	Teste de Frio (%)
T1 (1,0/0,09)	95,0 ± 1,2 ^a
T2 (3,0/0,09)	89,5 ± 6,8 ^a
T3 (1,0/0,51)	90,0 ± 5,9 ^a
T4 (3,0/0,51)	91,0 ± 4,2 ^a
T5 (0,6/0,30)	91,0 ± 4,8 ^a
T6 (3,4/0,30)	90,5 ± 1,0 ^a
T7 (2,0/0)	95,0 ± 2,0 ^a
T8 (2,0/0,60)	95,0 ± 2,6 ^a
T9 (2,0/0,30)	87,0 ± 5,3 ^a
T10 (2,0/0,30)	92,0 ± 4,3 ^a
T11 (2,0/0,30)	90,7 ± 4,1 ^a
Controle	90,0 ± 1,6 ^a

Média ± desvio padrão de 4 determinações experimentais; letras iguais na coluna indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias pelo teste de Tukey.

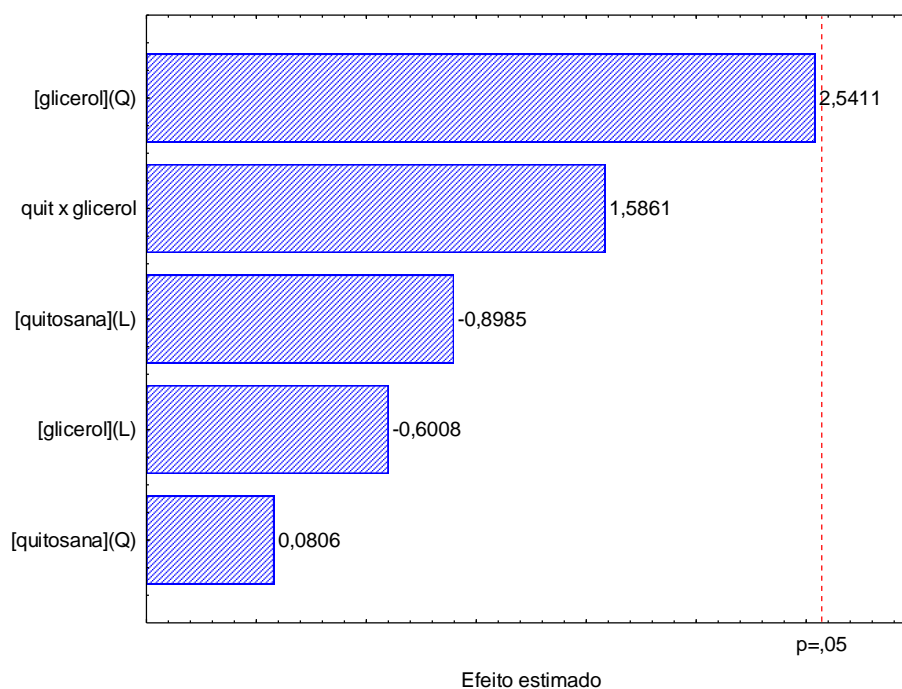


Figura 11. Gráfico de Pareto para o efeito das variáveis concentração de quitosana e concentração de glicerol no percentual de germinação após o teste de frio.

5.4.3 Teste de emergência, IVE, altura de plântulas e massa de matéria seca de raiz e de parte aérea de plântulas

Na Tabela 8 estão apresentados os resultados de emergência, do índice de velocidade de emergência, da altura das plântulas e da massa de matéria seca da raiz e parte aérea. Como observado nos resultados de germinação (Tabela 6), não houve diferença significativa para a emergência entre os tratamentos e o controle e nem efeito significativo da concentração de quitosana e concentração de glicerol na faixa estudada (Figura 12). Porém, o índice de velocidade de emergência (IVE) diferiu significativamente em relação ao controle para todos os tratamentos com exceção dos tratamentos com as menores concentrações de quitosana (T1 e T5) e com concentrações de glicerol de até 0,30 g/g quitosana. O menor valor de IVE foi obtido para as sementes revestidas com a maior concentração de quitosana (T6). Isso reforça a hipótese de que maiores concentrações de quitosana impõem uma barreira física que, apesar de proteger e promover a emergência da semente pela criação de um filme semipermeável na sua superfície, permitindo a manutenção e absorção de água do solo (ZENG *et al.*, 2012), pode reduzir a velocidade desse processo. Essa tendência pode ser observada na Figura 13 A, que indica que o termo linear da concentração de quitosana apresentou efeito significativo negativo

no IVE, ou seja, o aumento da concentração da quitosana diminui o IVE. Através da superfície de resposta (Figura 13 B) é possível observar que os maiores valores de IVE seriam obtidos para concentrações de quitosana até 2% e concentrações de glicerol de até 0,40 g/g quitosana.

O mesmo efeito pode ser percebido na altura das plântulas, em que o tratamento com maior concentração de quitosana (T6) também apresentou a menor altura (11,8 cm), diferindo significativamente do controle (Tabela 8). Os tratamentos com 3% e 2% de quitosana e maior concentração de glicerol (0,51 e 0,60 g/g quitosana), respectivamente, também diferiram do controle. Em relação aos efeitos das variáveis concentração de quitosana e concentração de glicerol, também se observou um efeito negativo significativo em relação ao termo linear da concentração de quitosana, indicando comportamento semelhante ao encontrado para o IVE (Figura 14 A e B).

Tabela 8. Resultados de emergência de plântulas, índice de velocidade de emergência (IVE), altura de plântulas e massa de matéria seca de raiz e de parte aérea para os revestimentos à base de quitosana em sementes de milho.

Tratamento (quit/glic)	Emergência (%)	IVE	Altura (cm)	Massa de matéria seca (g)	
				Raiz	P. Aérea
T1 (1,0/0,09)	98,0 ± 2,8 ^a	13,9 ± 0,2 ^{ab}	13,4 ± 0,8 ^{ab}	2,72 ± 0,2 ^a	2,25 ± 0,1 ^{ab}
T2 (3,0/0,09)	97,0 ± 2,6 ^a	12,9 ± 0,3 ^{bc}	13,0 ± 0,5 ^{abc}	2,96 ± 0,3 ^a	2,18 ± 0,0 ^b
T3 (1,0/0,51)	97,0 ± 2,6 ^a	13,5 ± 0,4 ^{bc}	13,1 ± 0,5 ^{ab}	2,98 ± 0,3 ^a	2,21 ± 0,3 ^{ab}
T4 (3,0/0,51)	96,0 ± 1,6 ^a	13,6 ± 0,5 ^{bc}	12,7 ± 0,4 ^{bc}	2,88 ± 0,3 ^a	2,26 ± 0,1 ^{ab}
T5 (0,6/0,30)	97,5 ± 2,5 ^a	13,9 ± 0,3 ^{ab}	13,7 ± 0,4 ^{ab}	2,59 ± 0,1 ^a	2,23 ± 0,1 ^{ab}
T6 (3,4/0,30)	97,5 ± 1,0 ^a	12,5 ± 0,3 ^c	11,8 ± 0,6 ^c	2,56 ± 0,1 ^a	2,17 ± 0,2 ^b
T7 (2,0/0)	97,5 ± 3,0 ^a	13,5 ± 0,4 ^{bc}	13,4 ± 0,5 ^{ab}	2,85 ± 0,3 ^a	2,26 ± 0,2 ^{ab}
T8 (2,0/0,60)	94,5 ± 2,5 ^a	12,9 ± 0,5 ^{bc}	12,5 ± 0,5 ^{bc}	2,72 ± 0,2 ^a	2,18 ± 0,2 ^b
T9 (2,0/0,30)	98,0 ± 1,6 ^a	13,5 ± 0,4 ^{bc}	13,5 ± 0,6 ^{ab}	2,76 ± 0,2 ^a	2,35 ± 0,2 ^{ab}
T10 (2,0/0,30)	96,5 ± 1,9 ^a	13,6 ± 0,6 ^{bc}	13,1 ± 0,3 ^{ab}	2,69 ± 0,5 ^a	2,21 ± 0,1 ^{ab}
T11 (2,0/0,30)	100,0 ± 2,0 ^a	13,9 ± 0,3 ^b	13,4 ± 0,6 ^{ab}	3,16 ± 0,3 ^a	2,34 ± 0,2 ^{ab}
Controle	98,5 ± 1,0 ^a	14,8 ± 0,8 ^a	14,1 ± 0,2 ^a	3,16 ± 0,0 ^a	2,60 ± 0,1 ^a

Média ± desvio padrão de 4 determinações experimentais; letras iguais na coluna indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias pelo teste de Tukey.

