

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes



Tese

Teste do etanol: desenvolvimento de equipamento para determinação do vigor em
sementes de soja

Jerffeson Araujo Cavalcante

Pelotas, 2021

Jerffeson Araujo Cavalcante

Teste do etanol: desenvolvimento de equipamento para determinação do vigor em sementes de soja

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Dario Munt de Moraes

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Gizele Ingrid Gadotti

Pelotas, 2021

Jerffeson Araujo Cavalcante

Teste do etanol: desenvolvimento de equipamento para determinação do vigor em sementes de soja

Tese aprovada, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências, Programa de Pós-Graduação Ciência e Tecnologia de Sementes, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa:

Banca examinadora:

Prof. Dr. Dario Munt de Moraes (Orientador)

Doutor em Agronomia pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Gizele Ingrid Gadotti

Doutora em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

Dr. Ricardo Miotto Ternus

Doutor em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Francisco Amaral Villela

Doutor em Fitotecnia pela Universidade Federal de São Paulo

Prof. Dr. Adamo, de Sousa Araujo

Doutor em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

C376t Cavalcante, Jerffeson Araujo

Teste do etanol: desenvolvimento de equipamento para determinação do vigor em sementes de soja / Jerffeson Araujo Cavalcante ; Dario Munt de Moraes, orientador ; Gizele Ingrid Gadotti, coorientadora. — Pelotas, 2021.

69 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2021.

1. Sensor. 2. Qualidade de fisiológica. 3. Metabolismo anaeróbico. 4. *Glycine max* L.. I. Moraes, Dario Munt de, orient. II. Gadotti, Gizele Ingrid, coorient. III. Título.

CDD : 631.521

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

***Dedico este trabalho a Deus, aos meus pais
e a toda minha família e amigos.***

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, que me concedeu a oportunidade de estudar e realizar este sonho, e por ter me dado sabedoria, discernimento e força para concluir o doutorado.

A minha família, em especial aos meus pais, irmãos e sobrinhos queridos, que estiveram sempre presente ao longo desta caminhada, onde acompanharam momentos de aflição e alegria, dando força e palavras de conforto que me fizeram manter a perseverança e nunca cair diante da saudade.

Ao meu orientador Dario Munt de Moraes, pela orientação, ensinamentos transmitidos, confiança e incentivo na realização deste trabalho.

A minha coorientadora Gizele Ingrid Gadotti, pelas contribuições, ajuda e inestimada dedicação, principalmente por acreditar no meu trabalho e na minha capacidade de luta para alcance de ideais, uma verdadeira mãe acadêmica.

Aos membros da banca examinadora, por todos os ensinamentos durante as discussões.

À Universidade Federal de Pelotas, à Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, em especial aqueles funcionários e professores que contribuíram de forma positiva no meu desenvolvimento pessoal e de obtenção de novos conhecimentos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa e auxílio de custos para o desenvolvimento de experimentos.

Aos meus estimados amigos de vida, que não são poucos, na qual não irei citar nomes, para não ser injusto. Mas deixo aqui um imenso obrigado por me ajudarem, principalmente nos momentos de frio e saudades de casa.

Aos colegas deste percurso, em especial meus amigos de doutorado, obrigado pela amizade e auxílio na execução dos experimentos.

Aos amigos que me ajudaram a conduzir as análises, em especial a Raimunda Silva, Matheus Gatto, Augusto Maciel, Pedro Brizolara, André Capilheira, Joseano Silva,

Robson Olegário, Fernanda Sedrez, Naiane Reys, Ariele Nadal, Fabiane Kletke e Romário Mesquita.

Aos amigos do Laboratório de Agrotecnologia (prédio 33), obrigado imensamente pelo carinho e apoio na condução do trabalho.

Enfim, agradeço veementemente a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para que eu chegasse a realização desse sonho.

Não sou nem otimista, nem pessimista. Os otimistas são ingênuos, e os pessimistas amargos. Sou um homem da esperança. Sei que é para um futuro muito longínquo, mas sonho com o dia em que o sol de Deus vai espalhar justiça pelo mundo inteiro.

(SUASSUNA, 2009)

Resumo

CAVALCANTE, Jerffeson Araujo. **Teste do etanol: desenvolvimento de equipamento para determinação do vigor em sementes de soja**. 2021. 69 f. Tese (Doutorado em Ciência) – Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Semente, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2021.

Nos testes para a avaliação do vigor em sementes é essencial que estes sejam rápidos, eficientes e padronizáveis, incluindo testes que permitam diferenciação precisa entre lotes. Dentre estes testes, o do etanol constitui-se em uma alternativa que aporta característica desejáveis para ser aplicado nos programas de controle interno de qualidade de empresas produtoras de sementes, devido o mesmo ser prático e rápido. Porém, o teste é realizado com equipamentos adaptados, necessitando de um equipamento próprio, com uso de sensores de alta precisão, que venham a garantir a confiabilidade dos resultados. Assim, objetivou-se desenvolver um equipamento capaz de quantificar a presença de etanol produzido por sementes de soja quando submetidas à hipóxia por diferentes tempos de embebição, com o intuito de comparar os resultados obtidos pelo novo equipamento com outros testes padrões de vigor, além de avaliar o metabolismo fermentativo durante o teste do etanol. O trabalho foi dividido em dois capítulos e em ambos utilizando delineamento experimental inteiramente casualizado, sendo os tratamentos compostos 10 lotes de sementes de soja. O Capítulo I foi dividido em dois experimentos, o primeiro correspondendo ao desenvolvimento do equipamento de aferição do etanol com o sensor MQ-3 e seus componentes e o segundo relacionado ao tempo de estabilização do sensor (3; 6; 9; 12; 15; 18; 21; 24; 27 e 30 segundos) em sementes de soja submetidas ao processo de anaerobiose. No Capítulo II, inicialmente, avaliou-se a qualidade inicial dos lotes por meio da avaliação de teor de água, germinação, emergência de plântulas, envelhecimento acelerado, teste de tetrazólio, condutividade elétrica e respiração das sementes. Para o teste do etanol foram utilizadas 25 sementes sem danos físicos aparentes e acondicionadas em frascos de 150 mL, contendo 40 mL de água deionizada. Posteriormente, as sementes permaneceram embebidas pelos períodos de 30, 60, 90, e 120 minutos a uma temperatura de 41 °C em BOD. Após os períodos de embebição, os frascos foram acoplados no equipamento desenvolvido no capítulo I e mensurado a quantidade de etanol liberada pelas sementes. O equipamento, bem como o sensor MQ-3 obteve desempenho satisfatório, apresentando estabilidade de aferição média aos 16 segundos após, sendo recomendado esse tempo para o uso do etilômetro em sementes de soja. Por meio desse mesmo sensor MQ-3, é possível, com eficiência, a detecção de etanol presente no ar liberado por sementes de soja durante processo de anaerobiose. O teste do etanol em sementes de soja é eficiente no ranqueamento dos lotes em diferentes níveis de vigor, utilizando o tempo de embebição de 30 minutos, sendo este tempo apresentando associação moderada entre o teste de condutividade elétrica e a respiração das sementes. A atividade das enzimas LDH, PDC e ADH comprovam que há a produção de etanol durante o processo de embebição das sementes de soja.

Palavras-chave: Sensor, qualidade de fisiológica, metabolismo anaeróbico, *Glycine max* L.

Abstract

CAVALCANTE, Jerffeson Araujo. **Ethanol test: develop of equipment to determination of vigor in soybean seeds**. 2021. 69 f. Dissertation (Doctor of Science) – Postgraduate Program in Science and Technology, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2021.

In tests for assessing vigor in seeds, they must be fast, efficient, and standardized, including tests that allow precise differentiation between lots. Among these tests, the ethanol one appears as an alternative that provides desirable characteristics to be applied in the internal quality control programs of seed-producing companies because it is practical and fast. However, the test is performed with adapted equipment, requiring its equipment, using high-precision sensors, which will guarantee the reliability of the results. Thus, to develop equipment capable of quantifying the presence of ethanol produced by soybean seeds when subjected to hypoxia for different soaking times, to compare the results obtained by the new equipment with other standard vigor tests and evaluate the metabolism fermentation during the ethanol test. The work was divided into two chapters, and both used a completely randomized experimental design, with treatments consisting of 10 lots of soybean seeds. Chapter I was divided into two experiments, the first corresponding to the development of equipment for measuring ethanol with the MQ-3 sensor and its components and the second related to the sensor stabilization time (3; 6; 9; 12; 15; 18; 21; 24; 27 and 30 seconds) in soybean seeds submitted to the anaerobic process. Chapter II initially evaluated the initial quality of the lots by testing water content, germination, seedling emergence, accelerated aging, tetrazolium test, electrical conductivity, and seed respiration. For the ethanol test, 25 seeds without physical damage were used and placed in 150 mL flasks containing 40 mL of deionized water. Subsequently, the seeds remained soaked for 30, 60, 90, and 120 minutes at a temperature of 41 °C in BOD. After this period, the flasks were attached to the equipment developed, and ethanol released by the seeds was measured. The equipment and the MQ-3 sensor had a satisfactory performance, showing the stability of average measurement after 16 seconds. This time is recommended for the use of the breathalyzer in soybean seeds. Through this same MQ-3 sensor, it is possible to efficiently detect ethanol present in the air released by soy seeds during the anaerobic process. The application of the ethanol test in soybean seeds is efficient in ranking the lots at different vigor levels when the soaking time of 30 minutes is used, showing a moderate association between the electrical conductivity test and seed respiration. The activity of the enzymes LDH, PDC and ADH proves that there was the production of ethanol during the soaking process of soybean seeds.

Keywords: Sensor, Physiological Quality, Anaerobic Metabolism, *Glycine max* L.

Lista de figuras

- Figura 1** – Resumo do processo metabólico da glicólise e das reações fermentativas que ocorrem no citosol celular (TAIZ et al., 2017).....22
- Figura 2** – Esquema da placa do sistema utilizado para a produção do equipamento.33
- Figura 3** – Croqui do etilômetro para análise de sementes de soja. A: frasco A; B: frasco B; C: sistema eletrônico; D: Sensor; E: ampola; F; registro central; G: água; H: semente de soja; I: protótipo do equipamento.....34
- Figura 4** – Tempo médio de estabilização do sensor MQ-3 Datasheet de quatro pinos para medição de etanol em 10 lotes de sementes de soja submetidas à hipóxia.....37
- Figura 5** – Testes do etanol com diferentes tempos de embebição (A – 30 min; B – 60 min; C – 90 min; D – 120 min) das sementes de diferentes lotes de soja fazendo uso de equipamento sujeito a obtenção de patente.47
- Figura 6** – Dispersão gráfica da correlação entre o teste do etanol e o teste de condutividade elétrica, na qual para ambos os testes, as sementes foram submetidas a diferentes tempos de embebição (30, 60, 90 e 120 minutos).49
- Figura 7** – Análise dos Componentes Principais (PCA) via bipolot para demonstrar a projeção das variáveis dos dois componentes principais, qualidade inicial (germinação – GER; emergência de plântulas - EME, envelhecimento acelerado - EA, teste de tetrazólio - TZ, condutividade elétrica - CE e respiração - RES) e teste do etanol (ETA) com diferentes tempos de embebição (30 - ETA30, 60 - ETA60, 90 - ETA90 e 120 minutos - ATA120).....51
- Figura 8** – Atividade da lactato desidrogenase (LDH - A), álcool desidrogenase (ADH - B) e piruvato descarboxilase (PDC - C) de sementes de soja oriundas de diferentes lotes, previamente submetidos a diferentes tempos de embebição no teste do etanol (30, 60, 90 e 120 minutos).....52

Lista de tabelas

Tabela 1 – Teor de água (TA), germinação (GER), emergência de plântulas (EP), envelhecimento acelerado (EA), teste de tetrazólio (TZ), condutividade elétrica (CE) e respiração (RES) de dez lotes de sementes de soja.....45

Tabela 2 – Correlação de Pearson entres o teste do etanol e as enzimas lactato desidrogenase (LDH), piruvato descarboxilase (PDC) e álcool desidrogenase (ADH) de sementes de previamente submetidos a diferentes tempos de embebição (30, 60, 90 e 120 minutos).....54

Lista de abreviaturas e siglas

ADH	Álcool Desidrogenase
AOSA	Associação Oficial dos Analistas de Sementes dos Estados Unidos
AR	Atividade Respiratória
ATP	Adenosina Trifosfato
BOD	<i>Biochemical Oxygen Demand</i>
CE	Condutividade Elétrica
CO ₂	Dióxido De Carbono
COV	Compostos Orgânicos Voláteis
CV	Coeficiente De Variação
DTT	Ditiotreitol
EA	Envelhecimento Acelerado
EP	Emergência de Plântulas
ETA	Etanol
FTIR	Infravermelho por Transformada de Fourier
GER	Germinação
GND	<i>Graduated Neutral Density</i>
HCL	Ácido Clorídrico
LCD	<i>Liquid Crystal Display</i>
LDH	Lactato Desidrogenase
LED	<i>Light Emitting Diode</i>
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MES	Tampão
N ₂	Nitrogênio Líquido
NAD ⁺	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Reduzido
O ₂	Oxigênio
OSU	Universidade Estadual de Ohio
PDC	Piruvato Descarboxilase
pH	Potencial Hidrogeniônico
PVPP	Polivinilpolipirrolidona
PWM	<i>Pulse Widht Modulation</i>

RES	Respiração
SVIS	<i>Seed Vigor Image System</i>
TA	Teor de Água
TZ	Teste de Tetrazólio
UR	Umidade Relativa
V	Volts
VCC	<i>Volt Direct Current</i>
VCCo	<i>Voltage Common Collector</i>
VI	<i>Voltage In</i>
VO	<i>Voltage Out</i>

Sumário

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 A cultura da soja	16
2.2 Testes de vigor	17
2.3 Uso de equipamentos para determinar o vigor de sementes.....	19
2.4 Teste do etanol	21
2.4.1 Fundamentos fisiológicos e bioquímicos do teste do etanol	21
2.5.1 Uso de sensor MQ-3	23
2.5.2 Aplicabilidade do teste do etanol.....	24
Capítulo 1 – Desenvolvimento de equipamento e estabilização de sensor MQ-3 para aferição de etanol em sementes de soja	26
1 Introdução	26
2 Material e métodos	27
2.1 Experimento I.....	27
2.1.1 Sistema de alimentação	28
2.1.2 Arduino e Microcontrolador	28
2.1.3 Display	28
2.1.4 Sensor de temperatura e umidade.....	28
2.1.5 Sensor de gás etanol	29
2.1.6 Produtos diversos.....	29
2.1.7 Montagem simplificada dos componentes do equipamento.....	29
2.2 Experimento II.....	29
3 Resultados e discussão	30
3.1 Experimento I.....	30
3.1 Experimento II.....	35
4 Conclusões	38
Capítulo 2 – Vigor e metabolismo anaeróbico de sementes de soja avaliadas pelo teste do etanol	39
1 Introdução	39
2 Material e métodos	40

3 Resultados e discussão.....	44
4 Conclusões	56
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS	57
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

1 INTRODUÇÃO

Para o sucesso no cultivo da soja no campo, vários fatores devem ser levados em consideração, desde o manejo do solo, controle de doenças, o posicionamento de cultivares, o clima, e não menos importante, o uso de sementes com qualidade fisiológica superior, que é primordial para se obter altos índices de produtividade e, por isso, o controle de qualidade interno de sementes deve ser cada vez mais eficiente, incluindo testes que avaliem rapidamente o potencial fisiológico e que permitam a diferenciação precisa entre lotes (FESSEL et al., 2010).

Nesse contexto, avaliações rápidas, que permitam a obtenção de informações sobre a qualidade fisiológica das sementes, são muito importantes no processo de tomada de decisão nas diferentes etapas da produção. Porém, os testes de vigor disponíveis, que poderiam detectar rapidamente diferenças de vigor, apresentam variações de confiabilidade e na sua aplicabilidade às culturas individualmente (BUCKLEY; HUANG, 2012).

No Brasil, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), órgão responsável pela regulamentação da produção e comercialização de sementes, estabelece uma porcentagem mínima de plântulas normais no teste de germinação, para que um lote de sementes esteja apto a ser comercializado (BRASIL, 2015). Contudo, lotes com germinação semelhantes podem apresentar diferentes resultados de emergência de plântulas no campo, devido a diferentes níveis de vigor. Apesar de não haver padrão mínimo de vigor estabelecido por lei, garantir uma semente de alta qualidade aumenta a credibilidade não só da empresa produtora, mas também de todo o setor sementeiro. Deste modo, os testes de vigor tornam-se ferramentas cada vez mais adotadas pelas empresas produtoras de sementes para a determinação do potencial fisiológico e, dentre eles, os mais utilizados são: teste de tetrazólio, envelhecimento acelerado e emergência em campo (SANTOS et al., 2011).

Todavia, os testes de envelhecimento acelerado e emergência em campo são baseados na formação de plântulas normais e requerem, dependendo da espécie, um período de cinco a dez dias para obtenção dos resultados, tempo demasiadamente longo, visto que a rapidez na avaliação da qualidade fisiológica das sementes agiliza as tomadas de decisões nas etapas de produção no campo,

beneficiamento, armazenamento e comercialização (MENEZES et al., 1994; BRASIL, 2009).

Um método promissor, capaz de diferenciar lotes com distintos níveis de vigor, é o teste do etanol. Buckley; Huang (2011), realizando o teste do etanol em sementes de repolho, observaram que as sementes com maior nível de vigor apresentaram menor produção de etanol, em comparação com as sementes de menor vigor.

O teste do etanol baseia-se na teoria da fermentação alcoólica, onde as duas enzimas, descarboxilase do piruvato e desidrogenase do álcool agem sobre o piruvato, produzindo etanol e CO₂ e oxidando NADH no processo. A desidrogenase do álcool e a desidrogenase do lactato são essenciais para operar o ciclo glicolítico sobre condições anaeróbicas, porque elas reciclam NAD⁺, reduzindo piruvato a etanol ou lactato (TAIZ et al., 2017).

