



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DOUTORADO EM AGRONOMIA**

CINTHIA VIEIRA GOLFI ANDRIAZZI

**DETERMINAÇÃO DA QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE MILHO
POR EQUIPAMENTO DE INFRAVERMELHO E RESSONÂNCIA NUCLEAR
MAGNÉTICA**

Presidente Prudente - SP
2021



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DOUTORADO EM AGRONOMIA**

CINTHIA VIEIRA GOLFI ANDRIAZZI

**DETERMINAÇÃO DA QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE MILHO
POR EQUIPAMENTO DE INFRAVERMELHO E RESSONÂNCIA NUCLEAR
MAGNÉTICA**

Tese apresentada Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Agronomia –Área de concentração: Produção Vegetal

Orientador: Ceci Castilho Custódio

Presidente Prudente - SP
2021

631.521
A573d

Andriazzi, Cinthia Vieira Golfi.

Determinação da qualidade fisiológica de sementes de milho por equipamento de infravermelho e ressonância nuclear magnética / Cinthia Vieira Golfi Andriazzi. – Presidente Prudente, 2021.

114f.: il.

Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2021.

Bibliografia.

Orientador: Ceci Castilho Custódio

1. Detecção não destrutiva. 2. Vigor de sementes. 3. *Zea mays*. 4. NIR. I. Título.

Catálogo na fonte: Michele Mogni – CRB 8-6204

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "DETERMINAÇÃO DA QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE MILHO POR EQUIPAMENTO DE INFRAVERMELHO E RESSONÂNCIA NUCLEAR MAGNÉTICA"

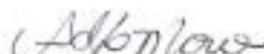
AUTOR(A): CINTHIA VIEIRA GOLFI ANDRIAZZI

ORIENTADOR(A): Ceci Castilho Custódio

Aprovado(a) como parte das exigências para obtenção do título de DOUTORA em AGRONOMIA

Área de Concentração PRODUÇÃO VEGETAL, pela Comissão Examinadora:

Dra. Adriana Lima Moro



UNOESTE – Universidade do Oeste Paulista / Presidente Prudente (SP)

Dr. Fábio Fernando de Araújo



UNOESTE – Universidade do Oeste Paulista / Presidente Prudente (SP)

Dr. Plínio Tadeu Cristofoletti Junior



Bayer Brasil / Uberlândia (MG)

Dra. Sara Morra Coser



Bayer Brasil / Uberlândia (MG)

Dra. Ceci Castilho Custódio



UNOESTE – Universidade do Oeste Paulista / Presidente Prudente (SP)

Presidente Prudente, 27 de Agosto de 2021.

DEDICATÓRIA

*“Não peça a Deus pra guiar seus passos se você não estiver disposto a mover seus
pés!”
(anônimos)*

Ao meu esposo Marcelo e ao meu filho Henrique, dedico!

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado saúde e disposição para encarar esse sonho;

À Monsanto/Bayer, na figura do Alexandre Merlin por todo incentivo, à Maria Clara Logato, Odirlei Milani e Kamylla Leandro por toda ajuda na execução dos experimentos;

À UNOESTE, em especial à professora Ceci que aceitou esse desafio comigo e muito me ajudou a concluí-lo;

À minha família que sempre me apoiou, em especial minha mãe, Terezinha e meus sogros, Tereza e Antônio por todo o suporte dedicados ao Marcelo e ao Henrique possibilitando a realização deste trabalho.

Aos meus amigos por todo apoio.

RESUMO

Determinação da qualidade fisiológica de sementes de milho por equipamento de infravermelho e ressonância nuclear magnética