Os valores de massa de matéria seca da raiz dos tratamentos com quitosana não variaram em relação ao controle (Tabela 8) e não foi observado efeito significativo em relação às variáveis avaliadas (Figura 15 A) nesta resposta, evidenciando que a quitosana não influenciou a massa radicular, o que é de grande importância nas fases primordiais do estabelecimento da plântula. As massas de matéria seca da parte aérea apresentaram tendência similar à observada para o IVE e a altura da plântula, em que os tratamentos com maior concentração de quitosana apresentaram menores valores em relação ao controle (Tabela 8). Porém, o gráfico de Pareto não indicou efeito significativo das variáveis, ou seja, a variação da concentração de quitosana de 0,6 a 3,4% e da concentração de glicerol de 0 a 0,60 g/g quitosana não afetou a massa seca da parte aérea das plântulas (Figura 15 B).

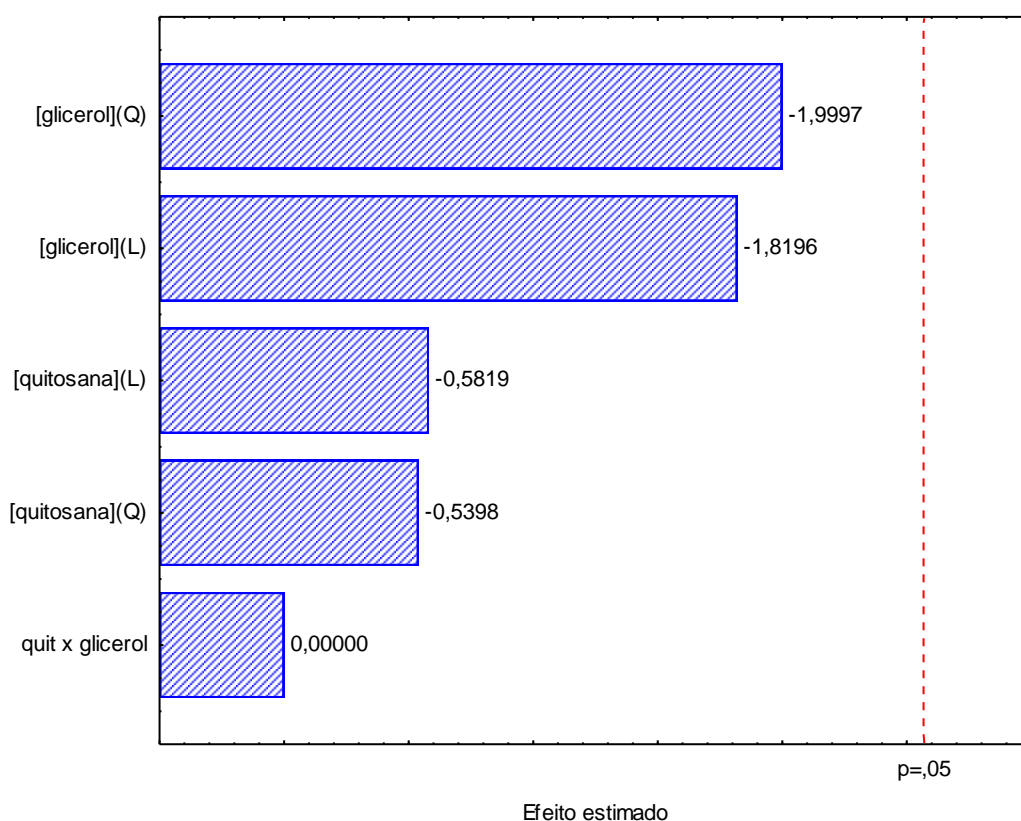


Figura 12. Gráfico de Pareto para o efeito das variáveis concentração de quitosana e concentração de glicerol na emergência das plântulas.

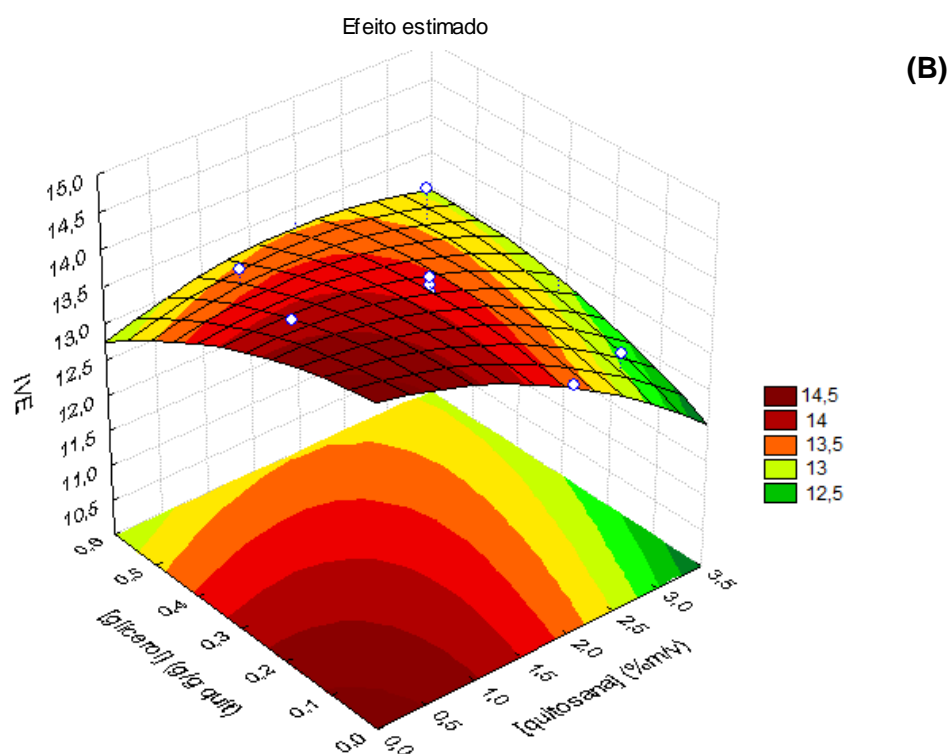
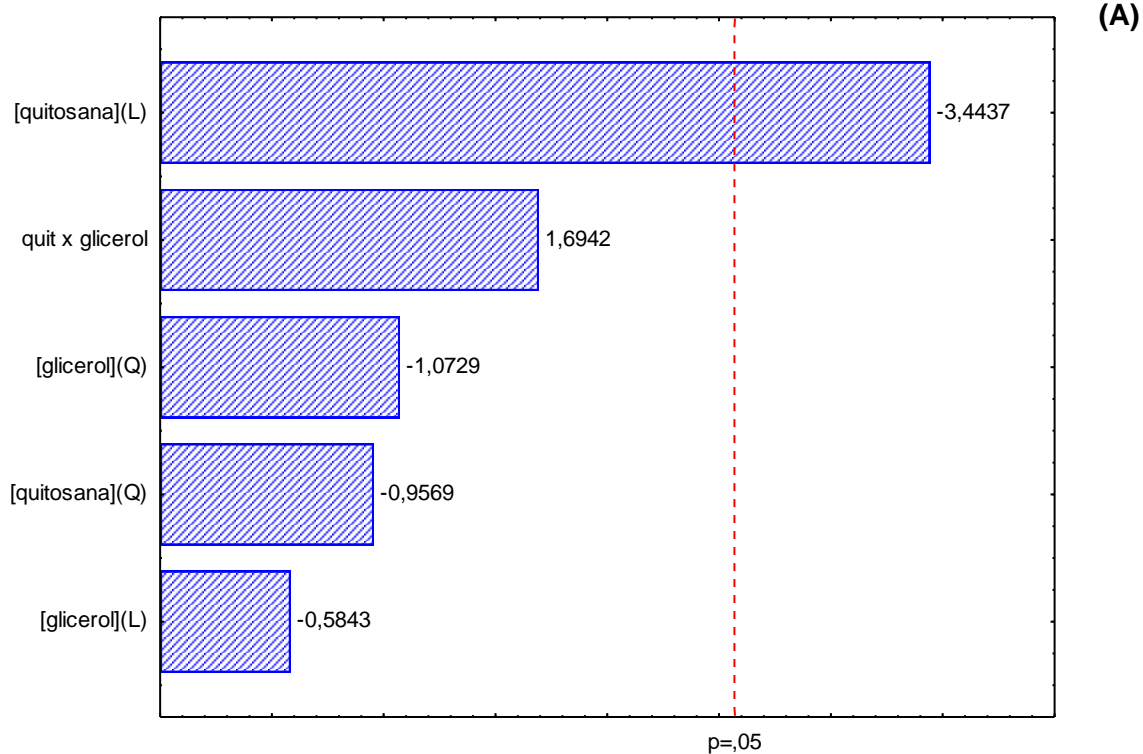