Mesmo sendo um método promissor, o teste do etanol limita-se a metodologias passíveis de aprimoramento visto que utiliza de métodos de aferições a partir de equipamentos adaptados, como é o caso de trabalhos realizados com sementes de azevém e feijão (CAVALCANTE et al., 2017; CAVALCANTE et al., 2019), que utilizaram equipamentos adaptados, suscetíveis a variações. Desta forma, torna-se essencial o desenvolvimento de um equipamento específico, que seja simples, eficiente e de preferência, portátil, que facilite o dia-a-dia dos produtores de sementes no momento de avaliar o vigor de nas diferentes etapas do processo de produção. Para tanto, além de produzir o equipamento, é necessário determinar o tempo em que o sensor de gás, presente no equipamento, para que se tenha confiabilidade nos resultados mensurados.

Diante do exposto, objetivou-se desenvolver um equipamento por meio de um sensor MQ-3, capaz de quantificar a presença de etanol produzido por sementes de soja quando submetidas à hipóxia por diferentes tempos de embebição, com o intuito de comparar os resultados obtidos pelo novo equipamento com outros testes de vigor empregados como referência, além de avaliar o metabolismo fermentativo durante o teste do etanol.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A cultura da soja

A soja (*Glycine max* L.) é uma fabacea herbácea anual, cujo alto teor proteico de seus grãos e ampla adaptação aos diversos componentes do meio natural, fruto de investimento intensivo em tecnologia, a coloca entre as principais matérias-primas para produção de proteína alimentar no mundo, sendo a mais cultivada. A matéria-prima da soja é empregada como forrageira na alimentação e no adubo verde. O óleo extraído do seu grão é utilizado na alimentação humana, produção de biodiesel e lubrificantes. O farelo é importante na alimentação humana e animal e na fabricação de produtos (BEZERRA et al., 2015).

Nos últimos anos a soja tornou-se a mais importante espécie cultivada no mundo. Esta aleurooleaginosa constitui objeto de intensa pesquisa, visando o aumento da produtividade de grãos (BORNHOFEN et al., 2015). No Brasil, é uma cultura de extrema importância socioeconômica, gerando uma grande quantidade de empregos diretos e indiretos, a qual promove o desenvolvimento de muitas regiões em todas as partes do país. Atualmente, levando em consideração as últimas duas safras, o Brasil destaca-se como o maior produtor mundial de grãos de soja. Na safra 2020/2021, o bom desenvolvimento da cultura nas diversas regiões produtoras do país promoveu um incremento de produção de 8,9% em comparação a produção obtida na safra anterior, à produção de grãos em aproximadamente 136 milhões de toneladas (CONAB, 2021).

A sojicultura teve rápida expansão no Brasil, devido ao seu valor econômico e graças ao seu desenvolvimento, por meio de melhoramento genético de novas cultivares mais adaptadas às condições do país. No entanto, lotes de sementes mais vigorosas proporcionam elevadas produtividades, fazendo com que ocorra um estabelecimento adequado da cultura e a consecução de rendimentos satisfatórios (SCHEEREN et al., 2010). Com isso, a utilização de sementes com valor agregado, com qualidade fisiológica, física e sanitária faz com que o potencial produtivo desta espécie seja alcançado (SILVA et al., 2014).

Assim, dada a importância da semente, é necessário que se tenha no mercado este insumo apresentando qualidade superior para suprir esta demanda. Para isso, as sementeiras têm adotado um controle e interno de qualidade cada vez

mais eficiente e organizado, principalmente no âmbito de verificar a qualidade fisiológica das sementes ao longo das etapas de produção.

Diante da necessidade e rigorosidade no controle de qualidade das empresas produtoras de sementes, existe a necessidade do desenvolvimento novos de testes para a avaliação do vigor em sementes ou o aperfeiçoamento de testes já existentes, bem como a padronização destes, é essencial para a constituição de um eficiente controle de qualidade na cadeia produtiva. Estes devem ser cada vez mais eficientes, incluindo testes que avaliem rapidamente o potencial fisiológico e que permitam classificar os lotes em níveis de vigor (FESSEL et al., 2010).

2.2 Testes de vigor

De acordo com a Associação Oficial dos Analistas de Sementes dos Estados Unidos (AOSA, 2009), o vigor em sementes é definido como, aquelas propriedades das sementes que determinam o seu potencial para uma emergência rápida e uniforme e o desenvolvimento de plântulas normais sob ampla diversidade de condições de ambiente. Nesse sentido, o vigor das sementes é um fator responsável principalmente pela garantia de estabelecimento da população de plantas desejada, sendo esse um importante componente da produção, favorecendo uma maior velocidade e uniformidade na emergência das plântulas (EBONE et al., 2020).

Na implantação de uma lavoura, o vigor das sementes deve ser considerado como um dos principais atributos da qualidade fisiológica, pois plantas formadas a partir de sementes mais vigorosas possuem vantagens competitivas desde o início da emergência (BAGATELI et al., 2019). Segundo Marcos Filho (2015a), sementes com baixo vigor podem apresentar redução no crescimento, na porcentagem de emergência de plântulas, na velocidade de germinação de sementes, desuniformidade no desenvolvimento de plântulas, assim como aumento da taxa de anormalidade das mesmas. Ademais, esses fatores esses que podem influenciar a acumulação de matéria seca, e assim afetar o rendimento (KOLCHINSKI et al., 2005).

Empregar lotes de sementes com baixa qualidade fisiológica proporciona perdas consideráveis e perceptíveis, ainda na implantação da cultura, uma vez que o estabelecimento do estande de plantas pode ser prejudicado (SCHEEREN et al., 2010). Além disso, o crescimento inicial das plantas de soja oriundas desses lotes

de sementes possui uma tendência a inferioridade, devido a menor formação de massa seca (BAGATELI et al., 2019).

Contudo, a avaliação da qualidade fisiológica de sementes torna-se uma etapa fundamental para programas de produção, sendo utilizada como uma estratégia primordial no controle interno da qualidade, a fim de determinar o desempenho de cultivares e lotes, sendo a mensuração deste conjunto de testes, avaliada pela associação entre viabilidade e vigor (DELARMELENO, 2012).

A qualidade fisiológica da semente é avaliada rotineiramente pelo teste de germinação que, conduzido sob condições ótimas de ambiente, fornece o potencial máximo de germinação, estabelecendo o limite para o desempenho do lote após a sua semeadura (BRASIL, 2009). Entretanto, em razão de suas limitações, principalmente quanto à menor sensibilidade para a diferenciação da qualidade e à frequente discrepância dos resultados como emergência das plântulas em campo, são necessários também os resultados obtidos nos testes de vigor, tais como o teste de tetrazólio, comprimento de plântulas, envelhecimento acelerado e teste de condutividade elétrica (AMARO et al., 2014).

O teste de tetrazólio apresenta eficiência e rapidez na avaliação do vigor de sementes, onde baseia-se na atividade das enzimas desidrogenases que estão associadas no processo de respiração, assim a hidrogenação do 2-3-5-trifenil cloreto de tetrazólio, favorece a produção de uma substância vermelha nas células vivas, onde permite diferenciar as partes vivas (coloridas de vermelho carmim) das mortas (branca-leitosa), conforme abordado por França Neto; Krzyzanowski (2019).

O comprimento de plântulas é um teste que envolve a mensuração do comprimento das diferentes estruturas das plântulas, ou seja, raiz primária, hipocótilo, epicótilo ou plúmula, que se formam logo após o teste de germinação. Logo, as amostras que apresentarem maiores valores serão as mais vigorosas, sendo este fato uma consequência de sementes vigorosas produzir plântulas com maior taxa de crescimento, devido apresentar maior translocação de reservas dos seus tecidos de armazenamento para o crescimento do eixo embrionário. Uma das vantagens inerentes a esse teste é o fato de ser realizado a um baixo custo, relativamente rápido e principalmente por não ser necessária a utilização de equipamentos especiais ou treinamento específico para a realização (GUEDES et al., 2009).

O teste de envelhecimento acelerado possui diversas metodologias, sendo os fatores de variação entre elas a temperatura e o tempo de acondicionamento das caixas tipo “gerbox” em câmara BOD. Tal teste tem como princípio a exposição das sementes de um determinado lote a condições de alta temperatura e umidade, visando à avaliação posterior do desempenho das mesmas, o qual refletirá seu potencial de armazenamento, além de estar diretamente relacionado com seu vigor (AOSA, 2009, MARCOS FILHO, 2020).

A condutividade elétrica avalia indiretamente a intensidade dos danos causados às membranas celulares, resultantes do processo de deterioração da semente. As sementes são embebidas em água destilada, sob temperatura controlada, durante um período pré-estabelecido e as leituras dos valores de condutividade elétrica das soluções de imersão medem a intensidade da corrente elétrica entre dois pontos, determinada pela quantidade de lixiviados, portanto, sementes com menor vigor, em consequência da menor estruturação e seletividade das membranas liberam maior quantidade de lixiviados (SILVA et al., 2014).

No entanto, diversos fatores podem afetar a eficiência do teste em classificar os lotes em níveis de vigor e influenciar os resultados do mesmo, como o genótipo, a desestruturação das membranas, o volume de água, tamanho e número das sementes da amostra, temperatura, tempo de embebição e metodologias (CATÃO; CAIXETA, 2019).

O aumento de estudos voltados para a compreensão do vigor tem estimulado a investigação dos componentes bioquímicos e na função destes sobre a qualidade fisiológica das sementes (ANDRADE et al., 2020). O avanço da tecnologia e da computação tem demonstrado potencial na obtenção de informações, que a partir de vibrações moleculares possibilita inferir sobre as moléculas presentes na amostra (LARIOS et al., 2020).

2.3 Uso de equipamentos para determinar o vigor de sementes

Dentre as técnicas de controle de qualidade, destacam-se os trabalhos de aprimoramento dos diversos testes de vigor, e tem despertado interesse do setor produtivo na utilização destas técnicas, visando produção de sementes com qualidade mais elevada (FRANÇA NETO, 2016).

A análise computadorizada de plântulas reflete progresso na otimização do tempo, e minimização de incertezas das análises, porém é pouco influenciada pelo analista, ocasionando tomadas de decisões mais precisas e ágeis. No entanto, essa ferramenta de avaliação de vigor de sementes por meio de análise de plântulas e sementes, ainda é primária, havendo a necessidade de calibração de equipamentos e padronização dos testes (ALVARENGA et al., 2012). Porém, equipamentos de espectroscopia, escâner, radiografado e etilômetro tem sido utilizado para diminuir o tempo de execução dos testes de vigor e mitigar erros interpretativos.

O método de espectroscopia óptica avalia o modo vibracional das moléculas presentes na amostra de sementes, levando a formação de perfis de espectro, e estes, necessitam de técnicas que ressaltem informações quantitativas e qualitativas (ALCANTARA et al., 2010). Entre eles, pode-se citar a técnica de espectroscopia óptica no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), utilizado para identificar, caracterizar e quantificar elementos presentes na amostra, por meio da vibração emitida pelas moléculas, que apresentam estrutura, composição e modo de vibração específicas (SILVA et al., 2007).

Na Universidade Estadual de Ohio – OSU, nos Estados Unidos, Sako et al. (2001) desenvolveram um sistema de avaliação de vigor (SVIS – *Seed Vigor Image System*) que, através de imagens digitais capturadas por um scanner, determina o vigor das sementes. Inicialmente o SVIS foi utilizado na avaliação do vigor de sementes de alface, posteriormente estudos verificaram a utilização bem-sucedida do software para diversas espécies, tais como milho, trigo, amendoim, girassol, soja, pepino, melão e crotalária.

Uma das vantagens da utilização do SVIS é o tempo para obtenção dos resultados, onde são utilizadas plântulas de apenas três dias de idade para gerar o índice de vigor, sendo menor do que o requerido para a realização do teste manualmente (HOFFMASTER et al., 2003). De acordo com Gomes Junior et al. (2009), os resultados para uma amostra de 50 sementes podem ser obtidos em aproximadamente três minutos. Vale apenas ressaltar outras vantagens desse sistema, que incluem a eliminação do erro humano, aumentando a confiabilidade dos dados para fins de comparação de diferentes lotes de sementes e a possibilidade de arquivamento das imagens para posterior análise (ALVARENGA et al., 2012).

Os pesquisadores da área de análise de sementes também têm utilizado equipamentos adaptados de raios X, na qual se faz uso de imagens radiografadas a fim de identificar problemas latentes (GOMES JUNIOR, 2010). Neste sentido, a captura e o processamento da imagem radiografada têm permitido o estabelecimento de relações entre integridade, morfologia e determinação da germinação das sementes (MARCOS FILHO et al., 2010).

No entanto, a maioria dos equipamentos não são portáteis e alguns necessitam de plântulas para serem aplicados, o que demandaria um tempo relativamente longo até que as plântulas estivessem totalmente formadas. Em contrapartida, o teste do etanol pode ser uma alternativa frente a estas limitações, já que faz uso de equipamentos portáteis e pode prever o processo de deterioração antes mesmo da germinação. O teste baseia-se nos princípios iniciais de deterioração da semente, onde a incapacidade das mitocôndrias de processar o piruvato da glicólise e algumas reações enzimáticas, resultam em reações de fermentação alcoólica, em que o piruvato descarboxilase e a álcool desidrogenase atuam no piruvato, liberando etanol e CO_2 , e oxidando NADH (KODDE et al., 2012).

2.4 Teste do etanol

2.4.1 Fundamentos fisiológicos e bioquímicos do teste do etanol

O teste do etanol baseia-se na teoria da fermentação alcoólica na qual as duas enzimas descarboxilase do piruvato e desidrogenase do álcool agem sobre o piruvato, produzindo etanol e CO_2 e oxidando NADH no processo. A desidrogenase do álcool e a desidrogenase do lactato são essenciais para operar o ciclo glicolítico em condições anaeróbicas, porque elas reciclam NAD^+ , reduzindo piruvato a etanol ou lactato (Figura 1). Esse processo de acúmulo de etanol envolve a oxidação do NADH e resulta em pequena, mas essencial, produção de ATP para a sobrevivência de algumas espécies durante a ausência de oxigênio. Durante as primeiras horas da germinação, as sementes são impermeáveis ao oxigênio, logo, elas rapidamente geram um aumento no coeficiente respiratório, incrementa a atividade da desidrogenase do álcool e ativa a fermentação alcoólica (TAIZ et al., 2017).

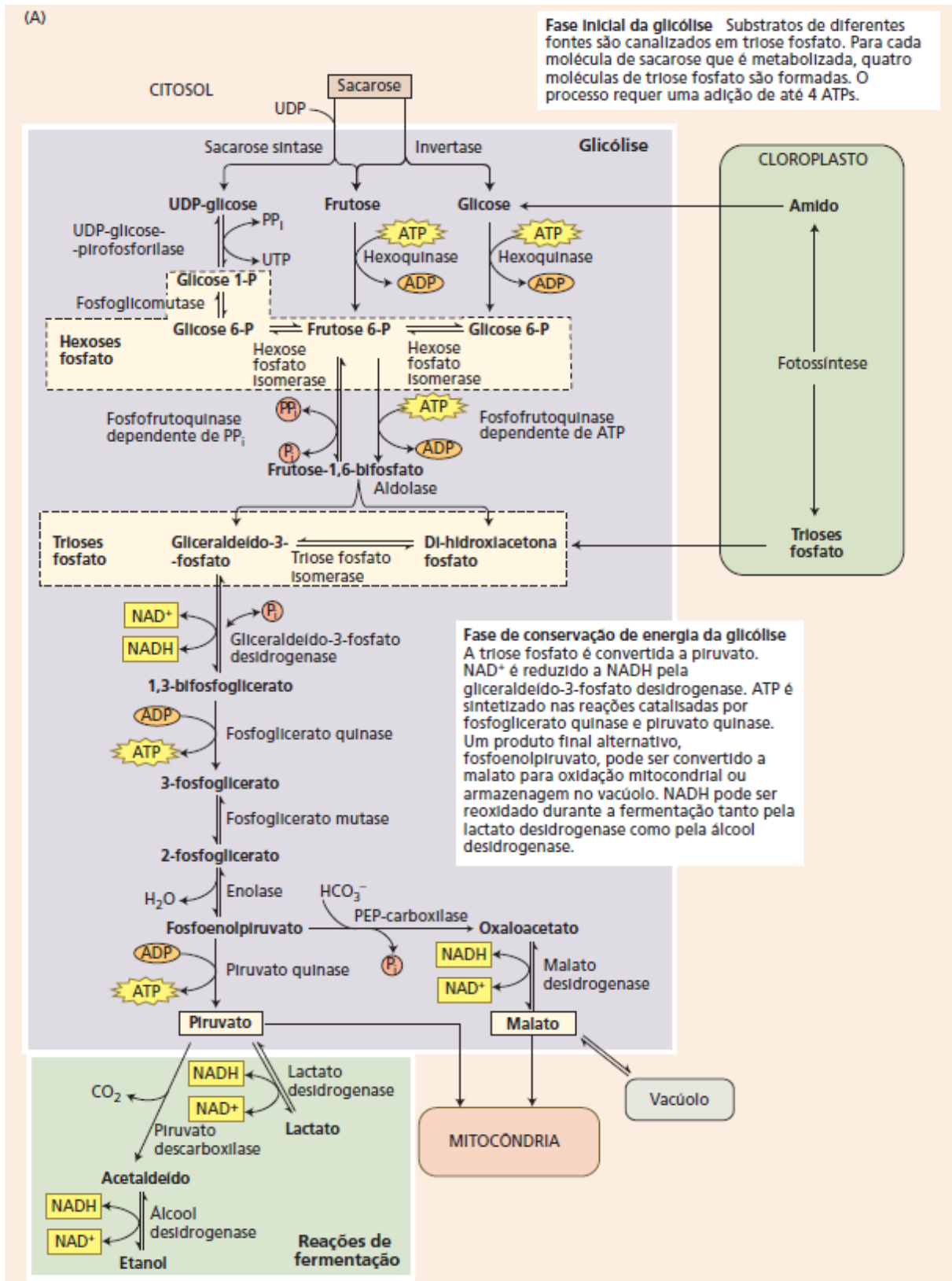


Figura 1 – Resumo do processo metabólico da glicólise e das reações fermentativas que ocorrem no citosol celular (TAIZ et al., 2017).