A viabilidade da semente é de grande significância nas características de qualidade da semente refletindo o potencial germinação de sementes, e há uma grande necessidade de um método rápido e eficaz para determinar a qualidade fisiológica de sementes de milho. Sendo assim, a presente pesquisa objetivou avaliar a qualidade fisiológica em sementes de milho úmidas por meio de equipamento infravermelho e ressonância nuclear magnética e correlacionar a técnica não destrutiva com o teor de óleo ou matéria seca, das sementes, para antecipar o direcionamento do processo dentro da UBS (Unidade de Beneficiamento de Sementes). O experimento foi realizado na Bayer Brasil, Uberlândia-MG, foram utilizadas espigas de milho das safras Inverno 2018, Inverno 2019, Verão 2019 ou Inverno 2020, com umidade de colheita entre 25% e 36%. O experimento contemplou três fases: relação óleo e fisiológico, curva de deterioração controlada e validação do equipamento no processo de decisão para beneficiamento das sementes. Foi possível concluir que os espectros gerados por equipamento NIR XDS podem ser utilizados de forma rápida para tomadas de decisão sobre as amostras de semente de milho, considerando uma classificação binária para os parâmetros de Germinação e Vigor de acordo com os valores de aprovação e reprovação de lotes utilizados pela empresa. Bem como, por meio do equipamento Minispec foi possível obter resultados válidos para a determinação de matéria seca, teor de óleo e umidade. Foi observada uma relação entre matéria seca e valores de germinação e vigor, porém não possibilitam, com uma sensibilidade suficiente, uma classificação dos lotes a partir de leituras de matéria seca no equipamento de ressonância magnética. Logo, os equipamentos infravermelho e ressonância nuclear magnética são promissores para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de milho.

Palavras-chave: detecção não destrutiva; vigor de sementes; *Zea mays*, NIR

ABSTRACT

Determination of the physiological quality of corn seeds by infrared and nuclear magnetic resonance equipment

The viability of the seed is of great significance in the quality characteristics of the seed reflecting the potential germination of seeds, and there is a great need for a fast and effective method to determine the physiological quality of corn seeds. Therefore, the present research aimed to evaluate the physiological quality of fresh corn seeds by means of infrared equipment and nuclear magnetic resonance and to correlate the non-destructive technique with the oil or dry matter content of the seeds, in order to anticipate the direction of the process within from UBS (Seed Processing Unit). The experiment was carried out at Bayer Brasil, Uberlândia-MG, corn ears from the Winter 2018, Winter 2019, Summer 2019 or Winter 2020 harvests were used, with harvest humidity between 25% and 36%. The experiment included three phases: oil and physiological relationship, controlled deterioration curve and validation of the equipment in the decision process for seed processing. It was possible to conclude that the spectra generated by NIR XDS equipment can be used quickly to make decisions about corn seed samples, considering a binary classification for the Germination and Vigor parameters according to the pass and fail values of lots used by the company. As well as, using the Minispec equipment, it was possible to obtain valid results for the determination of dry matter, oil content and moisture. A relationship was observed between dry matter and values of germination and vigor, but they do not allow, with sufficient sensitivity, a classification of the lots from readings of dry matter in the magnetic resonance equipment. Therefore, infrared and nuclear magnetic resonance equipment are promising for assessing the physiological quality of corn seeds.

Keywords: nondestructive detection; seeds vigor; *Zea mays*; NIR

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Fases da maturação de grãos de milho, caracterizadas pela linha de leite (“milk line”) e pelo escurecimento da placenta da semente (“black layer”), assim como as respectivas porcentagens de umidade.....24
- Figura 2 - Espectro eletromagnético com regiões do infravermelho e infravermelho próximo demarcadas.....46
- Figura 3 - Equipamento NIR XDS marca FOSS, instalado na Planta Piloto da Bayer de Uberlândia – MG.48
- Figura 4 - Exemplo do espectro possível de ser analisado pelo NIR XDS marca FOSS.....49
- Figura 5 - Exemplo de caixa montada para projeto piloto de câmara úmida.....52
- Figura 6 - Resumo do processo de montagem da curva de deterioração controlada.....53
- Figura 7 - Escores do PCA de duas componentes principais do primeiro conjunto de dados com os dados categorizados em relação à TPG – germinação (A) e RET – vigor (B).56
- Figura 8 - Gráfico de dispersão entre germinação com o teor de óleo (A) e vigor com o teor de óleo (B).....58