Figura 13. Gráfico de Pareto (A) e superfície de resposta (B) para o efeito das variáveis concentração de quitosana e concentração de glicerol no Índice de Velocidade de Emergência das plântulas (IVE).

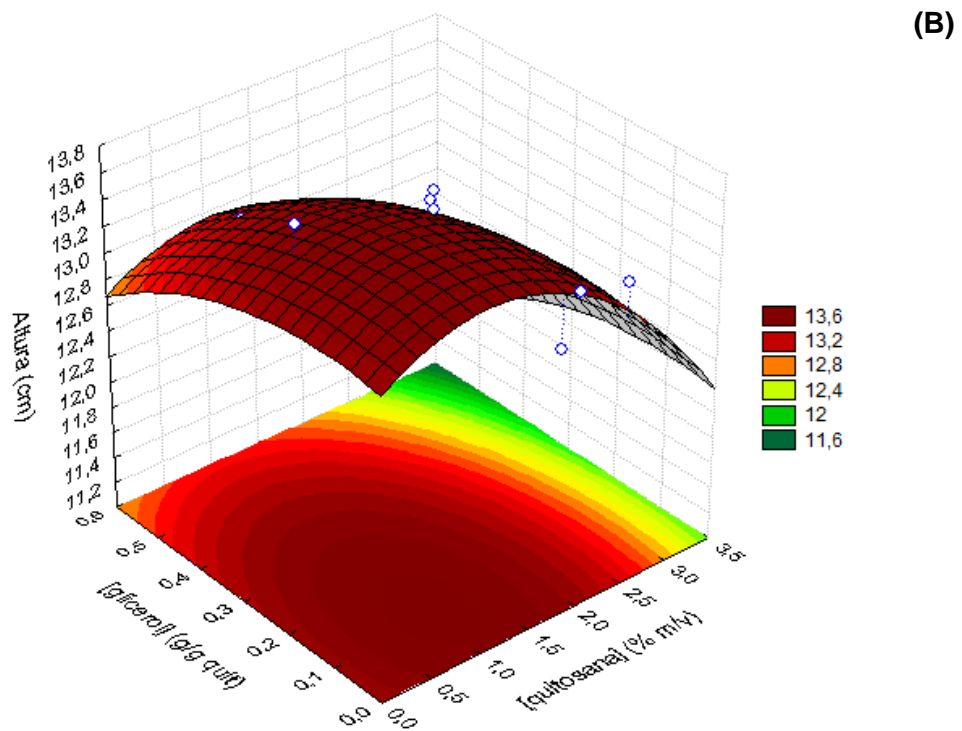
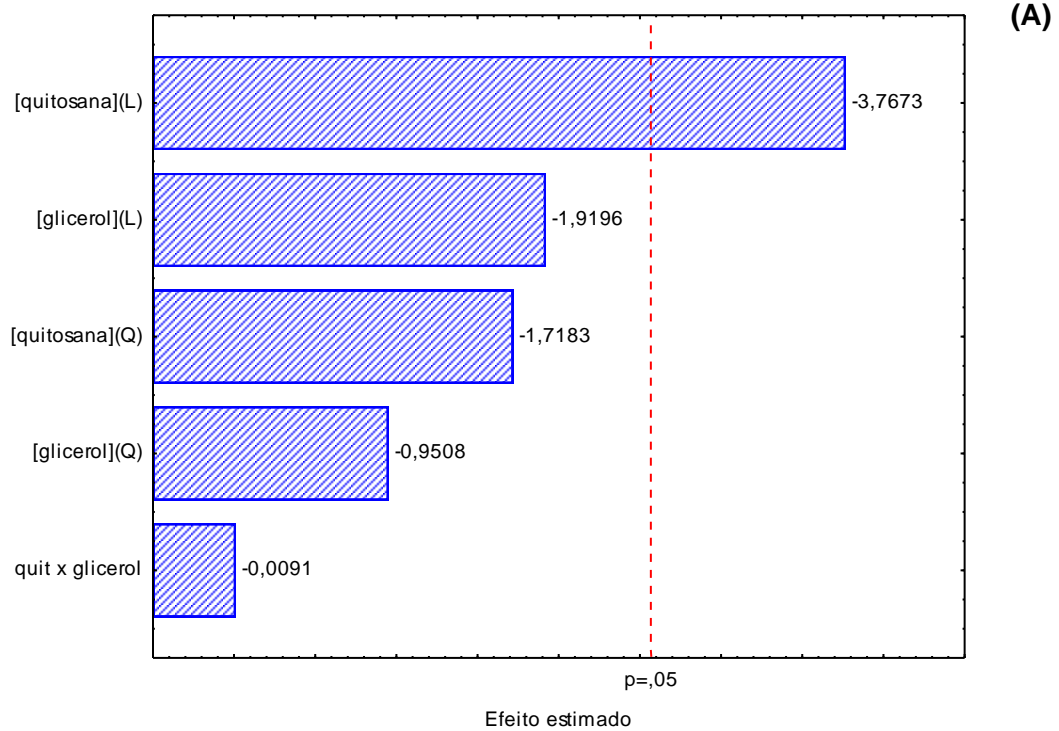


Figura 14. Gráfico de Pareto (A) e superfície de resposta (B) para o efeito das variáveis concentração de quitosana e concentração de glicerol na altura das plântulas.