As alterações no metabolismo do etanol são indicadores da deterioração em sementes. Essas mudanças no metabolismo do etanol se apresentam provavelmente relacionadas a um declínio na função mitocondrial resultante da oxidação da membrana, que por sua vez ocasiona na menor produção de NAD⁺ e limitando a capacidade de degradar o etanol (KODDE et al., 2012).

Neste contexto, sementes menos vigorosas tendem a apresentar membranas com menor integridade, portanto facilitando a maior liberação do etanol em comparação a sementes mais vigorosas e, conseqüentemente, sua quantificação pode fornecer importantes informações sobre problemas fisiológicos relacionados à deterioração de sementes (BUCKLEY et al., 2016).

2.5.1 Uso de sensor MQ-3

Um dos principais sensores utilizados para determinar a presença de etanol no ambiente é o MQ-3. Sahu et al. (2017) afirmam que o sensor de gás MQ-3 é adequado para detectar a presença de etanol, podendo este ser utilizado em bafômetros, bem como em equipamentos que venham proporcionar, com confiabilidade, a presença de etanol em um determinado local.

Em geral, os sensores MQ-3 apresentam alta sensibilidade para álcool e pequena sensibilidade para benzeno. Quando o etanol está presente no ar, a condutividade do sensor aumenta junto com aumento da concentração de gás, um circuito simples converte a mudança de condutividade em sinal de saída de gás correspondente, o etanol (SAHU et al., 2017).

A resistividade do MQ-3 difere com vários tipos e concentrações de gases. Adnyana et al. (2015), sugerem que ao usar este sensor, o ajuste de sensibilidade é muito essencial. É proposto para calibrar o detector para 0,4mg L⁻¹ (aproximadamente 200ppm) de concentração de etanol no ar.

O sensor MQ-3 tem sido utilizado para diversas finalidades, seja para determinar a liberação de etanol no processo de fermentação de leveduras, sementes e seres humanos, sendo crucial sua calibração nos mais diversos seguimentos, havendo a necessidade de que todos os estudos sejam baseados em laboratório (ADNYANA et al., 2015).

Satria et al., (2013) projetaram uma ferramenta com design arrojado para determinar os níveis de etanol em diferentes situações, baseados em um AT89S51, afirmaram que o sensor apresenta alta precisão, porém, os autores relatam que a temperatura externa do ambiente pode influenciar na operabilidade do senso. No entanto, estes mesmos autores criaram parâmetros de correção, para eliminar a interferência da umidade e da temperatura do ambiente de leitura.

2.5.2 Aplicabilidade do teste do etanol

O teste do etanol apresenta como principais características a praticidade, aplicação em uma gama de espécies e velocidade na obtenção dos resultados, gerando informações promissoras, com capacidade de prever o processo de deterioração de sementes, bem como de proporcionar o ranqueamento de lotes quanto ao vigor de sementes de diferentes espécies.

Estudando o vigor em sementes de canola, Buckley; Huang (2011) observaram a ocorrência de interação significativa entre a produção de etanol e o vigor de sementes. No mesmo estudo, foi evidenciado o teste de emissão de etanol como um teste rápido e simples, por não necessitar de nenhum tipo de instalação especial.

Neste sentido, Woodstock; Taylorson (1981), em estudo relacionado à produção de acetaldeído e etanol em sementes de soja, verificaram correlação significativa, indicando que o nível de produção destes compostos estava relacionado à deterioração das sementes, sendo atribuído a alterações nas membranas mitocondriais. Estes mesmos autores ainda relatam que os níveis elevados de etanol e o seu precursor, acetaldeído, foram detectados após 30 min de embebição em sementes de soja.

Ao avaliar a relação entre a produção de etanol e o desempenho fisiológico de sementes de quinoa, Vergara et al. (2018) constataram que o teste do etanol usando 1,0 g de sementes, durante um período de 24 horas de embebição a 40 °C, é eficiente na avaliação de vigor em sementes de quinoa.

Já Oenellas et al. (2020), ao avaliarem o vigor de sementes de melão pelo teste do etanol, verificaram que o teste do etanol realizado com 25 sementes e

embebição em 0,5 mL de água destilada por 6 h, mostrou-se eficiente para avaliação do vigor e pode ser relacionado com outros testes de vigor tradicionais.

Ao pesquisar o potencial de um teste rápido de etanol para a avaliação da qualidade de sementes de milho armazenadas sob diferentes condições, Onwimol et al. (2019) concluíram que o aumento na produção de etanol das sementes de milho armazenadas sob condições controladas (temperatura de 15 °C e UR de 20%) foi menor do que nas condições ambiente e que os níveis de produção de etanol das amostras de sementes de milho no início do armazenamento foram significativamente menores que após seis meses de armazenamento.

Trabalhando com sementes de azevém (CAVALCANTE et., 2017) e feijão miúdo (CAVALCANTE et., 2019), os autores concluíram que o teste do etanol, utilizando um bafômetro adaptado, tem a capacidade de distinguir o nível de vigor entre diferentes lotes de sementes destas espécies. Porém, relatam que o equipamento, por ser adaptado, pode proporcionar equívocos durante o procedimento metodológico.

Silva et al. (2021), ao testarem a qualidade fisiológica de sementes de soja com um bafômetro adaptado, constataram que o teste não foi eficiente no ranqueamento dos lotes em diferentes níveis de vigor, sugerindo que o teste seja realizado com equipamentos específicos, criados para esta finalidade.

Capítulo 1 – Desenvolvimento de equipamento e estabilização de sensor MQ-3 para aferição de etanol em sementes de soja

1 Introdução

A utilização de sensores com a capacidade de capturar informações para auxiliar na agricultura vem contribuindo significativamente no cultivo agrícola em nível mundial, atuando em vários setores, seja em pré e ou pós-colheita. Geralmente, os sensores possuem um elemento transdutor que fornece um sinal elétrico que converte uma forma de energia em outra ou altera uma determinada grandeza elétrica, como resistência, capacitância ou indutância, mas que pode sofrer variações devido ao ambiente durante seu funcionamento, tais como ruído e temperatura (CORONEL-REYES et al., 2018).

Diante disto, abre-se uma alternativa para estudos relacionados a novos testes de vigor em sementes de soja, que venham a se beneficiar de ferramentas de caráter eletrônico. A exemplo, Cavalcante et al. (2019), utilizam um etilômetro adaptado para avaliar a quantidade de etanol liberada por sementes de feijão submetidas a hipóxia e correlacionam os resultados com testes de vigor tomados como referência. Os autores relataram que o teste se mostrou promissor, mas a adaptação do etilômetro restringiu a obtenção de resultados mais consistentes.

No entanto, sabe-se que, em sua maioria, os etilômetros chegam próximos da precisão e da exatidão, podendo ser utilizados como testes de triagem ou confirmatório da intoxicação (BRAATHEN, 1997; CARVALHO; LEYTON, 2000). Contudo, os resultados desse equipamento são expressos em mg L^{-1} de sangue, que, em se tratando de sua aplicação em testes de vigor em sementes, podem causar estranheza na forma de expressar os resultados. Além disso, para verificar a quantidade de etanol liberado pelas sementes em anaerobiose, é necessário que se crie um fluxo de ar contínuo significativo, até que a leitura seja realizada.

Para a continuidade de estudos relacionados a produção de etanol em sementes de soja e suas relações com teste de vigor tradicionais, há a necessidade de projetar um novo equipamento específico para este teste, com uso de sensores que possibilitem uma leitura confiável, de forma rápida, prática e precisa, tornando-se útil ao setor de produção de sementes de soja. Porém, qualquer tipo de sensor

necessita previamente ser calibrado e ajustado mediante a necessidade para qual função o mesmo será aplicado (GONZÁLEZ-BUESA; SALVADOR, 2019).

Entre os sensores mais utilizados para a detecção de etanol no ambiente, tem-se o sensor MQ-3, da família dos sensores MQ, produzidos pela empresa chinesa HANWEI ELETRONICS LTD. Este sensor MQ-3 possui as características ideais para esta aplicação, tais como alta sensibilidade ao etanol, rápida resposta, longa duração, estabilidade nas leituras, circuito de alimentação simples e baixo custo financeiro (ASSONI; MAGRO, 2017).

Nessa perspectiva, objetivou-se avaliar o funcionamento operacional de um etilômetro com uso de um sensor MQ-3 e seu tempo de estabilização para utilização em lotes de sementes de soja submetidas a hipóxia.

2 Material e métodos

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório Didático de Análise de Sementes do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes e no Laboratório de Agrotecnologia do Centro de Engenharias, ambos localizado nos Campus do Capão do Leão da Universidade Federal de Pelotas.

Para o desenvolvimento da pesquisa, foram utilizados 20 lotes de sementes de soja, de cinco cultivares distintas, sendo que cada cultivar continha quatro lotes de sementes. Destaca-se, que por política interna da Empresa fornecedora das sementes, a identidade das cultivares não foi revelada. Dentre os 20 lotes de sementes de soja, foram selecionados 10, dois lotes de cada cultivar que apresentavam germinação (BRASIL, 2009) igual ou superior a 80% e que fossem semelhantes aos demais, para que houvesse a continuidade das análises.

Posteriormente, a pesquisa foi dividida em duas etapas, a primeira correspondendo ao desenvolvimento do equipamento de aferição do etanol e a segunda relacionada ao tempo de estabilização do sensor presente no equipamento.

2.1 Experimento I

Para o início do desenvolvimento do equipamento de medição do etanol, foi adquirida uma série de componentes eletrônicos para desenvolvimento do sistema e

produtos diversos, sendo que a obtenção desses componentes, produtos e a montagem do equipamento foram divididos em etapas:

2.1.1 Sistema de alimentação

Para esse sistema, foi adquirida uma fonte para uso externo, um conector Jack P4, um diodo 1N4007, um regulador de tensão 7805 e um LED (*Light Emitting Diode*).

2.1.2 Arduino e Microcontrolador

Foi adquirido um arduino e Microcontrolador ATmega 328P de 14 portas de entrada/saída digital (d0, d1, d2, d3, d4, d5, d6, d7, d8, d9, d10, d11, d12 e d13), sendo que seis destas podendo ser utilizadas como saída *Pulse Width Modulation* (PWM) (d3, d5, d6, d9, d10 e d11) e seis portas de entrada analógica (a0, a1, a2, a3, a4 e a5), um resistor de 10k de *Pull Down*, cristal oscilador de 16MHz e capacitores cerâmicos de 22pF e de 100nF.

2.1.3 Display

Foi utilizado um display *Liquid Crystal Display* (LCD) 16X2 de 16 pinos, que apresenta 16 colunas a cada duas linhas, com fundo azul e leituras descritas na cor branca.

2.1.4 Sensor de temperatura e umidade

Para esse sistema foi adquirido apenas um Sensor DHT11, que tem a capacidade de expressar os valores de temperatura e umidade do ambiente durante a utilização do equipamento.

2.1.5 Sensor de gás etanol

Assim como o sensor de temperatura e umidade, foi adquirido apenas um sensor MQ-3 de 4 pinos.

2.1.6 Produtos diversos

Foram adquiridos frascos de vidro de capacidade de 150 mL, apresentando tampas com sistema de vedação e ampola pneumática com volume de 30 cm³.

2.1.7 Montagem simplificada dos componentes do equipamento

O sensor MQ-3 Datasheet de 4 pinos foi integrado a um conversor analógico, que converte as variações de resistência em variações de tensão. Previamente ao processo de conversão, foram eliminados os ruídos proporcionados pelo meio externo por meio de filtros de passa baixa presente no conversor. Esse mesmo conversor converteu os sinais de variação de tensão em valores analógicos. Os dados gerados foram armazenados em um microcontrolador, sendo este conectado a um sistema de saída, um display, para que fosse possível armazenar os resultados de forma manual.

Para facilitar o manuseio do equipamento e do teste em si, foi inserido um tubo de armazenamento de gás com uma ampola pneumática implantada sobre a tampa do frasco, com o propósito de extrair o etanol incubado nas amostras e transferir para um outro frasco de armazenamento. No ápice segundo frasco, foi mantido o sensor MQ-3 Datasheet e uma válvula de escape, respectivamente.

2.2 Experimento II

Este experimento consistiu na determinação do tempo de estabilização do sensor MQ-3 Datasheet, já inserido no sistema eletrônico e no frasco de retenção de gás do equipamento, para que houvesse um tempo de espera entre uma análise e outra.

Para a realização das medições de etanol, a fim de determinar o tempo de estabilização do sensor, foi utilizado delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições de 25 sementes de soja de cada lote, visivelmente intactas, que foram selecionadas manualmente e acondicionadas em frascos de vidro de volume conhecido (150 mL), contendo 40 mL de água destilada (simulação de ambiente anaeróbico) (CAVALCANTE et al., 2019), passando por um período de repouso de 2 horas em temperatura controlada a 41°C (CAVALCANTE et al., 2019). Após esse período de hidratação, os frascos contendo as sementes foram cuidadosamente acoplados ao outro frasco que continham o sensor MQ-3. Em seguida, com auxílio da ampola, o ar contido no frasco que estavam acondicionadas as sementes, foi transferido, em volume conhecido, para o frasco contendo o sensor. Logo, foram realizadas as medições em diferentes intervalos de tempos (3; 6; 9; 12; 15; 18; 21; 24; 27 e 30 segundos) em leituras contínuas.

Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância a 5% de significância pelo teste F e quando significativo, aplicou-se o modelo de curva exponencial para determinar o tempo mínimo de estabilização do sensor MQ-3. Os resultados foram avaliados por meio do programa estatístico R[®] versão 3.1.1. (R Core Team, 2014) e o *software* gráfico SigmaPlot versão 12.5.

3 Resultados e discussão

3.1 Experimento I

Para início da montagem do equipamento, um sistema de alimentação foi conectado a rede elétrica por meio de uma fonte externa (Figura 2A), sendo esta de 7 a 20 volts (V). A conexão entre a fonte externa e o sistema de alimentação foi realizada através de um conector Jack P4 (Figura 2A). O Jack P4 insere no sistema uma carga positiva denominada VCC (*Volt Direct Current*) e uma carga negativa/nível lógico zero denominada GND (Ground) ou fio terra.

Junto ao sistema de alimentação, foi inserido um diodo 1N4007, que tem como função proteger o sistema, permitindo apenas a passagem de corrente elétrica em um único sentido (HU; GONG, 2014). Caso haja uma inversão entre o VCC e o GND no conector da fonte externa, e conseqüentemente no conector Jack P4, o

diodo irá proteger o sistema, pois não irá possibilitar a passagem de corrente no sentido inverso ao qual o sistema foi projetado. Ainda nesse sistema, foi inserido um regulador de tensão 7805, com a função de oferecer em seu terminal de saída (terminal 3) uma tensão 5V. Este componente pode receber tensões entre 7 e 20V. Se o mesmo receber sinais menores que 7V não irá funcionar corretamente, pois irá entregar sinais menores que 5V em seu terminal de saída. Caso o sinal recebido seja maior que 20V, o componente será danificado. O funcionamento deste componente é simples, a tensão positiva entra no regulador de tensão por meio do terminal VI (*Voltage In*, terminal 1), e o terminal VO (*Voltage Out*, terminal 3) fornece ao sistema uma tensão positiva de 5V. O terminal 2 do componente é ligado ao GND do sistema.

Ainda no sistema de alimentação, existem dois capacitores, um eletrolítico e um de poliéster (Figura 2A). Estes componentes têm a função de evitar que ruídos e oscilações externos interfiram no sistema de alimentação e venham a comprometer o fornecimento de energia (KEOGH, 2010).

E por fim, existe um LED ligado ao sistema por meio de um resistor de 220ohms (Figura 2C). O resistor tem como objetivo limitar a corrente que irá passar pelo LED. Já o LED serve como um indicador do sistema de alimentação, informando que o mesmo se encontra energizado (BEIRANVAND, 2016).

Com relação ao microcontrolador ATmega 328P (Figura 2B) de 14 portas de entrada/saída digital (d0, d1, d2, d3, d4, d5, d6, d7, d8, d9, d10, d11, d12 e d13), sendo que 6 destas podem ser utilizadas como saída *Pulse Width Modulation* (PWM) (d3, d5, d6, d9, d10 e d11), que apresentam uma resolução de 8 bits. Também apresenta 6 portas de entrada analógica (a0, a1, a2, a3, a4 e a5), cada uma destas com uma resolução de 10 bits. A tensão de operação deste componente é de 5V, logo a conversão analógica digital será de 1024 valores, ou seja, os valores analógicos lidos nas portas analógicas serão entre 0 e 1023.

Um resistor de 10kohms (Figura 2B) foi conectado ao terminal 1 do ATmega 328P (terminal de reset) a fim de manter o microcontrolador sempre energizado, evitando que o sistema reinicie periodicamente. Da mesma forma, também foi adicionado um capacitor cerâmico de 100nF, para evitar oscilações no sistema que venham a comprometer as leituras. Ainda foi acoplado ao microprocessador um cristal oscilador de 16MHz (Figura 2B) com a função de determinar com precisão a

sincronia de tempo (clock) das operações executadas pelo microcontrolador. Em outras palavras, o oscilador garante que cada tarefa seja executada no momento que foi proposto pela programação do microcontrolador. Os capacitores cerâmicos de 22pF fazem parte do circuito do cristal oscilador e garantem o bom funcionamento do mesmo.

Foi utilizado um display *Liquid Crystal Display* (LCD) 16x2 de 16 pinos (Figura 2D), que apresenta 16 colunas a cada duas linhas, com fundo azul e leituras descritas na cor branca. Os pinos 1 e 16 do display foram conectados no *Graduated Neutral Density* (GND). Os pinos 2 e 15 foram conectados no *Voltage Commnarion Collector* (VCC) do sistema. Já os pinos 4, 6, 11, 12, 13 e 14 foram conectados ao microcontrolador, cada um destes sendo conectado a uma porta digital específica, na qual o pino 4 na porta digital 2 (4-d2), e assim por diante, 6-d3, 11-d4, 12-d5, 13-d6, 14-d7, respectivamente. Os pinos 7, 8, 9 e 10 do display não foram conectados a nenhuma parte do sistema. O pino 5 foi ligado a um conector, sendo que este conector foi ligado ao GND por meio de um fio, sendo este um recurso utilizado no momento da definição das trilhas e posicionamento dos componentes na placa de circuito impresso (NADRI; ABBASZDEH, 2016).