- Figura 9 - Gráfico do ganho de umidade percentual por dia/horas das amostras do teste piloto, instalado na Planta experimental da Bayer de Uberlândia – MG.....60
- Figura 10 - Gráfico da germinação (%) dos materiais A e B, em função do tempo de deterioração controlada (h), instalado no laboratório de análises de sementes da Bayer de Uberlândia – MG.....61
- Figura 11 - Gráfico do RET (vigor %) dos materiais A e B, em função do tempo de deterioração controlada (h), instalado no laboratório de análises de sementes da Bayer de Uberlândia – MG.....62
- Figura 12 - Gráfico do ganho de umidade percentual por dia/horas das amostras do experimento, durante a etapa de deterioração controlada, instalado no laboratório de análises de sementes da Bayer de Uberlândia – MG.....63
- Figura 13 - Gráficos dos espectros brutos das amostras do experimento, passadas pelo equipamento NIR XDS, durante a etapa de deterioração controlada, instalado no laboratório de análises de sementes da Bayer de Uberlândia – MG.....64
- Figura 14 - Gráficos dos espectros brutos das amostras do experimento clusterizados, passadas pelo equipamento NIR XDS, durante a etapa de deterioração controlada, instalado no laboratório de análises de sementes da Bayer de Uberlândia – MG. a – banda de pico do espectro onde ocorre concentração de CH_2 e provavelmente se encontra o óleo; 1100-1300 nm. b - banda de vale do espectro onde ocorre concentração de CH_2 e provavelmente se encontra o óleo; 1650-1800 nm.....66

- Figura 15 - Grupos funcionais atribuídos aos seus respectivos comprimento de onda/número de onda (Bruker®).....67
- Figura 16 - Espectros NIR de sementes de milho obtidas do terceiro conjunto de dados, de validação. Cada cor representa uma amostra.....70
- Figura 17 - Escores da PCA de duas componentes principais dos dados de validação categorizados em relação à TPG – germinação (A) e RET – vigor (B).....71
- Figura 18 - Variáveis selecionadas pelo método OPSDA para Germinação (A) e para Vigor (B).....74
- Figura 19 - Valores de Y preditos para os conjuntos de treinamentos (A e C) e testes (B e D) dos modelos OPSDA para Germinação (A e B) e para Vigor (C e D). A linha horizontal tracejada é o limite de discriminação das classes.....78
- Figura 20 - Equipamento Minispec TD-NMR Mq10, instalado na Planta Experimental da Bayer de Uberlândia – MG.....90
- Figura 21 - Exemplo da captura do sinal pelo equipamento e comportamento das curvas do tempo de relaxação T1 e T2.94
- Figura 22 - Correlação entre valores de referência e valores preditos pelo equipamento para matéria seca, em amostras de sementes secas, em gramas.....95
- Figura 23 - Correlação entre valores de referência determinados pelo SENAI e valores preditos pelo equipamento para teor de óleo, em amostras de sementes secas, em gramas.....96

- Figura 24 - Correlação entre valores de referência determinados pelo SENAI e valores preditos pelo equipamento para umidade, em amostras de sementes secas, em gramas.....98
- Figura 25 - Correlação entre valores de referência determinados pelo SENAI e valores preditos pelo equipamento para matéria seca, em amostras de sementes úmidas, em gramas.....99
- Figura 26 - Correlação entre valores de referência determinados pelo SENAI e valores preditos pelo equipamento para teor de óleo, em amostras de sementes úmidas, em gramas.....100
- Figura 27 - Correlação entre valores de referência determinados pelo SENAI e valores preditos pelo equipamento para umidade, em amostras de sementes úmidas, em gramas.....101
- Figura 28 - Análise dos principais componentes para Germinação, representada por WGT, Vigor representado por RET, matéria seca e teor de óleo.....102
- Figura 29 - Análise de regressão da matéria seca com a germinação (A) e análise de regressão da matéria seca com o vigor (B).....105
- Figura 30 - Diagrama de dispersão entre as variáveis analisadas: % de germinação (WGT%), % de vigor (RET%), % de matéria seca e % de óleo.....106

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Distribuição porcentual dos constituintes químicos da semente de milho. Média de valores obtidos de 11 variedades de milho.....	31
Tabela 2 -	Ingredientes da calda básica utilizados para tratamento de amostras.....	53
Tabela 3 -	Valores médios de absorvância dos híbridos A e B nas prováveis bandas de óleo, razão de bandas, média de TPG (% de germinação) e média de teste RET (% vigor) em cada período de envelhecimento.....	69
Tabela 4 -	Quantidade de amostras em cada classe nos conjuntos de treinamento e teste para Germinação e Vigor	74
Tabela 5 -	Parâmetros de avaliação dos modelos OPSDA para Germinação e Vigor em espectros NIR de sementes de milho.....	76
Tabela 6 -	Resultados de óleo, matéria seca e umidade, em % e em g, de amostras úmidas e secas enviadas ao SENAI e resultados de germinação e vigor em %, de amostras secas, enviadas ao laboratório de análises de sementes da Bayer de Uberlândia.....	93
Tabela 7 -	Cálculo das estimativas do coeficiente de correlação linear de Pearson entre as variáveis analisadas: % de germinação (WGT%), % de vigor (RET%), % de matéria seca e % de óleo.....	105
Tabela 8 -	Cálculo das estimativas de correlação canônica entre os grupos das variáveis analisadas: grupo fisiológico (% de germinação e % de vigor), grupo químico (% de matéria seca e % de óleo).....	106