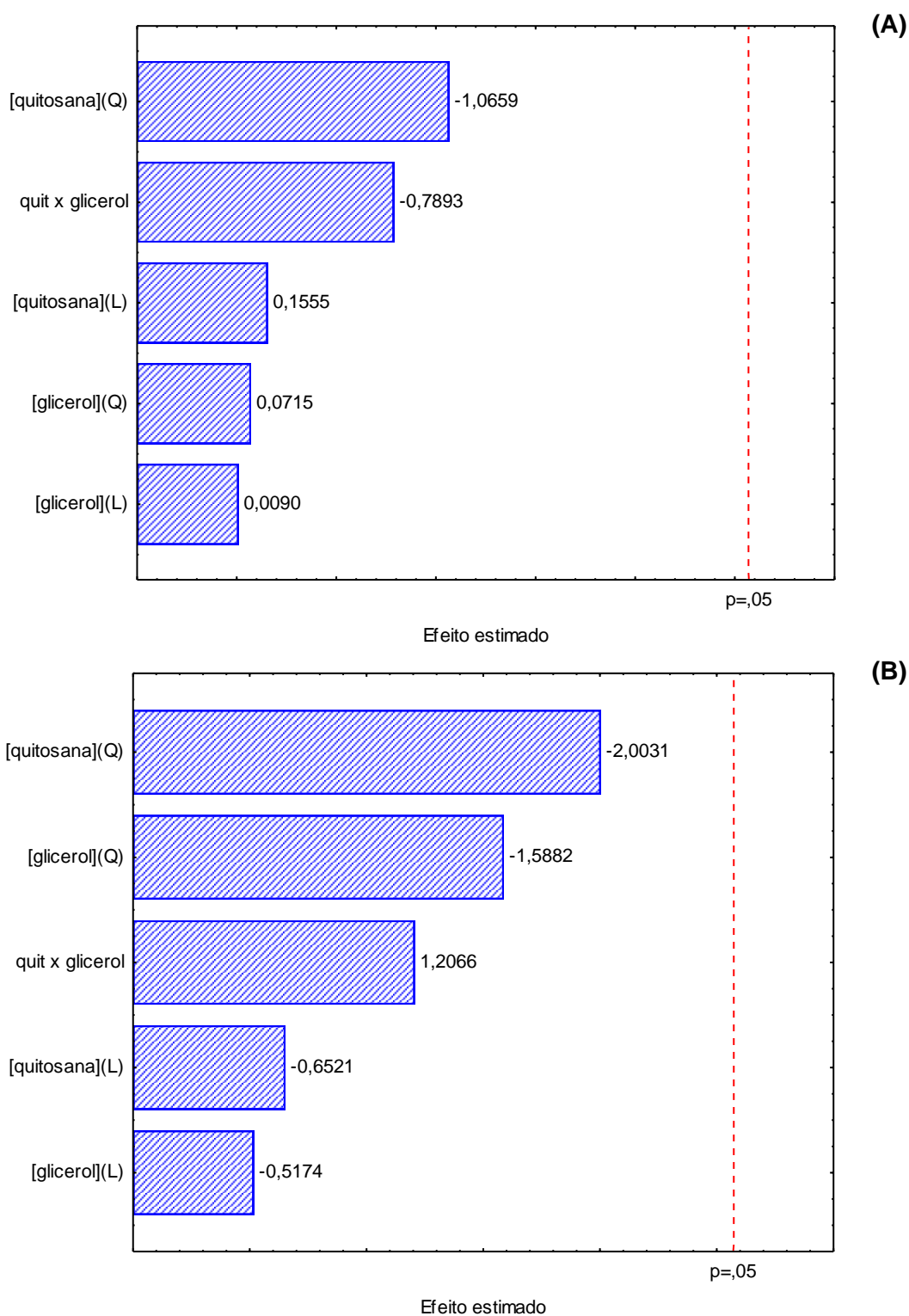


Figura 15. Gráficos de Pareto para o efeito das variáveis concentração de quitosana e concentração de glicerol na massa de matéria seca da raiz (A) e parte aérea (B).

Verificou-se redução na altura das plântulas em relação ao controle, sugerindo que a quitosana interferiu principalmente nos grupos com maior concentração. Lizárraga-Paulín *et al.* (2011), realizando embebição de sementes de

milho durante cinco minutos em solução aquosa de ácido acético com quitosana e pH ajustado a 5,0, relataram que a quitosana (2%) manteve a viabilidade das sementes e não modificou parâmetros fenológicos de plântulas de milho, além de ter contribuído no controle de fungos patogênicos das sementes expostas a condições de estresse abiótico.

Em sementes de soja, foi realizado revestimento com quitosana e alginato em associação a polietilenoglicol com posterior semeadura a campo e verificou-se atraso na emergência de plântulas, porém maior densidade de plantas e número de vagens por planta ao longo de três anos experimentais em comparação às sementes não revestidas (JARECKI, 2021).

Há necessidade de mais pesquisas no que tange à possibilidade de que maiores concentrações de glicerol possam ter ocasionado um efeito tóxico sobre o comprimento de parte aérea. Em estudo com sementes de mamona, Chandrika *et al.* (2019) encontraram baixo percentual de germinação (75%) e baixo vigor de plântulas utilizando revestimento apenas de quitosana, porém verificaram que as sementes revestidas com a mistura de quitosana (1,5% m/v), polietilenoglicol (0,5% m/v) e glicerol (1,0% m/v) apresentaram maior percentual de germinação (100%), comprimento de raiz e de parte aérea e o índice de vigor. Além disso, os autores ressaltaram que o percentual germinação de sementes aumentou com o aumento na concentração de glicerol de 0,75% a 1,0% m/v, divergindo do resultado do presente estudo.

Os resultados obtidos no presente estudo indicam que o revestimento com solução de quitosana associada ao glicerol não interferiu no teor de água, massa de 1000 sementes, porcentagem de germinação e de emergência, teste de frio e massa de matéria seca das raízes. Maiores concentrações de glicerol podem estar associadas a uma tendência de redução no comprimento da parte aérea, embora não tenha sido atestado efeito da interação das variáveis sobre este parâmetro, e maiores concentrações de quitosana podem promover uma redução no índice de velocidade de germinação, índice de velocidade de emergência, altura de plântulas e massa de matéria seca de parte aérea.

Assim, estes dados sugerem que os tratamentos com maiores concentrações de quitosana interferiram no vigor das sementes de milho devido à barreira física imposta pelo revestimento, embora não tenham afetado a viabilidade. Verificou-se, como esperado, que o efeito da quitosana sobre o crescimento é provavelmente

devido a uma redução na velocidade do desenvolvimento de plântulas, e não a um efeito tóxico do revestimento no tecido vegetal. Embora identificado que a redução na velocidade poderia ter algum prejuízo ao estabelecimento do estande, o revestimento não afetou o vigor no que tange a parâmetros de resistência das sementes a estresse ambiental.

Considerando as análises de médias pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) e complementando a interpretação com as superfícies de resposta obtidas, os tratamentos que apresentaram maior potencial como revestimento foram, respectivamente: T1 (1,0/0,09) > T9, T10, T11 (2,0/0,30) > T8 (2,0/0,60) > T2 (3,0/0,09) > T5 (0,6/0,30).

No que tange ao comprimento de plântulas, T1 (1,0/0,09) e T2 (3,0/0,09) mostraram-se mais adequados, porém, considerando a importância da variável IVG em condições de campo, os tratamentos mais interessantes foram T8 (2,0/0,60) e T9 (2,0/0,30).