Já o pino 3 foi conectado a um trimpot multivoltas de 10k. No trimpot, o pino 1 foi conectado ao VCC do sistema, e o pino 3 foi conectado ao GND do sistema por meio de um fio, sendo que este fio foi utilizado para conectar a trilha do pino 3 do trimpot ao GND). O trimpot tem como objetivo ajustar o brilho da tela do display.

Se tratando do dispositivo liga/desliga (Figura 2E), teve um dos seus terminais (1) conectado ao VCC do sistema, e o outro terminal (2) conectado ao pino digital 8 do microcontrolador. O terminal 2 do botão só será energizado se o dispositivo for pressionado pelo usuário do equipamento. Para garantir que o nível lógico no pino digital 7 permaneça em zero quando o dispositivo não estiver pressionado, foi inserido um resistor de 10kohms de Pull Down, desta forma evitando que o sistema interprete que o dispositivo foi pressionado embora o mesmo não tenha sido.

O pino 1, dentre os 4 pinos de um sensor de umidade e temperatura, foi inserido na placa do circuito impresso, conectado via fiação ao pino VCC do sensor DHT11 (Figura 2B). O pino 2 e do sensor (na placa de circuito impresso) foi conectado via fiação ao pino do sensor DHT11 e ao pino GND do sensor DHT11, respectivamente (Figura 2B). Salienta-se que o DHT11 é capaz de medir a

temperatura entre 0 e 50 °C com precisão de +/- 2 °C e a umidade relativa do ar entre 20 e 90% com precisão de +/- 5%.

Para concluir o sistema do equipamento, foi inserido o sensor MQ-3 de 4 pinos em seu módulo (Figura 2F), na qual foi utilizado apenas três dos quatro pinos no projeto. sendo neste projeto utilizados apenas três (VCC, GND e saída analógica). O pino não utilizado pertence a uma saída digital regulada por um trimpot interno do módulo do sensor.

O pino 1 do sensor MQ-3 (na placa de circuito impresso) foi conectada via fiação ao pino referente ao VCC, o pino 2 via fiação ao pino referente a AOUT (saída analógica) do módulo do sensor, e por fim, o pino 3 do sensor (na placa de circuito impresso) foi conectada via fiação ao GND do módulo do sensor. Salienta-se que o pino 2 do sensor MQ-3 é o responsável por transmitir as informações para o microcontrolador. O resistor 10kohms e o capacitor de poliéster 470nF compõem um filtro passa baixa no sistema e, desta forma, filtram ruídos de frequências acima de 33,88Hz, sendo que ruídos acima desta frequência não irão interferir nas leituras do sensor (YANG et al., 2017).

Diante do que já foi descrito sobre a montagem do sistema como um todo, ressalta-se que todas as conexões entre a placa de circuito impresso e o display foram realizadas via fiação.

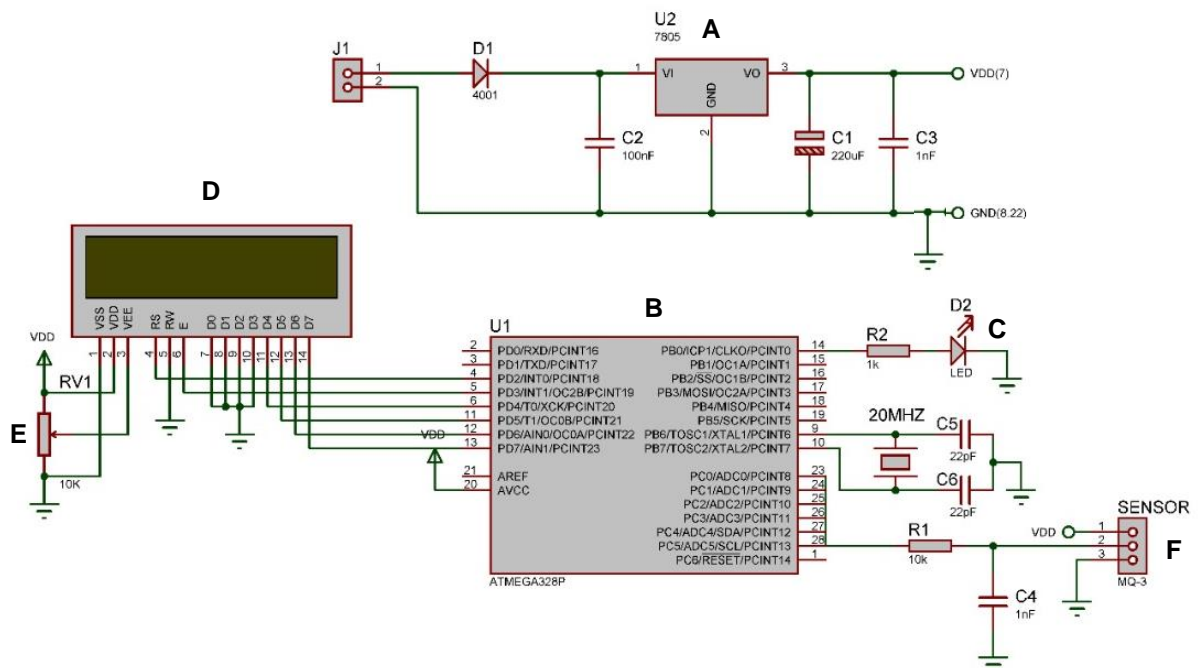


Figura 2 – Esquema da placa do sistema utilizado para a produção do equipamento.

Após a montagem do sistema e seus componentes (Figura 2), o sensor MQ-3 (Figura 2D) foi acoplado a um frasco B (Figura 2B) de recebimento de ar contendo o etanol liberado pelas sementes (Figura H) submersas em água (Figura 3G) que estão acondicionadas em outro frasco A (Figura 3A). Ambos estão interligados por um sistema de tubos e registro central (Figura 3F) com cerca de 5mm de diâmetro, a fim de fazer o transporte do etanol presente no frasco A para o frasco B, sendo este transporte realizado com auxílio de uma ampola pneumática (Figura 3E) acoplada na parte superior do frasco A. Assim, retira-se o ar do frasco A com a ampola (Figura 3F), fecha-se um registro no frasco A (Figura 3A) abaixo da ampola e pressiona a mesma até que o ar, que contém o etanol, seja transferido para o frasco B, o qual contém o sensor, posteriormente, fecha-se o registro do frasco B e inicia-se a leitura.

Desta forma, a condutividade elétrica do sensor de álcool se altera quando o mesmo está em um ambiente com maior concentração de etanol gasoso, ou seja, quanto maior a concentração de etanol no ar, maior será a condutividade elétrica do sensor. Logo, os resultados são expressos diretamente no display em unidades digitais (Figura 3I).

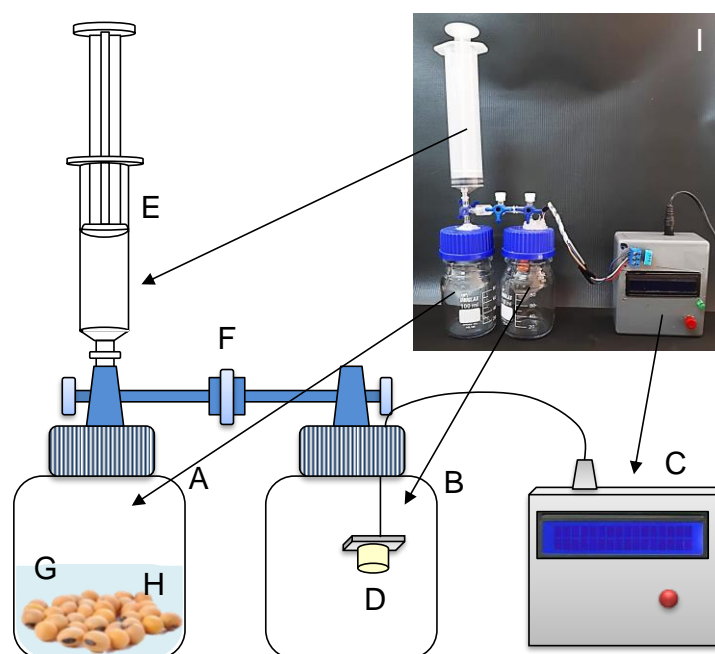


Figura 3 – Croqui do etilômetro para análise de vigor em sementes de soja submetidas a hipóxia. A: frasco A; B: frasco B; C: sistema eletrônico; D: Sensor; E: ampola; F registro central; G: água; H: semente de soja; I: protótipo do equipamento.

3.1 Experimento II

Na figura 4A, observou-se que o tempo mínimo de estabilização do sensor MQ-3 para o lote 1 foi de 24,34 segundos, enquanto para o lote 2 (Figura 4B), diferentemente do que foi observado para o lote 1, houve estabilidade nas leituras a partir de 6,1 segundos, ambos permanecendo estável até a realização da última leitura, que foi de 30 segundos.

Estes resultados demonstram a praticidade e velocidade com que os sensores podem trabalhar, podendo ser usados em um dispositivo comercial portátil e barato, capaz de detectar os compostos orgânicos voláteis (COV) (especialmente o etanol) e com sensores de alta sensibilidade (RÖCK et al., 2008). Hamid et al. (2018) comentam a existência de técnicas analíticas, como cromatografia líquida, espectrometria de infravermelho e de massa que tem sido usada para detectar concentrações de etanol, mas são caros e não portáteis. Devido ao alto custo e ao processo complexo, se faz necessário desenvolver sensores de etanol com alta sensibilidade, baratos, portáteis e de rápida resposta.

Com relação aos lotes 3 e 4 (Figura 4C e 4D), ambos apresentaram tempo de estabilização semelhantes, sendo de 18,4 segundos para o lote 3 e 13,6 segundos para o lote 4. No entanto, os lotes 5, 6, 7, 8, 9 e 10 (Figura 4E, 4F, 4G, 4H, 4I e 4J) apresentaram tempos de estabilização de 11,2, 10,2, 23,95, 16,5, 15,97 e 21,1 segundos, respectivamente, mostrando a eficiência do sensor MQ-3 para determinar a quantidade de etanol liberada pelas sementes em um curto espaço de tempo, junto aos demais lotes.

Em pesquisa semelhante, Silva et al. (2017), avaliaram a estabilidade de um sensor MQ-3 em grãos de feijão, observaram que o sensor se tornou estável, considerando uma média das amostras avaliadas, em torno de 23 segundos. Estes mesmos autores afirmaram que o sensor MQ-3 foi eficiente, prático e rápido na medição de etanol em sementes de feijão em hipóxia.

Ainda foi possível verificar que todos os lotes de soja avaliados apresentaram estabilidade até o tempo final de avaliação (30 segundos), demonstrando confiabilidade do sensor na obtenção dos resultados, podendo ser, também, aplicado em para outras espécies. Nessa perspectiva, Maciel et al. (2003) destacaram que o desenvolvimento de sensores deste tipo é de extrema importância

para muitas aplicações, devido suas vantagens, tais como tamanho reduzido, alta estabilidade, sensibilidade e longa vida útil.

Após a injeção de 100 ppm de etanol, Anjum; Khainar (2016) constataram que a resistência do sensor aumenta gradualmente e atinge um valor constante que fornece ao tempo de resposta do sensor, sendo semelhantes aos resultados encontrados neste trabalho. Os mesmos autores encontraram um tempo de resposta de 180 s para o etanol, enquanto o tempo de recuperação é de 700 segundos. Neste trabalho constatou-se um tempo de resposta mínimo de 13 segundos e de recuperação de 618 segundos, corroborando. O sensor produzido por Anjum; Khainar (2016) é de nanopartículas e, portanto, se comporta como um sensor eletroquímico, comportamento não visto em sensores de ligas metálicas.

Mediante os resultados, pode-se afirmar que o sensor MQ-3 pode ser uma ferramenta futura no controle da fermentação em sementes de soja como um futuro teste de vigor. Nos testes que avaliam a quantidade de etanol liberado pelas sementes, como foi utilizado por Kodde et al. (2012) em sementes de repolho e Buckley; Huang (2011) em sementes de canola, foi utilizado um etilômetro adaptado. O etilômetro identifica por meio de uma análise rápida e adequada do ar expelido pelos pulmões, a presença e quantidade de álcool no organismo, fornecendo resultados equivalentes aos valores encontrados no ar alveolar.

Ainda, este tipo de sensor de etanol pode ser utilizado no monitoramento de sementes armazenadas em embalagens herméticas. Sabe-se que embalagens herméticas impõe uma barreira física às trocas gasosas, sendo a respiração das sementes capaz de alterar a concentração de CO₂ dentro da embalagem ao longo do tempo, restringindo a respiração aeróbica e favorecendo a respiração anaeróbica. De acordo com Taiz et al. (2017) as sementes podem ativar seu metabolismo da fermentação em concentrações de O₂ em torno de 5%.

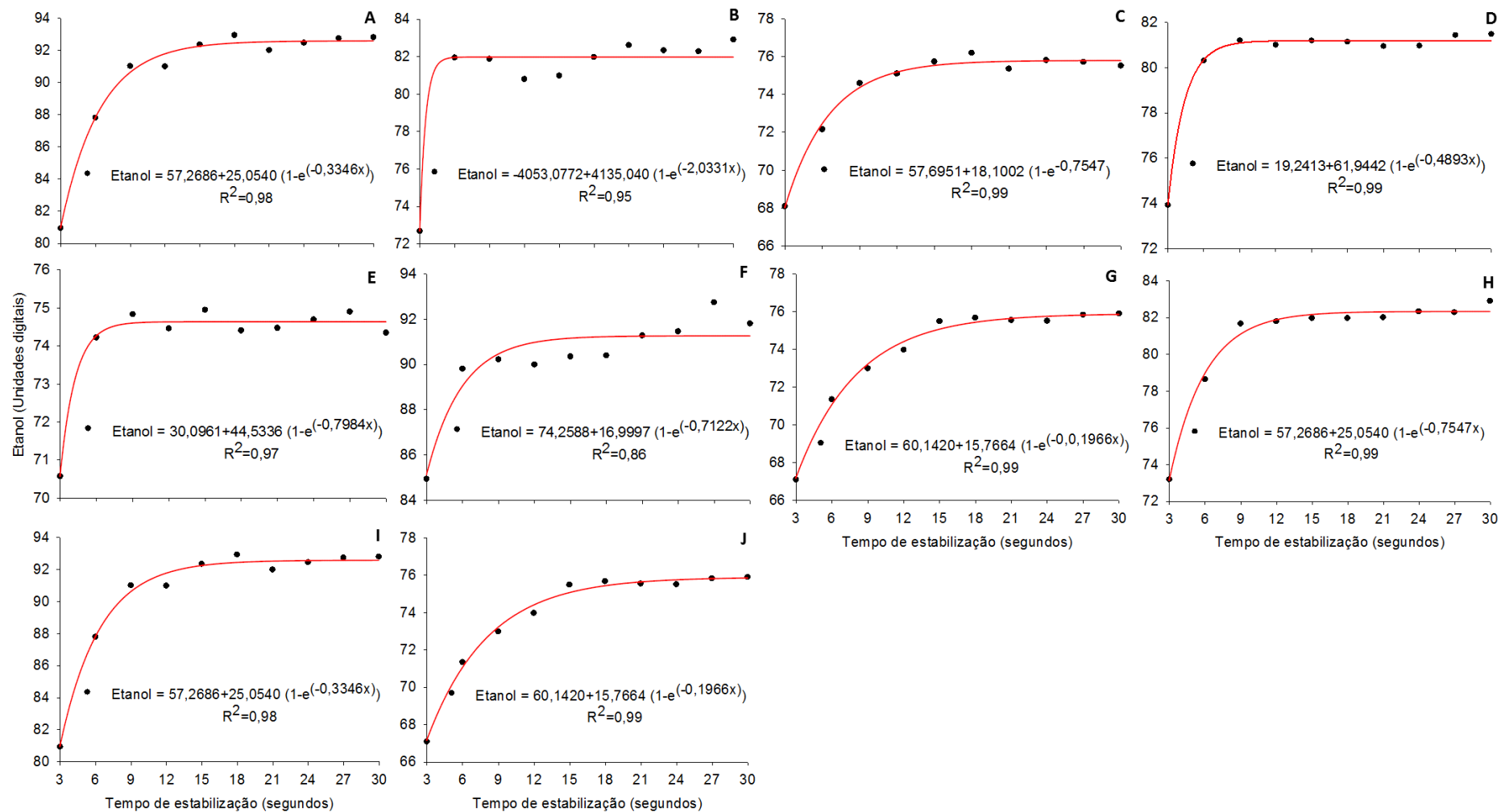


Figura 4 – Tempo médio de estabilização do sensor MQ-3 Datasheet de quatro pinos para medição de etanol em 10 lotes de sementes de soja submetidas à hipóxia.

4 Conclusões

O sensor MQ-3 é eficiente na detecção de etanol liberado pelas sementes de soja submetidas à hipóxia.

O sensor MQ-3 apresenta estabilidade média aos 16 segundos após o início das leituras, sendo recomendada a programação do sistema neste tempo de leitura para o uso do etilômetro em sementes de soja.

Capítulo 2 – Vigor e metabolismo anaeróbico de sementes de soja avaliadas pelo teste do etanol

1 Introdução

No sistema de produção de sementes de soja, a avaliação da qualidade fisiológica é fator fundamental para a tomada de decisões quanto ao aproveitamento das mesmas, como material de propagação e para as operações subsequentes a que são submetidas (FRANDOLOSO et al., 2017). Assim, laboratórios oficiais, de pesquisa e empresas usufruem de vários testes de avaliação da qualidade, sejam físicos, fisiológicos ou bioquímicos, em várias etapas do sistema de produção.

Dentre esses testes, o de germinação mostra-se bastante preciso e eficaz, além de ser padronizado. No entanto, os resultados apresentados pelo teste de germinação não evidenciam o máximo de vigor das sementes, por ser conduzido com temperatura, tempo de exposição, presença ou ausência de luz e umidade recomendada para cada espécie (BRASIL, 2009). Geralmente, o teste de germinação superestima o potencial fisiológico dos lotes de sementes, sendo, por isso necessário o uso de testes específicos, principalmente de vigor (SANTOS et al., 2011).