De modo geral, o tratamento T1 (1,0/0,09) apresentou os melhores resultados de potencial fisiológico, não sendo verificada interferência nos parâmetros de viabilidade e vigor, exceto IVG, avaliados para as sementes de milho. Todavia, mostrou menor qualidade do revestimento quando avaliado visualmente mediante coloração, provavelmente devido à baixa concentração de quitosana na formulação. O mesmo foi observado em T3 (1,0/0,51) e T5 (0,6/0,30), indicando que o efeito proporcionado pela cobertura pode ser atribuído à menor quantidade de revestimento aderida no entorno da semente.

O tratamento T9 (2,0/0,30) apresentou ótimos resultados no potencial fisiológico e nos aspectos físicos avaliados, apresentando o diferencial de melhor qualidade visual no revestimento, portanto pode ser considerado mais viável para aplicação em sementes e como mais interessante para estudos futuros.

5.5 Avaliação da sanidade das sementes

O teste de sanidade (*Blotter test*) foi realizado com as sementes de milho sem revestimento (controle) e revestidas na condição selecionada (tratamento T9 – 2,0/0,30), considerando os aspectos físicos e o potencial fisiológico das sementes após o tratamento. Os resultados obtidos (Figura 16) indicam que o revestimento com quitosana 2% inibiu o crescimento de *Penicillium* spp., diferindo

significativamente do controle ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa entre os tratamentos para a ocorrência de *Aspergillus* spp. e *Fusarium* spp.

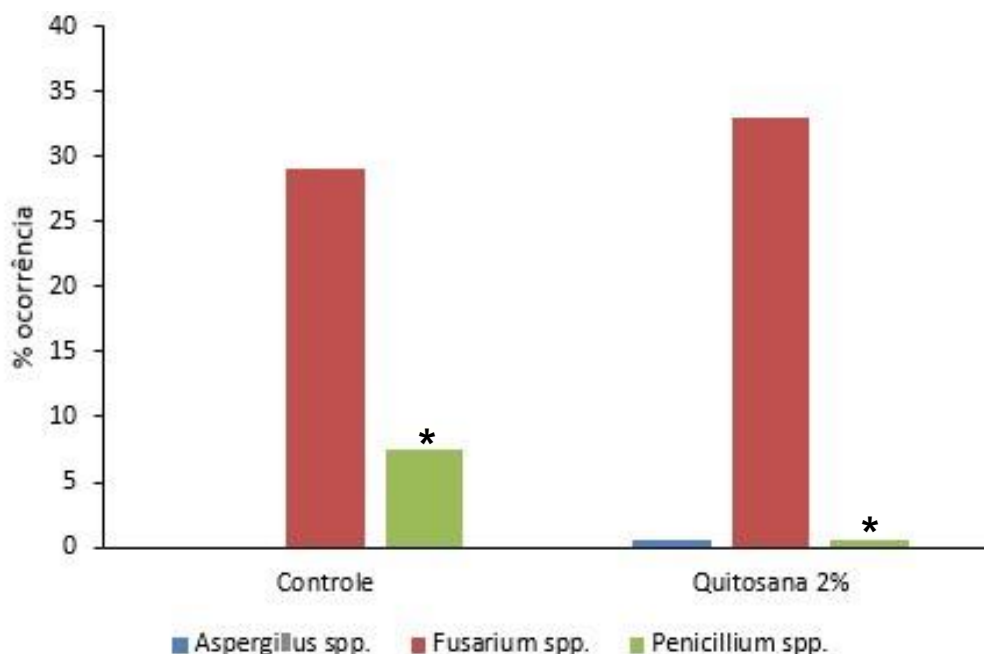


Figura 16. Ocorrência (%) de *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp. em sementes de milho sem e com revestimento de quitosana (2%). *Médias com diferenças significativas pelo teste t-Student ($p < 0,05$).

Abd-Allah e Hashem (2006) realizaram *Blotter test* para avaliar o efeito antifúngico da quitosana (0,1% m/v) em sementes de lentilha (*Lens esculenta*) imersas na solução polimérica com posterior secagem e também verificaram redução no desenvolvimento de *Penicillium* sp. e na produção de micotoxinas, ao passo que não houve diferença para *Aspergillus* spp. e *Fusarium* spp. Devido à característica policatiônica da quitosana, o contato com a parede fúngica pode levar ao extravasamento do conteúdo celular e retardar ou inibir a síntese de RNAm e proteínas (LEE *et al.*, 2016).

Stanley-Raja *et al.* (2021) demonstraram o potencial de uso da quitosana extraída do fungo *Aspergillus niger* como bioestimulante em sementes de arroz (*Oryza sativa*), sendo verificado aumento na produção das enzimas peroxidase e polifenoloxidase, que atuam nas respostas de defesa das plantas contra estresses bióticos e abióticos. Os autores também observaram que a velocidade de germinação e a emergência de plântulas foram maiores que o controle tanto em sementes tratadas com quitosana extraída do fungo quanto em sementes tratadas

com quitosana comercial e verificaram atividade antibacteriana de ambas na concentração 0,01%.

Fusarium spp., *Aspergillus flavus* e *Penicillium* spp. estão entre as principais espécies de fungos responsáveis pela deterioração de sementes de milho (SILVA *et al.*, 2020). Silva-Castro *et al.* (2018) realizaram teste *in vitro* para averiguar a eficiência da quitosana de baixa e média massa molar no controle de *Fusarium circinatum* em sementes de *Pinus* spp. e verificaram efeitos positivos no conteúdo de compostos fenólicos totais, contribuindo na eliminação de radicais livres, e melhores resultados com quitosana de baixa massa molar. Pabón-Baquero *et al.* (2015) verificaram que soluções de quitosana (0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 g/L) de baixa massa molar reduziram o crescimento micelial de *Fusarium equiseti* em sementes de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.).

Lee *et al.* (2016) demonstraram que diferentes massas molares e concentrações de quitosana conferem efeitos variados na atividade antifúngica e observaram que a presença de cadeias curtas nos oligômeros de quitosana promoveu maior inibição no crescimento fúngico em relação à quitosana de alta massa molar. No presente estudo, não houve interferência da solução de quitosana 2% para o controle de *Aspergillus* spp. e *Fusarium* spp. em sementes de milho, o que pode ter sido ocasionado pela utilização de quitosana de média massa molar.

6 CONCLUSÕES

O potencial de uso da quitosana como revestimento de sementes de milho foi confirmado considerando aspectos físicos e sem comprometer o potencial fisiológico. O método de aplicação 2, que consistia na imersão das sementes na solução de quitosana e retirada imediata seguida de secagem, foi adequado para o revestimento. As formulações contendo 1,0% quitosana e 0,09 g glicerol/g quitosana (T1) e 2,0% quitosana e 0,30 g glicerol/g quitosana (T9, T10, T11) foram as que melhor mantiveram o potencial fisiológico das sementes de milho. O revestimento com quitosana reduziu a ocorrência de *Penicillium* spp. na condição selecionada (2,0% de quitosana e 0,30 g glicerol/g quitosana).

7 LITERATURA CITADA

ABD-ALLAH, E. F.; HASHEM, A. Seed mycoflora of *Lens esculenta* and their biocontrol by chitosan. **Phytoparasitica**, v. 34, n. 2, p. 213-218, 2006.

ABRASEM. Associação Brasileira de Sementes e Mudanças. **Guia Abrasem de Boas Práticas de Tratamento de Sementes**. Brasília, DF: Abrasem, 2014. 28 p. Disponível em: www.abrasem.com.br/wp-content/uploads/2014/12/Guia-TSI-completo.pdf. Acesso em: 28 jul. 2020.