Porém, os testes de vigor em sementes só podem ser concluídos após várias horas, como é o caso do teste de tetrazólio e condutividade elétrica, ou até mesmo dias, como exemplo o teste de envelhecimento acelerado e o teste de emergência de plântulas em canteiros, fundamentais no controle interno de qualidade na indústria de sementes de soja. Desta forma, o setor de sementes anseia por novos testes de vigor que sejam menos onerosos, rápidos e de baixo custo financeiro, além de proporcionar resultados conclusivos, semelhantes aos testes tradicionais.

Nesse contexto, a aplicação de novas tecnologias em sementes de alto valor agregado pode ser de interesse para a indústria de sementes, pois permite avaliar a qualidade das mesmas de maneira rápida e padronizada. Além disso, pode ser uma alternativa a ser usada em programas de controle de qualidade durante a produção de sementes, sendo importante para a tomada de decisões quanto à aprovação ou disposição de lotes de sementes, o que significaria economia de tempo e recursos (MEDEIROS et al., 2020).

Nessa perspectiva, uma metodologia que contempla características de rapidez, praticidade e confiabilidade nos resultados de vigor é o teste do etanol (BUCKLEY; HUANG, 2013, CAVALCANTE et al., 2017). Esse teste baseia-se na liberação de etanol pelas sementes durante a embebição ou processo de incubação, promovendo a hipóxia, onde a mitocôndria é incapaz de processar o piruvato da glicólise e algumas reações enzimáticas, que resultam em reações de fermentação alcoólica, na qual a piruvato descarboxilase (PDC) e a álcool desidrogenase (ADH) atuam no piruvato, liberando etanol e CO₂, e oxidando NADH. A enzima ADH e lactato desidrogenase (LDH) são essenciais no ciclo glicolítico em condições anaeróbias, pois reciclam NAD⁺, reduzindo o piruvato a etanol ou lactato (TAIZ et al., 2017).

Em condições de alta produção de etanol, Cavalcante et al. (2019) afirmam que as sementes mais vigorosas tendem a produzir uma menor quantidade de etanol durante os primeiros minutos da hipóxia, pelo fato das membranas celulares se apresentarem mais integras, retardando o processo de redução do piruvato e posterior passagem da molécula de etanol pela membrana plasmática das células.

Em contrapartida, os equipamentos utilizados para o teste de etanol, em geral, são adaptados e podem comprometer metodologicamente as análises e os resultados. Silva et al. (2021) afirmam que os equipamentos adaptados não são eficientes no ranqueamento de lotes de sementes de soja em diferentes níveis de vigor, o que requer ajustes ou mesmo o desenvolvimento de equipamentos para realizar o teste de forma mais segura e confiável.

Diante do exposto, objetivou-se testar a viabilidade de aplicação de um equipamento específico para o teste do etanol em sementes de soja submetidas a hipóxia, bem como avaliar o metabolismo das enzimas fermentativas após a aplicação o teste.

2 Material e métodos

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório Didático de Análise de Sementes do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes, pertencente à Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, em parceria com o Laboratório de Agrotecnologia do Centro de Engenharias, ambos pertencentes à Universidade Federal de Pelotas, localizados no Campus do Capão do Leão, RS.

Os lotes de sementes foram adquiridos por uma empresa produtora de sementes de soja, localizada no município de Luís Eduardo Magalhães no Oeste do Estado da Bahia. Dentre os lotes de sementes de soja, havia cinco cultivares distintas, sendo que cada cultivar continha dois lotes de sementes. Destaca-se, que por política interna da Empresa fornecedora das sementes, a identidade das cultivares não foi revelada. Salienta-se que as sementes permaneceram armazenadas em câmara fria durante a condução do experimento.

Previamente, foi avaliada a germinação de 20 lotes de sementes de soja e foram selecionados 10 lotes que apresentavam germinação (BRASIL, 2009) igual ou superior a 80% e que fossem estatisticamente semelhantes entre si, para que houvesse a continuidade das análises de qualidade inicial. No entanto, como exceção, um dos lotes foi escolhido com germinação inferior aos demais, a fim de demonstrar que o teste se aplica a qualquer lote de sementes.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições para cada tratamento, com exceção do teste do etanol que foram utilizadas cinco repetições. Os tratamentos constituíram-se de cada lote, sendo, no total, 10 lotes de sementes de soja. Para determinar a atividade das enzimas fermentativas, foram utilizados apenas 5 lotes de sementes de soja.

Previamente à utilização do teste do etanol, foram avaliados o teor de água e a qualidade fisiológica inicial das sementes dos diferentes lotes, aplicando os seguintes testes:

Germinação: foi realizado com quatro repetições, cada uma composta por quatro subamostras de 50 sementes, semeadas em substrato de papel (germitest[®]), previamente umedecido com água destilada, utilizando-se 2,5 vezes o peso do papel seco, e mantidas em germinador à temperatura de 25 °C. As avaliações foram efetuadas aos oito dias após a semeadura, sendo os resultados expressos em porcentagem de plântulas normais, conforme as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

Emergência de plântulas: foi realizado com quatro repetições com quatro subamostras de 50 sementes, distribuídas em canteiros com dimensões de 5 metros de comprimento e 1 metro de largura (5 x 1m), preenchidos com solo coletado do horizonte A1 de um Planossolo Háplico Eutrófico Solódico (STRECK et al., 2008), pertencente à unidade de mapeamento Pelotas. As avaliações foram realizadas aos

21 dias após a semeadura, computando-se as plântulas emergidas que apresentassem comprimento igual ou superior a 3,0 cm acima da camada do solo. Os resultados foram expressos em percentagem de plântulas emergidas.

Envelhecimento acelerado: foi conduzido com 4 subamostras de 50 sementes por repetição, as quais foram dispostas em camada única sobre uma tela de aço inox inserida no interior de caixas plásticas (gerbox) contendo 40 mL de água destilada no fundo (MARCOS FILHO, 2020). Posteriormente, as caixas foram transferidas para câmara de germinação tipo BOD a 41 °C por 48 horas. Após esse período, as sementes foram submetidas ao teste de germinação, conforme descrito anteriormente. A avaliação foi realizada no quinto dia após a semeadura, computando-se as plântulas consideradas normais (BRASIL, 2009). Os resultados foram expressos em porcentagem de plântulas normais.

Teste de tetrazólio: foi realizado utilizando 100 sementes por repetição, divididas em duas subamostras de 50 sementes, sendo estas acondicionadas entre papel por 16 horas à temperatura de 25° C. Passado o tempo necessário ao acondicionamento, as sementes foram totalmente submersas na solução de 0,075 % de sal de tetrazólio, e colocadas em estufa à temperatura de 40° C por um período de 2,5 horas, sendo posteriormente lavadas e analisadas individualmente quanto ao vigor, com os resultados expressos em porcentagem (FRANÇA NETO; KRZYZANOWSKI, 2019).

Atividade respiratória: foi determinada seguindo o método de *Pettenkofer* adaptado por Moraes et al. (2012). Foram utilizadas quatro gramas de sementes previamente embebidas nos mesmos tempos de embebição utilizadas no teste do etanol (30, 60, 90, e 120 minutos). Posteriormente, as sementes foram colocadas no sistema de *Pettenkofer* para determinar a atividade respiratória. O cálculo final da atividade respiratória foi realizado com base na média de quatro repetições, cujo resultado foi expresso em quantidade de CO₂ liberado por grama de semente por hora ($\mu\text{g CO}_2$ liberado g^{-1} semente h^{-1}), utilizando-se a seguinte equação: $N \times D \times 22$, sendo, N= normalidade do ácido usado (HCl 0,1N); D= diferença entre a prova em branco e a amostra e 22 = normalidade do CO₂ para a atividade respiratória (AR) determinada no aparelho de *Pettenkofer*.

Condutividade elétrica: foram utilizadas 25 sementes por subunidades, para cada repetição. As sementes foram pesadas e em seguida foram imersas em um

recipiente contendo 80 mL de água deionizada e mantidas, por um período de 24 horas, em incubadora tipo BOD à temperatura de 25° C. Após esse período, realizou-se a leitura da condutividade elétrica das soluções, com o auxílio de um condutímetro digital. Os resultados foram expressos em $\mu\text{Sm}^{-1} \text{g}^{-1}$ de sementes, conforme metodologia adaptada de Vieira; Marcos Filho (2020).

Posteriormente às análises da qualidade inicial dos lotes de sementes, foi realizado os testes do etanol e condutividade elétrica:

Teste do etanol: Inicialmente, 25 sementes visivelmente intactas foram selecionadas da porção Semente Pura, sem apresentar danos físicos aparentes. Posteriormente, as sementes foram pesadas e acondicionadas em frascos de 150 mL contendo 40 mL de água deionizada, permanecendo embebidas pelos períodos de 30, 60, 90, e 120 minutos a uma temperatura de 41 °C em BOD. Após os períodos de embebição, os frascos foram acoplados ao equipamento de medição do etanol, na qual foram realizadas as leituras (Capítulo I, Figura 3). Os resultados foram expressos em milivolt.

Condutividade elétrica após o teste do etanol: após a leitura do teste do etanol, as amostras de sementes foram direcionadas para leituras da condutividade elétrica, na qual utilizando-se um condutímetro de bancada Schott LF613T. Para a obtenção do valor da condutividade elétrica da solução contendo as sementes, foi subtraído o valor da condutividade lida no condutímetro do valor da leitura da água, dividindo-se o valor obtido pela massa das 25 sementes, sendo os resultados expressos em $\mu\text{Scm}^{-1}\text{g}^{-1}$ de sementes (VIEIRA; MARCOS FILHO, 2020).

Após o teste de condutividade elétrica, as sementes foram congeladas para a determinação do metabolismo enzimático durante a fermentação:

Lactato desidrogenase (LDH, EC 1.1.1.17), piruvato descarboxilase (PDC. EC 4.1.1.17) e álcool desidrogenase (ADH, EC 1.1.1.1): para determinar o metabolismo anaeróbico das sementes, foram utilizados os lotes 1, 4, 6, 8 e 10. Inicialmente, foi retirado o tegumento das sementes a fim de utilizar apenas o tecido vivo. Os tecidos foram macerados em gral com N_2 líquido e polivinilpirrolidona (PVPP) 5% (p/p MF) e homogeneizados em tampão Tris-HCl 50mM, pH 7,5, contendo ditioneitol (DTT) 1mM. Os extratos foram centrifugados a 12.000g por 20 min a 4°C. Uma alíquota de 2,5mL do sobrenadante foi dessalinizada em coluna de cromatografia de exclusão molecular PD10 – Sephadex G-25 M (GE Healthcare,

Buckinghamshire, UK) (SOUZA; SODEK, 2003). A fração proteica eluída foi utilizada para os ensaios enzimáticos e determinação do conteúdo de proteína de acordo com Bradford (1976). As atividades das enzimas foram quantificadas a partir do monitoramento da oxidação do NADH, em espectrofotômetro, a 340nm por 3, registrados em intervalos de 5 segundos, a 30 °C.

A atividade da ADH foi monitorada no sentido da formação do etanol (acetaldéido ADH etanol) em meio de reação contendo tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 para nódulos e fosfato de potássio 50mM, pH 7,0 para raízes, NADH 0,2mM, acetaldéido 5mM e extrato enzimático. A reação foi iniciada pela adição de acetaldéido ao meio (HANSON et al., 1984). A atividade da PDC foi monitorada no sentido de formação do etanol a partir de uma reação acoplada (piruvato PDC e acetaldéido ADH etanol) em meio de reação contendo tampão MES 50mM (pH 6,0 para nódulo; pH 6,5 para raízes), NADH 0,2mM, tiamina pirofosfato 0,5 mM, cloreto de magnésio 1mM, ácido oxâmico 20mM, ADH 10 U e piruvato de sódio 10mM e amostra. A reação foi iniciada pela adição do piruvato ao meio (HANSON et al., 1984). A atividade da LDH foi monitorada no sentido de formação do lactato (piruvato LDH lactato) em meio de reação contendo tampão Tris-HCl 50mM, pH 7,5 para nódulo e fosfato de potássio, pH 7,0 para raízes, NADH 0,2mM, cianeto de potássio 3 μ M, metilpirazol 4mM, piruvato de sódio 10mM e amostra. O piruvato foi utilizado para iniciar a reação (HANSON; JACOBSEN 1984).

Os dados de qualidade inicial, do teste do etanol e das enzimas fermentativas foram submetidos a análise de variância ($p < 0,05$) e, quando significativo, foram comparados pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Além disso, foi realizada uma análise entre os componentes principais (PCA) e análise da relação entre variáveis pelo teste de correlação de Pearson a 1% e 5% de probabilidade. Os dados foram avaliados pelo programa estatístico R[®] (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2014).

3 Resultados e discussão

Os resultados referentes ao teor de água inicial das sementes variaram de 11,9 a 13,9%, com diferença máxima de 2,0 pontos percentuais entre os lotes (Tabela 1). Essa proximidade entre os valores do teor de água inicial é primordial

para que os testes não sejam afetados por diferenças na atividade metabólica (STEINER et al., 2011), já que o teor de água das sementes influencia diretamente na integridade das membranas, avaliada pelo teste de condutividade elétrica e pode influenciar em outras análises da qualidade fisiológica (BARBOSA et al., 2012).

Tabela 1 – Teor de água (TA), germinação (GER), emergência de plântulas (EP), envelhecimento acelerado (EA), teste de vigor pelo tetrazólio (TZ), condutividade elétrica (CE) e respiração (RES) de dez lotes de sementes de soja.

LOTE	TA	GER	EP	EA	TZ	CE	RES ²
	----- % -----					$\mu\text{Scm}^{-1}\text{g}^{-1}$	
1	11,9	95 a ¹	93 a	94 a	93 a	91,35 a	0,90 a
2	12,2	96 a	92 a	93 a	92 a	105,83 b	1,83 b
3	12,7	96 a	86 b	88 b	89 b	106,30 b	2,52 b
4	12,6	97 a	86 b	86 b	88 b	109,14 b	2,33 b
5	12,1	93 a	90 a	91 a	92 a	98,41 b	1,64 b
6	12,1	93 a	92 a	92 a	91 a	112,76 b	1,59 b
7	12,8	93 a	89 b	90 a	88 b	118,29 c	2,97 b
8	13,9	88 b	85 b	87 b	85 b	137,02 c	4,96 c
9	13,2	93 a	84 b	86 b	85 b	133,63 c	3,87 c
10	12,0	96 a	93 a	92 a	94 a	81,18 a	0,86 a
Média	12,6	94	89	90	88	109,01	2,34
CV (%)		3,37	5,26	4,43	3,19	8,83	14,2

¹Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. ² $\mu\text{g CO}_2$ liberado g^{-1} semente h^{-1} ; CV: coeficiente de variação.

Quanto à caracterização inicial, as sementes de todos os lotes de soja apresentaram germinação acima do padrão utilizado para a sua comercialização, que é de 80% (BRASIL, 2013). Ainda se observou que todos os lotes de sementes apresentaram germinação semelhante, exceto o lote 8, que apresentou germinação inferior aos demais lotes (Tabela 1), justificando a necessidade de utilizar um teste de vigor, visto que o teste de germinação não permite detectar o progresso da deterioração das sementes, indicando apenas os estádios finais do processo (MARCOS FILHO, 2015a).

Os testes emergência de plântulas, envelhecimento acelerado e o teste de tetrazólio oportunizaram o ranqueamento dos lotes em dois níveis de vigor, sendo os lotes 1, 2, 5, 6 e 10 apresentando sementes mais vigorosas (Tabela 1). Saliente-se que os testes de vigor são mais sensíveis para identificar estágios menos avançados de deterioração das sementes, podendo facilitar a tomada de decisões sobre o destino dos lotes de sementes (WENDT et al., 2017). Várias empresas

realizam os testes de vigor associados ao de germinação para um controle interno de qualidade, buscando estimar o potencial de desempenho em campo, tanto a serem semeadas em condições favoráveis quanto em condições desfavoráveis (GRZYBOWSKI et al., 2015, TILLMANN et al., 2019).

Já se tratando dos testes de condutividade e respiração das sementes de soja pelo método de *Petenkoffer*, observou-se que ambos os testes ranquearam os lotes em três níveis de vigor, sendo os lotes 1 e 10 apresentando as sementes mais vigorosas e os lotes 8 e 9 como os de menor vigor (Tabela 1). Estes resultados de condutividade corroboram com pesquisa realizada por Fessel et al. (2010) com sementes de soja e com trabalhos de Mendes et al. (2009), Aumonde et al. (2012) e Leite et al. (2018) ao avaliar a respiração em sementes de soja, feijão-miúdo e quiabo, respectivamente.

Torna-se relevante destacar que os testes bioquímicos, como é o caso da condutividade elétrica e respiração das sementes, podem antecipar eventos degenerativos em estruturas celulares, na qual sinalizam o processo de deterioração bem antes de a semente perder a capacidade de geminar (MARCOS FILHO, 2015b). No entanto, o tempo de execução, bem como a padronização destes testes tem dificultado seu uso em larga escala. Prado et al. (2019) citam que a ausência de valores de referência ou faixa de valores que indiquem o nível do vigor das sementes são fatores dos quais o uso desses testes não seja ampliado.

Com relação ao teste do etanol, constatou-se que o mesmo, ao ser utilizado os tempos de embebição de 30 e 60 minutos, proporcionou o ranqueamento dos lotes em três níveis de vigor (Figura 5), apresentando-se com um nível de critério superior aos testes de vigor tradicionais. Porém, apesar de possibilitarem o ranqueamento entre lotes de alto, médio e baixo vigor, apenas o tempo de 30 min proporcionou resultados semelhantes aos de condutividade elétrica e respiração das sementes (Tabela 1).

Nos períodos iniciais do teste do etanol (30 e 60 minutos) foi possível observar que as sementes que apresentaram maior vigor superior tenderam a liberar uma quantidade de etanol menor do que aquelas sementes que apresentaram vigor inferior (Figura 5). A medida em que se aumentou o tempo de embebição, a produção de etanol pelas sementes de baixo vigor foi diminuída e aquelas sementes

de alto vigor passaram a acelerar o processo de fermentação, invertendo o entendimento do teste (Figura 5).