AKTER, J.; JANNAT, R.; HOSSAIN, M. M.; AHMED, J. U.; RUBAYET, M. T. Chitosan for plant growth promotion and disease suppression against anthracnose in chilli. **International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology**, v. 3, n. 3, p. 806-817, 2018.

AL-TAWAHA, A. R. M.; AL-GHZAWI, A. L. A. Effect of chitosan coating on seed germination and salt tolerance of lentil (*Lens culinaris* L.). **Research on Crops**, v. 14, n. 2, p. 489-491, 2013.

ALVARENGA, G.; ROSSETTI, C.; ALMEIDA, A. S.; RODRIGUES, D. B.; MARTINS, A. B. N.; AGUIAR, R. N.; EVANGELISTA, E. A.; TUNES, L. V. M. Sementes de milho tratada: substratos e metodologia alternativa para o teste de germinação. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 6, p.41190-41210, 2020.

ASAE - AMERICAN SOCIETY OF AGRICULTURAL ENGINEERING. Moisture relationship of grains. **Agricultural Engineers Yearbook**. St. Joseph. 1980. p. 343.

AVELAR, S. A. G.; SOUSA, F. V.; FISS, G.; BAUDET, L.; PESKE, S. T. The use of film coating on the performance of treated corn seed. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 34, n. 2, p. 186-192, 2012.

AVELAR, S. A. G.; BAUDET, L.; OLIVEIRA, S.; LUDWIG, M. P.; CRIZEL, R. L.; RIGO, G. A. Tratamento e recobrimento de sementes de soja com polímeros líquido e em pó. **Interciencia**, v. 40, n. 2, p. 133-137, 2015.

BARROS NETO, J. J. S.; ALMEIDA, F. A. C.; QUEIROGA, V. P. GONÇALVES, C. C. **Sementes: recursos tecnológicos**. Aracaju: IFS, 2014. 285 p. Disponível em: http://www.ifs.edu.br/images/EDIFS/ebooks/2014/Sementes_Estudos_Tecnol%C3%B3gicos.pdf. Acesso em: 26 jul. 2021.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination**. New York: Springer-Verlag, 1978. 306 p.

- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: Mapa/ACS, 2009a. 395p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de Análise Sanitária de Sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: Mapa/ACS, 2009b. 200p.
- CARVALHAIS, M. C.; BRESSANIN, L. A.; RABÊLO, V. M.; MAGALHÃES, P. C.; SOUZA, K. R. D.; SOUZA, T. C. Quitosana e seus derivados promovem o crescimento inicial de plântulas de milho sob déficit hídrico. *In: XXXII CONGRESSO DE MILHO E SORGO*, 32., 2018, Sete Lagoas, MG. **Resumos** [...]. Sete Lagoas: Associação Brasileira de Milho e Sorgo, 2018. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/1095512>. Acesso em: 18 out. 2019.
- CARVALHO, I. R.; KORCELSKIL, C.; PERUZZO, S. T.; FOLLMANN, D. N.; NARDINO, M.; SOUZA, V. Q.; KULCZYNSKI, S. M.; CARON, B. O. Efeitos fisiológicos atribuídos ao teste de frio e adição de reguladores vegetais em híbridos de milho. **Scientia Plena**, v. 11, n. 3, p. 030201, 2015.
- CASARIEGO, A.; SOUZA, B. W. S.; VICENTE, A. A.; TEIXEIRA, J. A.; CRUZ, L.; DÍAZ, R. Chitosan coating surface properties as affected by plasticizer, surfactant and polymer concentrations in relation to the surface properties of tomato and carrot. **Food Hydrocolloids**, v. 22, n. 8, p. 1452-1459, 2008.
- CERRI, B. C.; BORELLI, L. M.; STELUTTI, I. M.; SOARES, M. R.; SILVA, M. A. Evaluation of new environmental friendly particulate soil fertilizers based on agroindustry wastes biopolymers and sugarcane vinasse. **Waste management**, v. 108, p. 144-153, 2020.
- CHANDRIKA, K. S. V. P.; PRASAD, R. D.; GODBOLE, V. Development of chitosan-PEG blended films using *Trichoderma*: enhancement of antimicrobial activity and seed quality. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 126, p. 282-290, 2019.
- CICERO, S. M.; VIEIRA, R. D. Teste de frio. *In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA-NETO, J. B.; MARCOS-FILHO, J. (Ed.). Vigor de sementes: conceitos e testes*. 2. ed. Londrina: ABRATES, 2020. Cap. 6, p. 276-315.
- COMA, V.; MARTIAL-GROS, A.; GARREAU, S.; COPINET, A.; SALIN, F.; DESCHAMPS, A. Edible Antimicrobial Films Based on Chitosan Matrix. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 3, 2002.

CRIZEL, R. L.; LUCCA FILHO, O. A.; LUDWIG, M. P.; AVELAR, S. A. A.; OLIVEIRA, S. Armazenamento de sementes tratadas e recobertas em equipamento com sistema de aspersão. *In: XVIII CIC, XI ENPOS E I MOSTRA CIENTÍFICA, 2015, Pelotas, RS. Anais [...]. Pelotas: UFPel, 2015. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/268423851_ARMAZENAMENTO_DE_SEMENTES_TRATADAS_E_RECOBERTAS_EM_EQUIPAMENTO_COM_SISTEMA_DE_ASPERSAO. Acesso em: 17 fev. 2020.*

DIAS, M. A. N.; MONDO, V. H. V.; CICERO, S. M.; GONÇALVES, R.; SILVA, C. A. T. da. Vigor tests association as an alternative for precise and efficient assessment of maize seed quality. **Revista Caatinga**, v. 28, n. 3, p. 93-99, 2015.

DOMIN, M.; KLUZA, F.; GÓRAL, D.; NAZAREWICZ, S.; KOZŁOWICZ, K.; SZMIGIELSKI, M.; SLASKA-GRZYWNA, B. Germination energy and capacity of maize seeds following low-temperature short storage. **Sustainability**, v. 12, n. 1, 46, 2020.

DUHAN, J. S.; KUMAR, R.; KUMAR, N.; KAUR, P.; NEHRA, K.; DUHAN, S. Nanotechnology: The new perspective in precision agriculture. **Biotechnology Reports**, v. 15, p. 11-23, 2017.

EVANGELISTA, J. R. E.; OLIVEIRA, J. A.; BOTELHO, F. J. E.; OLIVEIRA, R. M. E.; PEREIRA, C. E. Desempenho de sementes de soja peliculizadas em solo com diferentes teores de água. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 4, p. 994-999, 2007.

FAGUNDES, L. K.; NUNES, U. R.; PRESTES, O. D.; FERNANDES, T. S.; LUDWIG, E. J.; SAIBT, N. Rice seed treatment and recoating with polymers: physiological quality and retention of chemical products. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 30, n. 4, p. 920-927, 2017.

FONSECA, S. C. L.; PEREZ, S. C. J. G. A. Ação do polietileno glicol na germinação de sementes de *Adenantha pavonina* L. e o uso de poliaminas na atenuação do estresse hídrico sob diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, DF, v. 25, n. 1, p. 1-6, 2003.

FRANÇA-NETO, J. B.; KRZYZANOWSKI, F. C.; HENNING, A. A.; PÁDUA, G. P. de; LORINI, I.; HENNING, F. A. **Tecnologia da produção de semente de soja de alta qualidade**. Londrina: Embrapa Soja, 2016. 82 p.