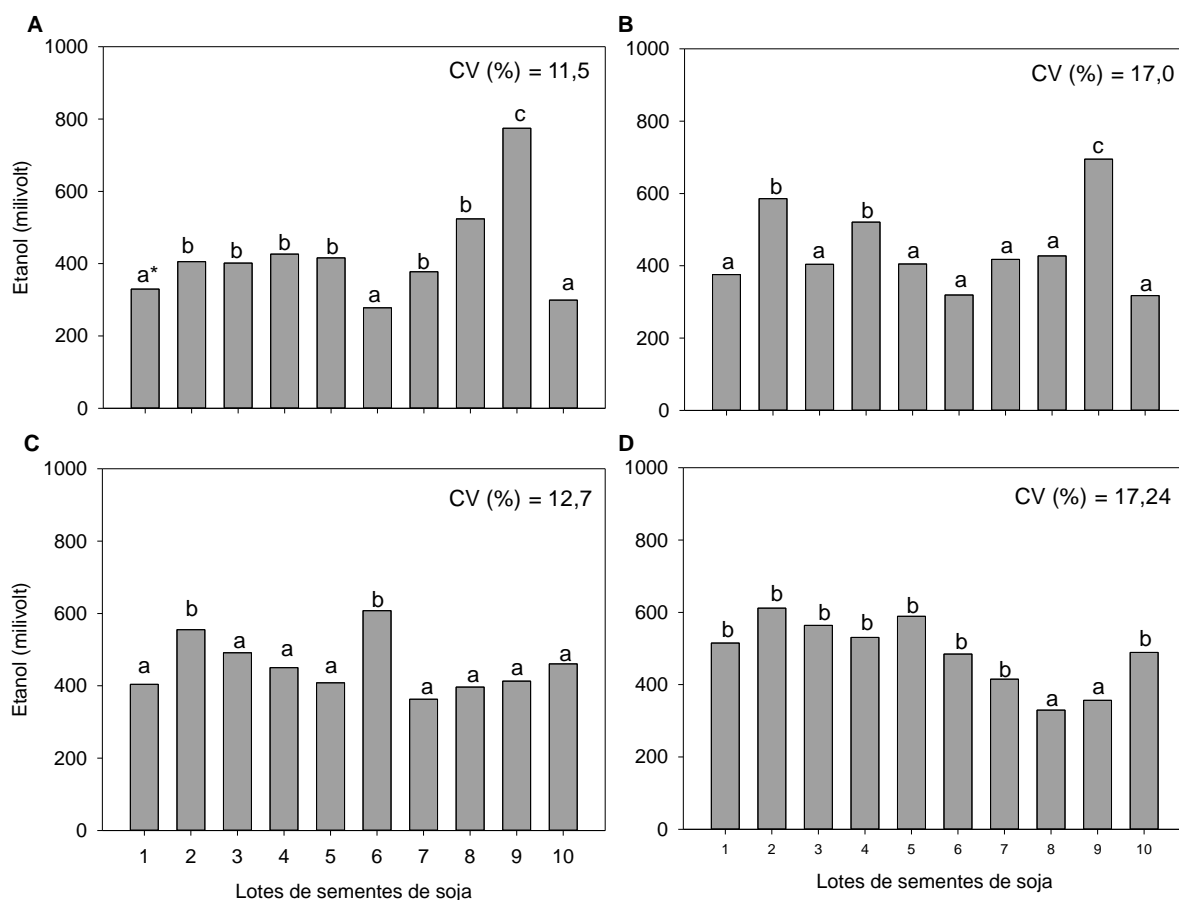


Figura 5 – Testes do etanol com diferentes tempos de embebição (A – 30 min; B – 60 min; C – 90 min; D – 120 min) das sementes de diferentes lotes de soja fazendo uso de equipamento sujeito à obtenção de patente.

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. CV: coeficiente de variação.

Este fato foi relatado por Onwimol et al. (2019) ao investigar o potencial de um teste rápido de etanol para a avaliação da qualidade de sementes de milho armazenadas sob diferentes condições, concluíram que o aumento na produção de etanol das sementes de milho armazenadas sob condições controladas (temperatura de 15 °C e UR de 20%) foi menor do que nas condições ambiente e que os níveis de produção de etanol das amostras de sementes de milho no início do armazenamento foram significativamente menores após seis meses armazenadas.

Ao utilizar os lotes 8 e 9 como exemplo, caracterizado como lote de menor vigor entre demais lotes (Tabela 1), tais circunstâncias de qualidade inicial das

sementes podem ter favorecido o processo de inativação da via glicolítica e ativação da via fermentativa, uma vez que a redução na germinação de sementes é associada a um envelhecimento natural com consequente perda de solutos orgânicos e aumento da atividade respiratória das mesmas (MONCALEANO-ESCANDON et al., 2013).

Este fato corrobora como as pesquisas realizadas por Cavalcante et al. (2017) e Cavalcante et al. (2019) ao trabalharem com sementes de azevém e feijão miúdo, respectivamente. Estes autores afirmam que o teste do etanol pode proporcionar a diferenciação do vigor dos lotes de sementes de duas maneiras, com tempo de embebição menor, na qual as sementes de maior vigor tendem a produzir uma menor quantidade de etanol e, se quando o tempo de embebição é elevado, estas mesmas sementes tendem a produzir uma quantidade maior de etanol, sendo que o contrário ocorre para sementes com menor vigor.

Supostamente, as sementes de maior vigor, além de apresentarem maior quantidade de reservas em seus tecidos, possuem maior integridade das membranas. Buckley; Huang (2012) avigoram que a produção de etanol pela semente é iniciada, ou reforçada, pela perda da integridade da membrana mitocondrial na ausência de O₂. Rocha et al. (2010) relatam que etanol tende a se difundir rapidamente para fora das células, o que leva a uma perda considerável de carbono durante a hipóxia.

As concentrações de etanol normalmente encontradas em células de vegetais são insuficientes para causar toxicidade. Por outro lado, o etanol não é facilmente metabolizado e sendo solúvel na bicamada lipídica das membranas celulares (DREW, 1997), pode quase que totalmente ser difundido para fora do meio circundante, resultando em perda de carbono (ROCHA et al., 2010).

Este processo de acúmulo de etanol envolve a oxidação de NADH e produz uma pequena quantidade de ATP, que é essencial para a sobrevivência em algumas espécies durante a ausência de oxigênio e quando as mitocôndrias não funcionam devido ao dano (KODDE et al., 2012). As sementes são impermeáveis ao oxigênio durante as primeiras horas de germinação, gerando aumento do coeficiente respiratório, bem como aumento da atividade do ADH, que ativa a fermentação alcoólica (TAIZ et al., 2017).

Com relação aos tempos de embebição de 90 e 120 minutos, observou-se que as sementes submetidas a estes tempos de embebição, apresentaram a estratificação dos lotes em apenas dois níveis de vigor, diferente dos demais tempos (Figura 5). Denota-se que as sementes de menor vigor, submetidas aos tempos de 90 e 120 minutos, apresentam uma menor produção de etanol, enquanto aquelas de maior vigor tiveram uma produção de etanol superior às demais (Figura 5).

Diante da proximidade dos resultados encontrados entre o teste do etanol e de condutividade elétrica, foi realizada uma correlação de Pearson a 5% de probabilidade de erro (Figura 6), na qual observou-se uma correlação positiva entre as variáveis etanol com embebição de 30 min e as variáveis de condutividade elétrica, demonstrando que a integridade das membranas tem uma alta relação com a produção de etanol pelas sementes (Figura 6).

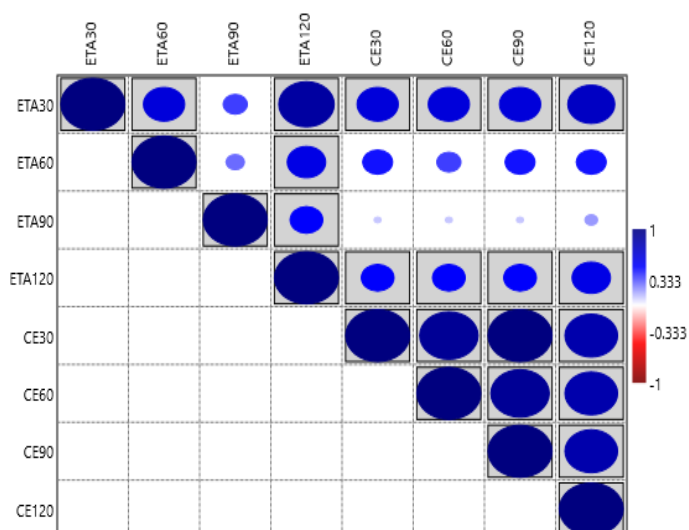


Figura 6 – Dispersão gráfica da correlação entre o teste do etanol e o teste de condutividade elétrica em sementes de soja submetidas a diferentes tempos de embebição (30, 60, 90 e 120 minutos).

Assim, sementes cujo vigor está comprometido, convergem a iniciar de forma mais rápida o processo de fermentação, já que sementes menos vigorosas tendem a apresentar membranas com menor integridade, facilitando a rápida liberação do etanol comparativamente a sementes mais vigorosas e, conseqüentemente, sua quantificação pode fornecer informações importantes sobre problemas fisiológicos relacionados à deterioração de sementes (BUCKLEY et al., 2016).

De acordo com afirmações de Buckley et al. (2009) e Buckley e Huang (2011), a produção de etanol provavelmente é iniciada ou aprimorada pela perda da integridade da membrana mitocondrial, sendo que ensaios de quantificação de etanol apresentam potencial como um teste para analisar o nível de deterioração de sementes. Embora o etanol possa ser quantificado com equipamentos analíticos orientados para a pesquisa, o ensaio deve ser simples para fins práticos a nível de campo.

Para correlacionar os testes de avaliação da qualidade inicial (germinação, emergência de plântulas, envelhecimento acelerado, tetrazólio, condutividade elétrica e respiração) com o teste de etanol nos períodos de embebição (30, 60, 90 e 120 min) foi utilizada uma Análise de Componentes Principais (PCA) (Figura 7).

Os dois primeiros Componentes Principais (PC) permitiram a explicação de 68,1% da variância contida no elemento original (Figura 7), com contribuição do PC 1 e PC 2 de 50,0 e 17,0% da variância remanescente, respectivamente. No PC 1, as variáveis condutividade elétrica e respiração apresentaram a maior associação entre o teste do etanol, independentemente do tempo de embebição, com maior contribuição dos lotes 3 e 9 (Figura 7).

Com a associação entre os testes bioquímicos neste trabalho (Figura 7), para a obtenção de dados consistentes, relacionados ao vigor das sementes, e como forma de comprovar a eficiência do teste do etanol, frente aos demais, foram realizadas as análises de condutividade elétrica e atividade respiratória das mesmas, uma vez que a respiração é um dos fatores cruciais necessários para uma germinação bem-sucedida (YAMAUCHI et al., 2014). Além disso, tais análises estão relacionadas a características importantes no que tange os processos iniciais relacionados à redução de vigor das sementes, como a integridade das membranas celulares e a ativação da via etanólica durante o processo de respiração celular (CAVALCANTE et al. 2017).

Já se tratando do PC 2, observou-se que as variáveis germinação, emergência de plântulas, envelhecimento acelerado e tetrazólio, não apresentaram associação com o teste do etanol, mesmo comparando com todos os tempos de embebição (Figura 7). Esta baixa associação pode se atribuída ao fato do ranqueamento dos lotes, visto que os testes bioquímicos apresentaram uma capacidade maior de estratificá-los em diferentes níveis de vigor.

Dentre os lotes de sementes de soja que apresentaram maior contribuição na correlação de PCA, destacam-se os lotes 2, 3, 4, 6 e 8 (Figura 7). Logo, estes lotes se enquadram entre os lotes qualidade fisiológica superior (lotes 4 e 6), lotes com qualidade fisiológica intermediária (Lotes 2 e 3) e lote com qualidade fisiológica inferior (lote 8). Destaca-se ainda que todos estes lotes apresentaram contribuição em todos os quadrantes, bem como no PC1 e PC2 (Figura 7).

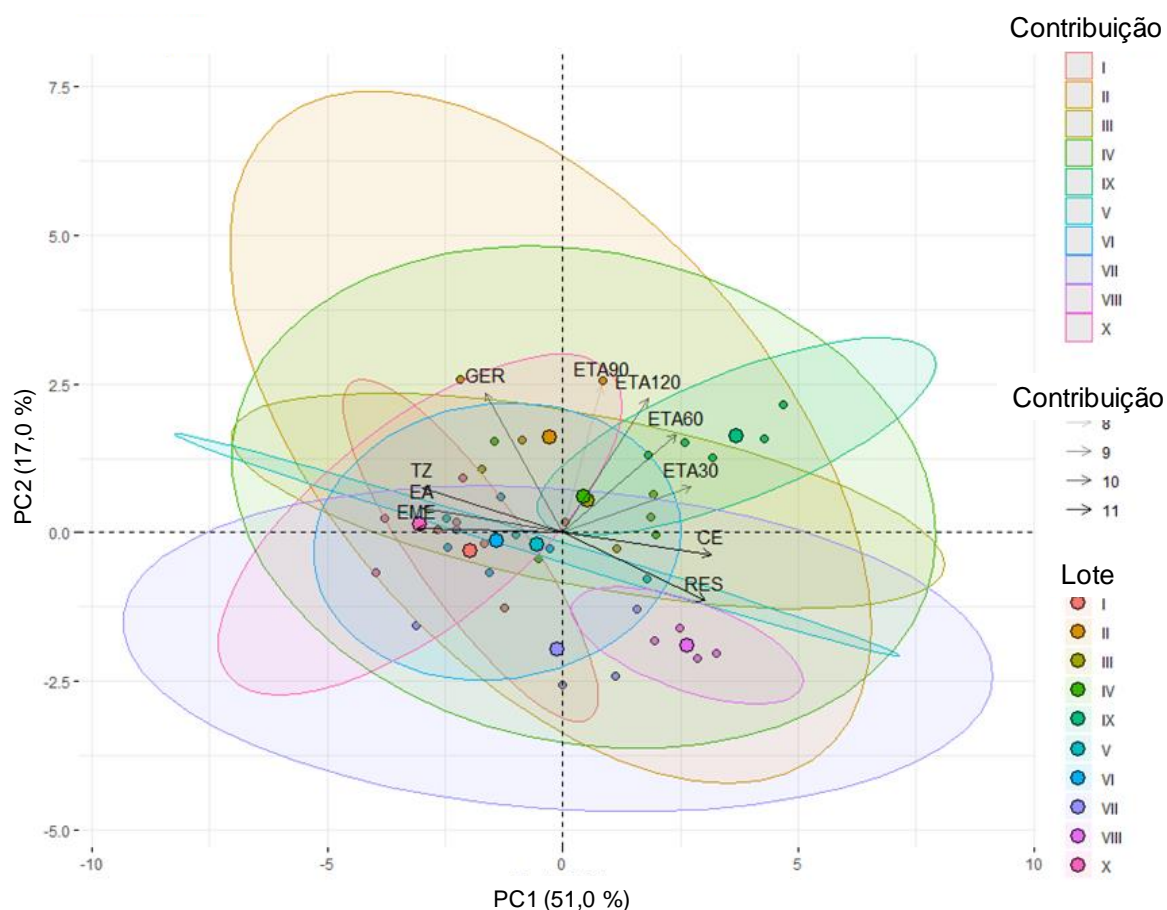


Figura 7 – Análise dos Componentes Principais (PCA) via bipol para demonstrar a projeção das variáveis dos dois componentes principais, qualidade inicial (germinação – GER; emergência de plântulas - EME, envelhecimento acelerado - EA, teste de tetrazólio - TZ, condutividade elétrica - CE e respiração - RES) e teste do etanol (ETA) com diferentes tempos de embebição (30 - ETA30, 60 - ETA60, 90 - ETA90 e 120 minutos - ETA120).

Com relação ao metabolismo das enzimas fermentativas (Figura 8), salienta-se que foram selecionados apenas cinco lotes entre os 10 lotes de sementes de soja utilizados no teste do etanol, utilizando-se como critério aqueles lotes que não

diferiram entre si no teste do etanol, independentemente do tempo de embebição, com exceção de um lote 8, que diferiu dos demais em todos os tempos de embebição avaliados, no intuito de ter amplitude nos resultados.

Inicialmente, constatou-se que houve atividade das enzimas fermentativas LDH, PDC e ADH, ratificando que houve a produção de etanol durante a imersão das sementes de soja em água e ambiente de 41 °C, independentemente do tempo de embebição (Figura 8).