FREIBERG, J. A.; LUDWIG, M. P.; AVELAR, S. A. G.; GIROTTO, E.; EICKSTEDT, D. M.; ROTTA, R. Physiological performance of wheat seeds treated with

- micronutrients and protection products during storage. **Journal of Seed Science**, v. 39, n. 2, p. 182-188, 2017.
- FRIULI, M.; NITTI, P.; CAFUERO, L.; PRETE, A.; ZAFAR, M. S.; MADAGHIELE, M.; DEMITRI, C. Cellulose acetate and cardanol based seed coating for intraspecific weeding coupled with natural herbicide spraying. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 28, p. 2893-2904, 2020.
- HAAS, J.; LOZANO, E. R.; HAIDA, K. S.; MAZARO, S. M.; VISMARA, E. S.; POPPY, G. M. Getting ready for battle: do cabbage seeds treated with jasmonic acid and chitosan affect chewing and sap-feeding insects? **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 166, n. 5, p. 412-419, 2018.
- HEMANTARANJAN, A.; KATIYAR, D.; SINGH, B.; BHANU, A. N. A future perspective in crop protection: chitosan and its oligosaccharides. **Advances in Plants & Agriculture Research**, v. 1. n. 1, 2014.
- HIRANO, S.; KOISHIBARA, Y.; KITAURA, S.; TANEKO, T.; TSUCHIDA, H.; MURAE, K.; YAMAMOTO, T. Chitin biodegradation in sand dunes. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 19, n. 5, p. 379-384, 1991.
- IRISSIN-MANGATA, J.; BAUDUIN, G.; BOUTEVIN, B.; GONTARD, N. New plasticizers for wheat gluten films. **European Polymer Journal**, v. 37, p. 1533-1541, 2001.
- ITO, M. F. Principais doenças da cultura da soja e manejo integrado. **Nucleus**, v. 10, n. 3, p. 83-102, 2013.
- JARECKI, W. Soybean response to seed coating with chitosan + alginate/PEG and/or inoculation. **Agronomy**, v. 11, n. 9, 1737, 2021.
- KHURI, A. I.; CORNELL, J. A. **Response surface design and analyses**. New York: Marcel Dekker Inc., 1987.
- KIM, S. H.; NO, H. K.; PRINYAWIWATKUL, W. Plasticizer types and coating methods affect quality and shelf life of eggs coated with chitosan. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 3, S111-S117, 2008.
- KIM, I. Y.; PUSEY, P. L.; ZHAO, Y.; KORBAN, S. S.; CHOI, H.; KIM, K. K. Controlled release of *Pantoea agglomerans* E325 for biocontrol of fire blight disease of apple. **Journal of Controlled Release**, v. 161, p. 109-115, 2012.
- KUMAR, S.; YE, F.; DOBRETSOV, S.; DUTTA, J. Chitosan nanocomposite coatings for food, paints and water treatment applications. **Applied Sciences**, v. 9, n. 2, 2409, 2019.

- KUMAR, S.; MUKHERJEE, A.; DUTTA, J. Chitosan based nanocomposite films and coatings: emerging antimicrobial food packaging alternatives. **Trends in Food Science & Technology**, v. 97, p. 196-209, 2020.
- KUSUMASTUTI, Y.; ISTIANI, A.; ROCHMADI; PURNOMO, C. W. Chitosan-based polyion multilayer coating on NPK fertilizer as controlled released fertilizer. **Advances in Materials Science and Engineering**, v. 2019, 2958021, 2019.
- KRZYZANOWSKI, F. C. *et al.* Testes de vigor baseados em desempenho de plântulas. *In*: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA-NETO, J. B.; MARCOS-FILHO, J. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. 2. ed. Londrina: ABRATES, 2020. Cap. 2, p. 93-104.
- LEE, C. G.; KOO, J. C.; PARK, J. K. Antifungal effect of chitosan as Ca²⁺ channel blocker. **The Plant Pathology Journal**, v. 32, n. 3, p. 242-250, 2016.
- LIZÁRRAGA-PAULÍN, E. G.; TORRES-PACHECO, I.; MORENO-MARTÍNEZ, E.; MIRANDA-CASTRO, S. P. Chitosan application in maize (*Zea mays*) to counteract the effects of abiotic stress at seedling level. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 34, p. 6439-6446, 2011.
- LIZÁRRAGA-PAULÍN, E. G.; MIRANDA-CASTRO, S. P.; MORENO-MARTÍNEZ, E.; LARA-SAGAHÓN, A. V.; TORRES-PACHECO, I. Maize seed coatings and seedling sprayings with chitosan and hydrogen peroxide: their influence on some phenological and biochemical behaviors. **Journal of Zhejiang University Science B.**, v. 14, n. 2, p. 87-96, 2013.
- LUKSEVICIUTE, V.; LUKSIENE, Z. Inactivation of molds on the surface of wheat sprouts by chlorophyllin-chitosan coating in the presence of visible LED-based light. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, v. 202, 111721, 2020.
- MALERBA, M.; CERANA, R. Chitosan effects on plant systems. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 7, 996, 2016.
- MAGUIRE, J. D. Speed of germination: aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v. 2, p. 176-177, 1962.
- MARCOS-FILHO, J. Seed vigor testing: An overview of the past, present and future perspective. **Scientia Agricola**, v. 72, n. 4, p. 363-374, 2015a.
- MARCOS-FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. 2. ed. Londrina: ABRATES, 2015b. 660 p.

- MARTINS, M. **Aplicação da quitosana em milho transgênico e não transgênico**. 2016. 66 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) – Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2016.
- MATTÉ, G. M.; ROSA, S. A tecnologia da microencapsulação através das microesferas de quitosana. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, v. 14, n. 5, p. 206-218, 2013.
- MOHAMED, C.; AMOIN, N. E.; ETIENNE, T. V.; YANNICK, K. N. Use of bioactive chitosan and *Lippia multiflora* essential oil as coatings for maize and sorghum seeds protection. **EurAsian Journal of BioSciences**, v. 14, p. 27-34, 2020.
- OLIVEIRA, A. C. S.; MARTINS, G. N.; SILVA, R. F.; VIEIRA, H. D. Testes de vigor em sementes baseados no desempenho de plântulas. **InterScience Place**, v. 1, n. 4, 2009a.
- OLIVEIRA, A. F.; SOLDI, V.; COELHO, C. M. M.; MIQUELOTO, A.; COIMBRA, J. L. M. Preparação, caracterização e propriedades de filmes poliméricos com potencial aplicação no recobrimento de sementes. **Química Nova**, v. 32, n. 7, p. 1845-1849, 2009b.
- OLIVER, A. E.; CROWE, L. M.; CROWE, J. H.; Methods for dehydration-tolerance: depression of the phase transition temperature in dry membranes and carbohydrate vitrification. **Seed Science Research**, v. 8, n. 2, p. 211-221, 1998.
- ONU - ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS. Objetivos de Desenvolvimento Sustentável. Disponível em: <<https://brasil.un.org/pt-br/sdgs>>. Acesso em: 15 dez. 2021.
- OTONI, C. G.; AVENA-BUSTILLOS, R. J.; AZEREDO, H. M. C.; LOREVICE, M. V. MOURA, M. R.; MATTOSO, L. H. C.; MCHUGH, T. H. Recent advances on edible films based on fruits and vegetables—a review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 16, n. 5, p. 1151-1169, 2017.
- PABÓN-BAQUERO, D.; VELÁZQUEZ-DEL VALLE, M. G.; EVANGELISTA-LOZANO, S.; LEÓN-RODRÍGUEZ, R.; HERNÁNDEZ-LAUZARDO, A. N. Chitosan effects on phytopathogenic fungi and seed germination of *Jatropha curcas* L. **Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente**, v. 21, n. 3, p. 241-253, 2015.
- PARK, S. Y.; LEE, B. I.; JUNG, S. T.; PARK, H. J. Biopolymer composite films based on k-carrageenan and chitosan. **Materials Research Bulletin**, v. 36, p. 511-519, 2001.