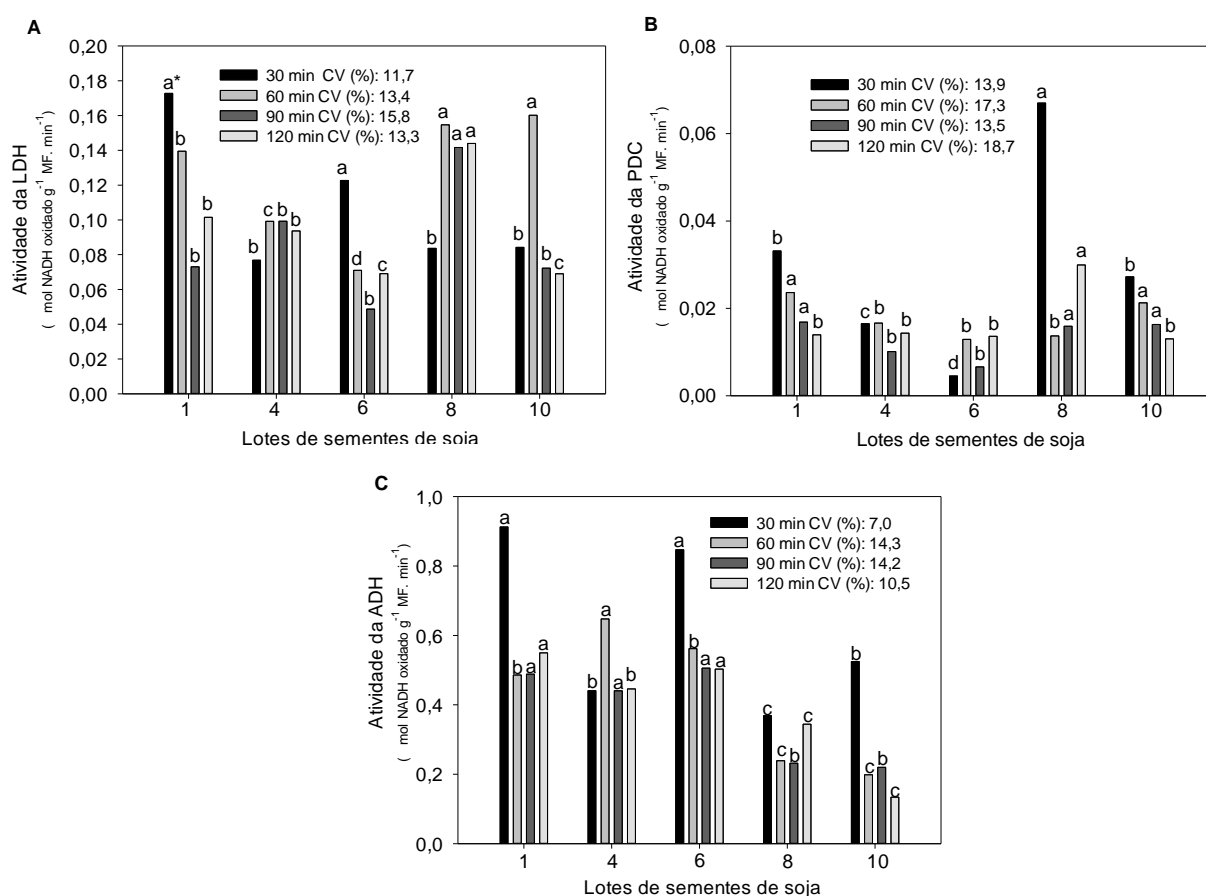


Figura 8 – Atividade da lactato desidrogenase (LDH - A), piruvato descarboxilase (PDC - B) e álcool desidrogenase (ADH - C) de sementes de soja oriundas de diferentes lotes, previamente submetidas a diferentes tempos de embebição no teste do etanol (30, 60, 90 e 120 minutos).

*Barras de mesma coloração entre os lotes e seguidas pela mesma letra minúscula, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott 5% de probabilidade. CV: coeficiente de variação.

Em se tratando da enzima LDH em sementes de soja, embebidas por 30 minutos em água, observou-se que a atividade foi mais intensa nos lotes 1 e 6. Aos 60 minutos, a atividade da enzima LDH apresentou maior intensidade nos lotes 8 e

10. Já para os tempos de embebição de 90 e 60 minutos, a maior atividade da LDH foi constatada no lote 9 (Figura 8A).

Nas condições de hipóxia em que as sementes de soja foram submetidas, a síntese de muitas proteínas da célula é suprimida enquanto a síntese de um grupo específico de proteínas aumenta (ZABALZA et al., 2009; CHRISTIANSON et al., 2010). Incluídas neste grupo de duas vias importantes, sendo que a primeira e não menos importante, utiliza o piruvato como substrato para produzir lactato pela ação da lactato desidrogenase (LDH).

No entanto, a produção de lactato logo que o tecido vegetal entra em hipóxia, ocorre a acidificação do citosol. A queda do pH citosólico sinaliza para a produção de etanol, uma vez que a enzima PDC é ativada quando o pH diminui e a ADH é ativada sob condições de hipóxia (REN et al., 2017).

Esta modificação no metabolismo, decorrente da produção de lactato, é comprovada pela atividade da enzima PDC (Figura 8B), na qual as sementes do lote 8, caracterizado como o de menor qualidade inicial (Tabela 1), apresentaram a maior atividade da PDC nos tempos de embebição de 30, 90 e 120 minutos (Figura 8B). Com relação aos demais lotes, observou-se que no tempo de 30 minutos, as sementes dos lotes 1, 4, 6 e 10, apresentaram atividade da PDC em níveis bem inferiores quando comprado as sementes do lote 8. Os demais tempos de embebição apresentaram pouca variação na atividade da enzima PDC entre os lotes de sementes de soja (Figura 8B).

Acredita-se que por ter baixo conteúdo de carboidrato e apresentar membranas celulares com maior nível de desorganização, os tecidos das sementes que constituíam o lote 8 (Figura 8B), aceleraram o processo de oxidação e descarboxilação do piruvato em acetaldeído, na tentativa de modificar rapidamente sua rota metabólica, e inibir o efeito do lactato no citosol. É sabido que o lactato induz a atividade da enzima PDC, com a finalidade de alterar a conversão do piruvato em acetaldeído, produto com menor potencial de dano nas células (BUI et al., 2019).

Para a atividade da enzima ADH em sementes de soja, constatou-se para o tempo de embebição de 30 minutos, que os lotes 1 e 6 não diferiram entre si e que as sementes do lote 8 apresentaram a menor atividade neste tempo (Figura 8C). Logo, para os tempos de 60, 90 e 120 minutos, as sementes do lote 8 apresentaram

a menor atividade da ADH, com exceção do lote 10 aos 90 minutos de embebição, que não diferiu do lote 9 (Figura 8C).

Em termos de eficiência, a rota de formação do etanol é mais importante que a rota de formação de lactato, pois essa via promove uma maior geração de NAD⁺ e o consumo de prótons (KATO-NOGUCHI, 2000). Desta forma, sementes em estado de hipóxia que passam a produzir etanol de forma ordenada, tendem apresentar maior estruturação de suas organelas, membranas bem estruturadas e maior conteúdo de reservas, porque a queda do pH citosólico sinaliza a produção de etanol, uma vez que a enzima PDC é ativada quando o pH diminui e a ADH é ativada sob condições de hipóxia (KURSTEINER et al., 2003).

Em se tratando da correlação entre o teste do etanol e as enzimas fermentativas, constatou-se correlação significativa entre o teste do etanol nos tempos de embebição de 60, 90 e 120 minutos e a enzima LDH, a medida em que a atividade dessa enzima permanece ativa, menor a produção de etanol. Este fato se dá devido a LDH ser a primeira proteína a se manifestar durante a hipóxia, porém, seu produto, o lactato, por ser um ácido fraco, dissocia-se rapidamente causando acidificação do citoplasma. A acidificação do citoplasma das células, proveniente da dissociação do lactato, inibe a atividade da LDH e induz a ativação da enzima PDC (CHRISTIANSON et al., 2010).

Tabela 2 – Correlação de Pearson entres o teste do etanol e as enzimas lactato desidrogenase (LDH), piruvato descarboxilase (PDC) e álcool desidrogenase (ADH) de sementes submetidas a diferentes tempos de embebição (30, 60, 90 e 120 minutos).

	ETA 30	ETA 60	ETA 90	ETA 120	LDH	PDC	ADH
ETA 30	1	0,973**	0,308 ^{ns}	0,940**	-0,374 ^{ns}	0,845**	0,657*
ETA 60		1	0,415 ^{ns}	0,991**	-0,482*	0,765*	0,544*
ETA 90			1	0,494 ^{ns}	-0,606*	0,421 ^{ns}	0,345*
ETA 120				1	-0,554*	0,309 ^{ns}	0,436*
LDH					1	0,634**	0,897**
PDC						1	0,932**
ADH							1

* Significativo a 1%; ** significativo a 5%; ^{ns} não significativo.

As correlações correspondentes ao teste do etanol com sementes embebidas em água por 30 e 60 minutos e as variáveis comparativas PDC e ADH, foram significativas a 5 % de probabilidade, com efeito positivo ao teste do etanol (Tabela

2). Já para os tempos de embebição de 90 e 120 minutos, não houve correlação significativa para a enzima PDC. Porém, para a enzima ADH, estes tempos de embebição apresentaram alta correlação positiva, na qual, a medida em que a atividade a enzima ADH se intensificou, maior foi a produção etanol (Tabela 2).

Esse processo de acúmulo de etanol envolve a oxidação do NADH e resulta em pequena, mas essencial, produção de ATP para a sobrevivência de algumas espécies durante a ausência de oxigênio. Durante as primeiras horas da germinação, as sementes são impermeáveis ao oxigênio, logo, as mesmas rapidamente geram um aumento no coeficiente respiratório e aumenta à atividade da ADH e ativa a fermentação alcoólica (TAIZ et al., 2017), sendo um processo sequencial à atividade da PDC.

Embora a indução da atividade da ADH, PDC e LDH possa contribuir para a sobrevivência e superação da escassez de energia através da fermentação de carboidratos para manter a produção de ATP na ausência de oxigênio (WANG et al., 2009), o benefício sob tais condições vai depender do tipo de tecido, estágio de desenvolvimento, espécie, genótipo, da gravidade e da duração do estresse (FUKAO; BAILEY-SERRES, 2004; WANG et al., 2009). De modo geral, espécies ou genótipos que apresentam maior concentração de carboidratos nas células e um mecanismo metabólico eficiente associado à sua mobilização via metabolismo fermentativo, apresentam maior tolerância para enfrentar a privação de oxigênio, podendo prolongar sua vida até que uma situação normal seja reestabelecida (SAIRAM et al., 2009).

Enfatiza-se que o teste do etanol é um método promissor para analisar a qualidade fisiológica de sementes, permitindo a obtenção de informações relacionadas ao metabolismo do etanol, sendo este, um indicador precoce do processo de deterioração de sementes (BUCKLEY; BUCKLEY, 2009). No entanto, o teste é realizado com equipamentos adaptados, que podem comprometer a acurácia do teste, devido a equívocos metodológicos que o próprio equipamento pode impor.

De acordo com Silva et al. (2021), é possível quantificar a liberação de etanol em soja utilizando um bafômetro adaptado. No entanto, ao avaliarem o vigor de sementes de soja com um bafômetro, os autores concluíram que o equipamento adaptado não é eficiente na ranqueamento de lotes em diferentes níveis de vigor, o

que requer ajustes ou mesmo o desenvolvimento de equipamentos para realizar o teste de forma mais segura e confiável.

4 Conclusões

A aplicação do teste do etanol em sementes de soja utilizando o novo equipamento é eficiente no ranqueamento dos lotes em diferentes níveis de vigor, ao utilizar o tempo de embebição de 30 minutos.

Os tempos de embebição apresentam associação moderada entre o teste de condutividade elétrica e a respiração das sementes no teste de PCA, evidenciam que há influência da integridade da membrana plasmática na liberação de etanol pelas sementes de soja.

A atividade das enzimas LDH, PDC e ADH comprovam que há a produção de etanol durante o processo de embebição das sementes de soja.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O funcionamento correto do sensor MQ-3, bem como sua estabilização de aferição em um curto espaço de tempo, comprova que os componentes eletrônicos utilizados na composição do sistema são adequados. Neste caso, o sensor MQ-3 é eficiente em detectar a presença de etanol no ambiente sem receber interferência de ruídos externos.

Apesar do sensor MQ-3 apresentar eficiência na detecção de etanol liberado por sementes de soja em processo de anaerobiose, atualmente existem sensores mais sofisticados e tecnológicos, com capacidade elétrica mais robusta, que podem agregar confiabilidade ao teste do etanol. Contudo, a análise realizada para determinar o metabolismo das enzimas fermentativas, comprova que houve a produção de etanol das sementes naquelas condições e que o sensor foi capaz de quantificá-lo.

O teste do etanol em si, pode ser utilizado em sementes de soja como ferramenta para ranquear lotes e para prever eventos iniciais no processo de deterioração, já que o etanol é produto de uma alteração metabólica quando estas são submetidas estresse de hipóxia, sendo esse estado de estresse facilmente alcançado, podendo acelerar a leitura do teste.

O teste do etanol também tem potencial para ser empregado em diversas espécies de interesse comercial, visto que a metodologia empregada neste trabalho permite ter uma base metodológica, possibilitando novos estudos, que venham a determinar o tempo mínimo em que a espécie objeto de estudo passe a utilizar o metabolismo fermentativo durante o estresse anaeróbico.

Devido a praticidade, o teste do etanol possui características de interesse comercial, já que, em sementes de soja, apresenta-se como um teste rápido, prático e que não exige mão de obra qualificada para seu manuseio, além de ter potencial para prever eventos degenerativos no armazenamento de sementes.

Assim, estudos ainda mais específicos devem ser priorizados, para que seja possível criar uma relação entre a quantidade de etanol liberado pelas sementes com o desempenho do teste emergência de plântulas, principalmente, tornando o teste ainda mais palpável ao setor de produção de sementes de soja.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADNYANA, P. M. A. Y.; SWAMARDIKA, I. A.; RAHARDJO, P. Rancang bangun alat pendeteksi kadar alkohol pada minuman beralkohol menggunakan sensor MQ-3 berbasis ATmega328. **E-Journal SPEKTRUM**, v. 2, n. 3, p. 111-116, 2015.

ALCANTARA, G. B.; BARISON, A.; SANTOS, M. S.; SANTOS, L. P.P.; TOLEDO, J. F. F. Assessment of genetically modified soybean crops and different cultivars by Fourier transform infrared spectroscopy and chemometric analysis, **Orbital – The Electronic Journal of Chemical**, v. 2, n. 1, p. 41-52, 2010.

ALVARENGA, R. O.; MARCOS FILHO, J.; GOMES JUNIOR, F. G. Avaliação do vigor de sementes de milho super doce por meio da análise computadorizada de imagens de plântulas. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 34, n. 3, p. 488-494, 2012.

AMARO, H.T.R.; DAVID, A. M. S. S.; SILVA NETA, I. C.; ASSIS, M. O.; ARAUJO, E.F. E ARAUJO, R. B. Teste de envelhecimento acelerado em sementes de crambe (*Crambe abyssinica* Hochst), cultivar FMS Brilhante. **Revista Ceres**, v. 61, n. 3, p. 202-208, 2014.

ANDRADE, G. C.; COELHO, C. M. M.; VIRGÍLIO, G. U. Modelling the vigor of maize seeds submitted to artificial accelerated ageing based on ATR-FTIR data and chemometric tools (PCA, HCA and PLS-DA). **Heliyon**, v. 6, n. 2, p. 1-15, 2020.

ANJUM, S; KHAIRNAR, R. Carbon nanotubes blended hydroxyapatite ethanol sensor. **Sensing and Imaging**, v 17, n. 18, p. 1-10, 2016.

AOSA - ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS. **Seed vigor testing handbook**. Lincoln, 2009. 105 p. (Contribution, 32).

ASSONI, D. A.; MAGRO, F. V. G. Estudo de viabilidade técnico-econômica para implantação de etilômetro em veículos automotores. **Revista Uningá**, v. 51, p. 44-47, 2017.

AUMONDE, T. Z.; MARINI, P.; MORAES, D. M. DE; MAIA, M. DE S.; PEDÓ, T.; TILLMANN, M. A.; VILLELA, F. A. Classificação do vigor de sementes de feijão-miúdo pela atividade respiratória. **Interciencia**, v. 37, p.55-58, 2012.

BAGATELI, J. R.; DÖRR, C. S.; SCHUCH, L. O. B.; MENEGHELLO, G. E. Productive performance of soybean plants originated from seed lots with increasing vigor levels. **Journal of Seed Science**, v. 41, n. 2, p. 151-159, 2019.

BARBOSA, R.M.; SILVA, C.B. da; MEDEIROS, M.A. de; CENTURION, M.A.P.C. da; VIEIRA, R.D. Condutividade elétrica em função do teor de água inicial de sementes de amendoim. *Ciência Rural*, v.42, p.45-51, 2012.

BEIRANYAND, R. Analysis of a switched-capacitor converter above its resonant frequency to overcome voltage regulation issue of resonant SCCs. **IEEE Transactions on Industrial Electronics**, v. 63, p. 5315-5325, 2016.

BEZERRA, A. R. G.; SEDIYAMA, T.; BORÉM, A.; SOARES, M. M. Importância Econômica. In: SEDIYAMA, T (Ed.) A. **Soja: do plantio à colheita**. Viçosa: Editora UFV, 2015. Cap. 1. p. 9-26.

BORNHOFEN, E.; BENIN, G.; GALVAN, D.; FLORES, M. F. Épocas de semeadura e desempenho qualitativo de sementes de soja. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 45, n. 1, p. 46-55, 2015.

BRAATHEN, C. The chemical principle of the breathalyzer. **Quimic. Nova Escola**, v. 5, p. 3-5, 1997.

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

BRASIL. Ministério Da Agricultura, Pecuária E Abastecimento. **Padrões para produção e comercialização de sementes de arroz**. Instrução normativa n.45, de 17 de dezembro de 2013. Diário Oficial da União, sec.1, p. 4-5. 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília, Secretaria de Defesa Agropecuária, 2009, 399p.

BUCKLEY, W. T., HUANG, J. A fast ethanol assay to detect seed deterioration. **Seed Science Research**, v. 39, p. 510-526, 2012.

BUCKLEY, W. T.; HUANG, J. MONREAL, M. A. Ethanol emission seed vigour test for canola: minimal effects from variations in incubation conditions, sample size and seed moisture content. **Seed Science and Technology**. v. 41, p. 270–280, 2013.

BUCKLEY, W. T.; J. HUANG. An ethanol-based seed vigour assay for canola. **Seed Science and Technology**, v. 39, v. 2, p. 510- 526, 2011.

BUCKLEY, W. T.; K. E. BUCKLEY. 2009. Low-molecular-weight volatile indicators of canola seed deterioration. **Seed Science and Technology**, v. 37, v. 3, p. 676-690, 2009.

BUCKLEY, W.T.; IZYDORCZYK, M. S.; LEGGE, W. G. Detection of incipient germination in malting barley with a starch viscosity method and a proposed ethanol emission method. **Cereal Chem**. V. 93, p. 450–455, 2016.

BUI, L. T.; NOVI, G.; LOMBARDI, L.; IANNUZZI, C.; ROSSI, J.; SANTANIELLO, A.; ZAFFAGNINI, M. Conservation of ethanol fermentation and its regulation in land plants. **Journal of experimental botany**, v. 70, p. 1815–1827, 2019.

CARVALHO, D. G.; LEYTON, V. Evaluation of alcohol concentrations in exhaled air: general considerations. **Revista de Psiquiatria Clinic**, v. 27, p. 76-82, 2000.

CATÃO, H.C.R.M.; CAIXETA, F. Electrical conductivity test in soybean seeds with reduced imbibition period. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 42, n. 2, p. 40-48, 2019.