- PATHAK, T. B.; MASKEY, M. L.; DAHLBERG, J. A.; KEARNS, F.; BALI, K. M.; ZACCARIA, D. Climate change trends and impacts on California agriculture: a detailed review. **Agronomy**, v. 8, n. 25, 2018.
- PAVINATTO, A.; MATTOS, A. V. A.; MALPASS, A. C. G.; OKURA, M. H.; BALOGH, D. T.; SANFELICE, R. C. Coating with chitosan-based edible films for mechanical/biological protection of strawberries. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 151, p. 1004-1011, 2020.
- PEÑA-DATOLI, W.; HIDALGO-MORENO, C.M.; GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, V.A.; ALCÁNTAR-GONZÁLEZ, E.G.; ETCHEVERS-BARRA, J.D. Recubrimiento de semillas de maíz (*Zea mays* L.) con quitosano y alginato de sodio y su efecto en el desarrollo radical. **Agrociencia**, v. 50, p. 1091-1106, 2016.
- PERES, W. L. R. **Testes de vigor em sementes de milho**. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, 2010.
- PINTO, N. F. J. A. Tratamento de sementes, uso de fungicidas e qualidade sanitária de grãos. In: 9º SEMINÁRIO NACIONAL DE MILHO SAFRINHA: RUMO À ESTABILIDADE, 9., 2007, Dourados, MS. **Anais [...]**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2007. p. 150-161. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/53830/1/Tratamento-sementes.pdf>. Acesso em: 17 jul. 2021.
- PIRZADA, T.; FARIAS, B. V.; MATHEW, R.; GUENTHER, R. H.; BYRD, M. V.; SIT, T. L.; PAL, L.; OPPERMAN, C. H.; KHAN, S. A. Recent advances in biodegradable matrices for active ingredient release in crop protection: towards attaining sustainability in agriculture. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 48, p. 121-136, 2020.
- PRAZERES, C. S.; COELHO, C. M. M. Hydration curve and physiological quality of maize seeds subjected to water deficit. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 38, n. 3, p. 1179-1186, 2017.
- RAMÍREZ, M. Á.; RODRÍGUEZ, A. T.; ALFONSO, L.; PENICHE, C. Chitin and its derivatives as biopolymers with potential agricultural applications. **Biotecnología Aplicada**, v. 27, n. 4, p. 270-276, 2010.
- RAY, D. K.; MUELLER, N. D.; WEST, P. C.; FOLEY, J. A. Yield trends are insufficient to double crop production by 2050. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, e66428, 2013.

- RODRÍGUEZ-NÚÑEZ, J. R.; MADERA-SANTANA, T. J.; SÁNCHEZ-MACHADO, D. I.; LÓPEZ-CERVANTES, J.; VALDEZ, H. S. Chitosan/Hydrophilic Plasticizer-Based Films: Preparation, Physicochemical and Antimicrobial Properties. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 22, p. 41-51, 2014.
- SAMARAH, N. H.; AL-QUAR00AAN, N. A.; MASSAD, R. S.; WELBAUM, G. E. Treatment of bell pepper (*Capsicum annuum* L.) seeds with chitosan increases chitinase and glucanase activities and enhances emergence in a standard cold test. **Scientia Horticulturae**, v. 269, 109393, 2020.
- SILVA, M. A. **Desenvolvimento e caracterização de filmes compostos de alginato e quitosana contendo natamicina como agente antimicótico**. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2009.
- SILVA, K. M. J.; PINHO, R. G. V.; PINHO, E. V. R. V.; OLIVEIRA, R. M.; SANTOS, H. O.; SILVA, T. S. Chemical treatment and size of corn seed on physiological and sanitary quality during storage. **Journal of Seed Science**, v. 42, e202042010, 2020.
- SILVA FILHO, J. N. F.; SILVA, L. R.; NUNES, G. S.; SILVA, R. D. R.; ALMEIDA, E. S.; BATISTA, J. B. Estudo do revestimento polimérico de quitosana x tempo de armazenamento de sementes de girassol orgânicas (*Helianthus Annus* L.). **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 1, p. 5908-5918, 2021.
- SILVA-CASTRO, I.; DIEZ, J. J.; MARTÍN-RAMOS, P.; PINTO, G.; ALVES, A.; MARTÍN-GIL, J.; MARTÍN-GARCÍA, J. Application of bioactive coatings based on chitosan and propolis for *Pinus* spp. protection against *Fusarium circinatum*. **Forests**, v. 9, n. 11, p. 685, 2018.
- STANLEY-RAJA, V.; SENTHIL-NATHAN, S.; CHANTHINI, K. M.; SIVANESH, H.; RAMASUBRAMANIAN, R.; KARTHI, S.; SHYAM-SUNDAR, N.; VASANTHA-SRINIVASAN, P.; KALAIVANI, K. Biological activity of chitosan inducing resistance efficiency of rice (*Oryza sativa* L.) after treatment with fungal based chitosan. **Scientific Reports**, v. 11, 20488, 2021.
- STATSOFT, INC. (2004). STATISTICA (data analysis software system), version 7. www.statsoft.com.
- TOLEDO, F. F.; NOVENBRE, A. D. L. C.; CHAMMA, H. M. C. P.; MASCHIETTO, R. W. Vigor de sementes de milho (*Zea mays* L.) avaliado pela precocidade de emissão da raiz primária. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 56, n. 1, p. 191-196, 1999.

- VERCELHEZE, A. E. S.; MARIM, B. M.; OLIVEIRA, A. L. M.; MALI, S. Development of biodegradable coatings for maize seeds and their application for *Azospirillum brasilense* immobilization. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 103, p. 2193-2203, 2019.
- VIANA, A. R. S.; MAGALHÃES, P. C.; GOMES JÚNIOR, C. C.; MARQUES, D. M.; NETTO, D. A. M. Aplicação da quitosana como pré-condicionamento (prime) na indução de tolerância à seca na germinação de sementes de milho. *In: XIII SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA PIBIC/CNPq*, 13., 2018, Sete Lagoas. **Trabalhos apresentados** [...]. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2018. Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/192926/1/Aplicacao-quitosana.pdf>. Acesso em: 17 jul. 2021.
- VOX, G.; SANTAGATA, G.; MALINCONICO, M.; IMMIRZI, B.; MUGNOZZA, G. S.; SCHETTINI, E. Biodegradable films and spray coatings as eco-friendly alternative to petro-chemical derived mulching films. **Journal of Agricultural Engineering**, v. 44, n. s2, e44, 2013.
- WAHBA, M. I. (2020). Enhancement of the mechanical properties of chitosan. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 31, n. 3, p. 350-375, 2020.
- ZENG, D.; MEI, X.; WU, J. Study and preparation of an environmentally friendly corn seed coating agent. **Journal of Plant Protection Research**, v. 50, n. 2, p. 210-214, 2010.
- ZENG, D.; LUO, X.; TU, R. Application of bioactive coatings based on chitosan for soybean seed protection. **International Journal of Carbohydrate Chemistry**, v. 2012, 104565, 2012.
- ZHONG, K.; LIN, Z.; ZHENG, X.; JIANG, G.; FANG, Y.; MAO, X.; LIAO, Z. Starch derivative-based superabsorbent with integration of water-retaining and controlled-release fertilizers. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, p. 1367-1376, 2013.
- ZIANI, K.; URSÚA, B.; MATÉ, J. I. Application of bioactive coatings based on chitosan for artichoke seed protection. **Crop Protection**, v. 29, p. 853-859, 2010.