CAVALCANTE, J. A.; GADOTTI, G. I.; TERNUS, R. M.; XAVIER, F. M.; SILVA; R. N. O.; EBERHARDT, P. E. O. R.; MARTINS, A. B. N.; HORNKE, N. F.; MAZON, A. S.; TUNES, L. V. M. Evaluation of ethanol preconditioning as a rapid seed vigour and viability test. **Australian Journal of Crop Science**, v. 13, n. 7, p. 1835-2707, 2019.

CAVALCANTE, J. A.; TERNUS, R. M.; ALMEIDA, T. L.; REOLON, F.; ARAÚJO, A. S.; GADOTTI, G. I.; MORAES D. M. Ethanol vigor test to assess physiological quality of annual ryegrass seeds. **Revista Espacios**, v. 38, v. 47, p. 10-19, 2017.

CHRISTIANSON, J.A.; LLEWELLYN, D.J.; DENNIS, E.S.; WILSON, I.W. Global gene expression responses to waterlogging in roots and leaves of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Cell Physiology*, v. 51, p. 21-37, 2010.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento de safra brasileira de Grãos**. Décimo primeiro levantamento, Safra 2020/21. Brasília. v. 8, n.11, 2021, 108p.

CORONEL-REYES, J.; RAMIREZ-MORALES, I.; FERNANDEZ-BLANCO, E.; RIVERO, D.; PAZOS, A. Determination of egg storage time at room temperature using a low-cost NIR spectrometer and machine learning technique. **Computers and Electronics in Agriculture**, v.145, p. 1–10, 2018.

DELARMELINO, L. M. **Composição química e qualidade fisiológica de sementes de soja**. 2012. 28p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Sementes) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Pelotas, 2012.

DREW, M. C. Oxygen deficiency and root metabolism: injury and acclimation under hypoxia and anoxia. **Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology**, v.48, p. 223–250, 1997.

EBONE, L. A. **Vigor de sementes de soja: características de raízes, crescimento vegetativo e rendimento de grãos**. 2020. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2020.

FESSEL, S. A.; PANOBIANCO, M.; SOUZA, C. R., VIEIRA, R. D. Teste de condutividade elétrica em sementes de soja armazenadas sob diferentes temperaturas. **Bragantia**, v. 69, p. 207-214, 2010.

FRANÇA NETO, J.B.; KRZYZANOWSKI, F.C. **Metodologia do teste de tetrazólio em sementes de soja**. Londrina: EMBRAPA-CNPSo, 2018. 108p.

FRANÇA-NETO, J. B.; KRZYZANOWSKI, F. C. Tetrazolium: an important test for physiological seed quality evaluation. **Journal of Seed Science**, v.41, n.3, p.359-366, 2019.

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

FRANDOLOSO, D. C. L.; RODRIGUES, D. B.; ROSA, T. D.; ALMEIDA, A. S.; SOARES, V. N.; BRUNES, P.B.; TUNES, L. V. M. Qualidade de sementes de alface avaliada pelo teste de envelhecimento acelerado. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 40, n. 4, p. 703-713, 2017.

FUKAO, T.; BAILEY-SERRES, J. Plant responses to hypoxia. **Is survival a balancing act Trends Plant Science**, v. 9, p. 1403-1409, 2004.

GOMES JUNIOR, F. G.; MONDO, V. H. V.; CICERO, S. M.; MCDONALDO; BENNETT, M. A. Evaluation of priming effects on sweet corn seeds by SVIS. *Seed Technology*, **Lincoln**, v. 31, n. 6, p. 95-100, 2009.

GONZÁLEZ-BUESA, J.; SALVADOR, M. L. Arduino-based low-cost device for the measurement of the respiration rates of fruits and vegetables. **Computer Electron Agronomy**, v. 162, p. 14–20, 2019.

GRZYBOWSKI, C. R. S.; VIEIRA, R. D.; PANOBIANCO, M. Testes de estresse na avaliação do vigor de sementes de milho. **Revista Ciência Agronômica**, v. 46, n. 3, 590-596, 2015.

GUEDES, R. S.; ALVES, E. U.; GONÇALVES, E. P.; SANTOS, S. R. N.; LIMA, C. R. Testes de vigor na avaliação da qualidade fisiológica de sementes *Erythrina velutina* Willd. (FABACEAE - PAPILIONOIDEAE). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, n. 5, 1360-1365, 2019.

HAMID, H.; LOCKMAN, Z.; RAZAK, K. Properties of zinc oxide nanorods as ethanol sensor. **J. of Physics: Conf. Series**, v. 1083, p. 1-7, 2018.

HANSON, A. D.; JACOBSEN, J. V. Control of Lactate dehydrogenase, lactate glycolysis, and-amilase by O₂ deficit in barley aleurone layers. **Plant Physiology**, v. 74, p. 566-572, 1984.

HOFFMASTER, A.L.; FUJIMURA, K.; MCDONALD, M. B.; BENNETT, M. A. An automated system for vigor testing three-day old soybean seedlings. **Seed Science and Technology**, v. 31, n. 3, p. 701-713, 2003.

HU, X.; GONG, C. A high voltage gain DC–DC converter integrating coupled-inductor and diode–capacitor techniques. **IEEE Power Elec**, v. 29, p. 789–800, 2014.

KATO-NAGUCHI, H. Evaluation of the importance of lactate for the activation of ethanolic fermentation in the lettuce in anoxia. **Plant Physiology**, v. 109, p. 28-33, 2000.

KEOGH, B. Power Factor Correction Using the Buck Topology- Efficiency Benefits and Practical Design Considerations. **Texas Instruments Power Supply Design Seminar Power Supply Design Seminar SEM1900**, Topic 4, p. 1–37, 2010.

KODDE, J.; W. T. BUCKLEY, C. C.; GROOT, M.; RETIERE, A. M. V.; ZAMORA, GROOT, S. P. C. A fast ethanol assay to detect seed deterioration. **Seed Science Research**, v. 22, n. 1, p. 55- 62, 2012.

KOLCHINSKI, E.M.; SCHUCH, L.O.B; PESKE, S.T. Vigor de sementes e competição intra-específica em soja. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.6, p.1248-1256, 2005.

KRZYZANOWSKI, F. C. Teste de comprimento de raiz de plântula de soja. **Informativo ABRATES**, v. 2, p. 11-14, 1991.

KURSTEINER, O.; DUPUIS, I.; KUHLEMEIER, C. The Pyruvate decarboxylase1 gene of Arabidopsis is required during anoxia but not other environmental stresses. **Plant Physiology**, v. 132, p. 968-978, 2003.

LARIOS, G. S. Larios, G.; Nicolodelli, G.; Ribeiro, M., Canassa, T.; Reis, A. R.; Oliveira, S. L.; Alves, C. Z.; Marangoni, B. S.; Cena, C. Soybean seed vigor discrimination by infrared spectroscopy and machine learning algorithms. **Analytical Methods**, v. 12, n. 1, p. 4303-4309, 2020.

LEITE, M. S.; TORRES, S. B.; FREITAS, R. M. O.; NOGUEIRA, N. W.; LEITE, T. S.; PAIVA, E. P. Vigor determination of okra seeds by respiratory activity. **Bioscience Journal**, v. 34, p. 1551-1554, 2018.

MACIEL, A. P.; PARO, F.; LEITE, E. R. E. Longo Dióxido de estanho nanoestruturado como sensor de NOx (Nanostructured tin dioxide as a NOx gás sensor). **Cerâmica**, v. 49, n 1. p. 163-167, 2003.

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

MARCOS FILHO, J. **Seed Physiology of Cultivated Plants**. (2ed.). ABRATES, Londrina, 2015a, 660p.

MARCOS FILHO, J. Seed vigor testing: an overview of the past, present and future perspective. **Scientia Agricola**, v. 72, n. 4, p. 363-374, 2015.

MARCOS FILHO, J. Teste de envelhecimento acelerado. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. cap.3.1, p.3.24.

MARCOS FILHO, J.; GOMES JUNIOR, F. G.; BENNETT, A. M.; WELLS, A. A. Susan Stieve. Using tomato analyzer software to determine embryo size in x-rayed seeds. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n. 2, p. 146-153, 2010.

MARCOS-FILHO, J. Teste de envelhecimento acelerado. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA-NETO, J. B.; MARCOS-FILHO, J. (Eds.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina, PR: ABRATES, 2020. Cap. 04, p.185-246.

MEDEIROS, A. D.; MARTINS, M. S.; SILVA, L. J.; PEREIRA, M. D.; LEÓN, M. J. Z.; DIAS, D. C. F. S. X-ray imaging and digital processing application in non-destructive assessing of melon seed quality. **Journal of Seed Science**, v. 42, e202042005, 2020.

MENDES, C. R.; MORAES, D. M.; LIMA, M. G. S.; LOPES, N. F. Respiratory activity for the differentiation of vigor on soybean seeds lots. **Revista Brasileira de Sementes**, v.31, p.171-176, 2009.

MENEZES, N. L.; SILVEIRA, T. L. D.; PASINATTO, P. R. Comparação entre métodos para avaliação rápida da qualidade fisiológica de sementes de arroz. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 16, p. 121-127, 1994.

MONCALEANO-ESCANDON, J.; SILVA, B. C. F.; SILVA, S. R. S.; GANJA, J. A. A.; ALVES, M. C. J. L.; POMPELLI, M. F. Germination responses of *Jatropha curcas* L. seeds to storage and aging. **Industrial Crops and Products**, v. 44, p. 684-690, 2013.

MORAES, D. M.; BANDEIRA, J. M.; MARINI, P.; LIMA, M. G. S.; MENDES, C. R. **Práticas Laboratoriais em Fisiologia Vegetal**. (1.ed.) Pelotas: Cópias Santa Cruz LTDA, 2012, 162p.

NADERI, A.; ABBASZADEH, K. 'High step-up DC–DC converter with input current ripple cancellation'. **IET Power Electron**. v. 9, n. 12, p. 2394– 2403, 2016.

ONWIMOL, D., RONGSANGCHAICHAREAN, T., THOBUNLUEPOP, P., CHAISAN, T., CHANPRASERT, W. Optimization and sensitivity analysis of fast ethanol assay in maize seed. **Journal of Seed Science**, v.41, n.1, p.097-107, 2019.

ORNELLAS, F. L.S.; SOUSA, A. O. ; PIROVANI, C. P.; ARAÚJO, M.N.; COSTA, D. S.; DANTAS, B.F.; BARBOSA, R. M. Gene expression, biochemical and physiological activities in evaluating melon seed vigor through ethanol release. **Scientia Horticulturae**, v. 261, p. 108-884, 2019.

PRADO, J. P.; KRZYZANOWSKI, F. C.; MARTINS, C. C.; VIEIRA, R. D. Physiological potential of soybean seeds and its relationship to electrical conductivity. **Journal of Seed Science**, v. 41, n. 4, p. 407-415, 2019.

R Core Team. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, 2014. Available on <<http://www.R-project.org/>>. Acesso em 23 jan de 2021.

REN, B.; ZHANG, J.; DONG, S.; LIU, P.; ZHAO, B. Exogenous 6- benzyladenine improves antioxidative system and carbon metabolism of summer maize waterlogged in the field. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 204, n. 2, 175–184, 2017.

ROCHA, M.; LICAUSI, F.; ARAÚJO, W. L.; NUNES-NESI, A.; SODEK, L.; FERNIE, A.R.; VAN DONGEN, J. T. Glycolysis and the Tricarboxylic Acid Cycle Are Linked by Alanine Aminotransferase during Hypoxia Induced by Waterlogging of *Lotus japonicus*. **Plant Physiology**, v. 152, p. 1501-1513, 2010.

RÖCK, F.; BARSAN, N.; WEIMAR, U. Electronic nose: Current status and future trends. **Chem. Rev.** v. 108, p. 705–725, 2008.

SAIRAM, R. K.; KUMUTHA, D.; VISWANATHAN, C.; RAMESH, C.M. Waterlogging-induced increase in sugar mobilization, fermentation, and related gene expression in the roots of mung bean (*Vigna radiata*). **Journal of Plant Physiology**, v. 166, p. 602-616, 2009.

SAKO, Y. MB MCDONALD; FUJIMURA, K.; EVANS, A. F.; BENNETT, M. A. A system for automated seed vigour assessment. **Seed Science and Technology**, v. 29, n. 3, p. 625-636, 2001.

SAHU, P.; DIXIT, S.; MISHRA, S.; SRIVASTAVA, S. Alcohol Detection based Engine Locking System using MQ-3 Sensor. **International Research Journal of Engineering and Technology**. V. 4, n. 4, p. 979-981, 2017.

SANTOS, F., TRANI, P. E., MEDINA, P. F., PARISI, J. J. D. Teste de envelhecimento acelerado para avaliação da qualidade de sementes de alface e almeirão. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 33, p. 322-323, 2011.

SATRIA, A V.; WILDIAN. Rancang Bangun Alat Ukur Kadar Alkohol Pada Cairan Menggunakan Sensor MQ-3 Berbasis Mikrokontroler AT89s51. **Jurnal Fisika Unand**, v. 2, n. 1, p. 13-19, 2013.

SCHEEREN, B. R.; PESKE, S. T.; SCHUCH, L. O. B.; BARROS, A. C. S. A. Qualidade fisiológica e produtividade de sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**. v. 32, n. 3, p. 035-041, 2010.

SILAVA, A. H. M.; CAVALCANTE, J. C.; ARAÚJO, A. S.; SILVA, R. N. O.; NADAL, A. P.; GADOTTI, G. I. Tempo de estabilização do sensor MQ-3 para medição de etanol em grãos de feijão. 2010, XXVI CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA. 36., Pelotas. **Anais [...]**. Pelotas: UFPel, 2017.

SILVA, H. M. A. R.; RODRIGUES, M. P. M.; EUSÉBIO, M. **Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)**. Lisboa: LNEC, 2007. 48p.

SILVA, R. N. O.; CAVALCANTE, J. A.; GADOTTI, G. I.; MARTINS, A. B. N.; TEIXEIRA, S. B.; VERGARA, R. O.; TUNES, L. V. M. Soybean seed vigor: ethanol quantification test. **Agricultural Engineering International: CIGR Journal**, v. 23, n. 2, p. 239- 246, 2021.

SILVA, R. N. O.; CAVALCANTE, J. A.; GADOTTI, G. I.; MARTINS, A. B. N.; TEIXEIRA, S. B.; VERGARA, R. O.; TUNES, L. V. M. Soybean seed vigor: ethanol quantification test. **AgricEngInt: CIGR Journal Open**. v. 23, n. 2, p. 239-246, 2021.

SILVA, V. N.; ZAMBIASI, C. A.; TILLMANN, M. A. A.; MENEZES, N. L.; VILLELA, F.A. Condução do teste de condutividade elétrica utilizando partes de sementes de feijão. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 37, n. 2, p. 206-213, 2014.

STEINER, F.; OLIVEIRA, S. S. C; MARTINS, C. C.; CRUZ, J. S. Comparação entre métodos para a avaliação do vigor de lotes de sementes de triticales. **Ciência Rural**, v. 41, p. 200-204, 2011.

STRECK, E. V.; KÄMPF, N.; DAMOLIN, R. S. D.; KLAMT, E.; NASCIMENTO, P. C.; SCHNEIDER, P.; GIASSON, E.; PINTO, L. F. S. **Solos do Rio Grande do Sul**. 2.ed. Porto Alegre: EMATER/RS-ASCAR, 2008. 222p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I. M.; MURPHY, A. **Fisiologia vegetal**. (6. ed.). Porto Alegre, Artmed, 2017, 888p.

TILLMANN, M. A. A.; TUNES, L. M. V.; ALMEIDA, A. S. Análise de Sementes. In: PESKE, S. T.; VILLELA, F. A.; MENEGHELLO, G. E. **Sementes: fundamentos científicos e tecnológicos**. (4.ed.) Revisada, atualizada e ampliada. Pelotas: Editora Becker & Peske Ltda. Ed. Universitária UFPel, Pelotas, 2019. p. 147-259.

VERGARA, R. O.; SOARES, V. N.; SILVA, R. N. O.; MARTINS, A. B. N.; GADOTTI, G. I., VILLELA, F. A. Teste de quantificação de etanol para avaliação da qualidade fisiológica sementes de quinoa. **Colloquium Agrariae**, v. 14, n. 2, p. 143-148, 2018.

VIEIRA, R. D.; MARCOS-FILHO, J. Teste de condutividade elétrica. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA-NETO, J.B.; MARCOS-FILHO, J. (Eds.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina, PR: ABRATES, 2020. Cap. 08, p. p.333-388.

WANG, K.; BIAN, S.; JIANG, Y. Anaerobic metabolism in roots of Kentucky bluegrass in response to short-term waterlogging alone and in combination with high temperatures. **Plant Soil**, v. 314, p. 221–229, 2009.

WENDT, L.; MALAVASI, M. M.; DRANSKI, J. A. L.; MALAVASI, U. C.; GOMES JUNIOR, F. G. Relações entre testes de vigor com a emergência a campo em sementes de soja. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.12, p.166-171, 2017.

WOODSTOCK, L. W. TAYLORSON, R. B. Ethanol and acetaldehyde in imbibing soybean seeds in relation to deterioration. **Plant Physiology**, v. 67, p. 424–428, 1981.

YAMAUCHI, T.; WATANABE, K.; FUKAZAWA, A.; MORI, H.; ABE, F.; KAWAGUCHI, K.; OYANAGI, A.; NAKAZONO, M. Ethylene and reactive oxygen species are involved in root aerenchyma formation and adaptation of wheat seedlings to oxygen-deficient conditions. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, p. 261–273, 2014.

YANG, J.; YU, D.; CHENG, H.; ZAN, X.; WEN, H. Dual-coupled inductors-based high stepup DC/DC converter without input electrolytic capacitor for PV application. **IET Power Electron**. v. 10, p. 646–656, 2017.

ZABALZA, A.; VAN DONGEN, J.T.; FROEHLICH, A.; OLIVER, S.N.; FAIX, B.; GUPTA, K.J.; SCHMÄZLIN, E.; IGAL, M.; ORCARAY, L.; ROYUELA, M.; GEIGENBERGER, P. Regulation of respiration and fermentation to control the plant internal oxygen concentration. **Plant Physiology**, v. 149, p.1087-1098, 2009.