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS.....	19
3 JUSTIFICATIVAS	19
4 REVISÃO DE LITERATURA	20
4.1 Desenvolvimento, Maturação e Maturidade fisiológica das sementes de milho.....	20
4.2 Constituintes de uma semente	29
4.3 Composição química das sementes de milho	30
4.4 Uso de métodos não destrutivos em análise de sementes	35
REFERÊNCIAS.....	37
CAPÍTULO 1	45
1 INTRODUÇÃO	48
2 MATERIAL E MÉTODOS	51
2.1 Condução do experimento NIR XDS.....	51
2.1.1 Fase de estudo da relação óleo com parâmetros fisiológico.....	52
2.1.2 Determinação da curva de deterioração controlada.....	54
2.1.3 Fase de validação do processo NIR XDS	56
3 Análise estatística	57
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	58
4.1 Fase de análise da relação do teor de óleo e fisiológico.....	58
4.2 Determinação da curva de deterioração controlada	61
4.3 Fase de validação do processo NIR XDS	70
Regra #1 – análise de frequência por meio da classificação de germinação e vigor	72
Regra #2 – Modelagem.....	73
5 CONCLUSÕES	80
REFERÊNCIAS.....	80
CAPÍTULO 2.....	84
1 INTRODUÇÃO	88
2 MATERIAL E MÉTODOS	89
2.1 Condução do experimento RNM	89

2.1.1 Fase de estudo para estimativas dos modelos de determinação de óleo, matéria seca e umidade nas sementes.....	90
2.1.2 Fase de análise da relação dos componentes espectrocópicos com aspectos fisiológicos das sementes.....	91
3 Análise estatística	92
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	92
4.1 Fase de geração dos modelos de óleo, matéria seca e umidade	92
4.2 Fase de análise da relação dos componentes químicos com aspectos fisiológicos	101
5 CONCLUSÕES	107
REFERÊNCIAS.....	108
CONSIDERAÇÕES FINAIS	110

1 INTRODUÇÃO

O milho é uma cultura de grande importância para o agronegócio no Brasil, o qual ocupa a terceira posição em produção mundial. Considerando apenas a safra brasileira de milho 2020/21, 106 milhões de toneladas, superando assim a safra 2019/20. A maior parte da safra deriva da segunda safra de verão (safrinha) do milho. Já a exportação atingiu o valor de 38 milhões de toneladas, superando 2019 (34 milhões de toneladas) (CONAN, 2021; BAPTISTELLA, 2020).

Sementes recém colhidas, ao atingir o ponto de maturidade fisiológica (entendido como o ponto em que a semente apresenta o máximo de germinação e vigor), se ainda úmidas, usualmente apresentam capacidade de germinação inferior à que exibiriam se fossem previamente secadas (MARCOS FILHO, 2015). De acordo com Bewley et al., (2013), é provável que, durante essa secagem se verifique o desenvolvimento de processos essenciais à germinação. Resultados de pesquisas indicam que a máxima qualidade das sementes durante o armazenamento, em temperatura ambiente, pode ser mantida somente por meio de um adequado controle do grau de umidade. O armazenamento de sementes com alto grau de umidade sempre resulta na redução da percentagem de germinação, sendo o grau de umidade ideal variável entre as espécies vegetais (FERREIRA e GENTIL 2003).

O teste de germinação de forma isolada não é eficiente para identificar a deterioração, sendo necessária a complementação com resultados da avaliação do vigor (COIMBRA et al. 2009). A germinação de sementes em teste de laboratório é a emergência e desenvolvimento das estruturas essenciais do embrião, demonstrando sua aptidão para produzir uma planta normal sob condições favoráveis de campo (BRASIL, 2009). Enquanto vigor foi 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 (BAALBAKI et al., 2009). Nesse sentido, os testes de vigor tem sido cada vez mais utilizada pela indústria de sementes visando a determinação do potencial fisiológico de sementes (ALVES e SÁ, 2009).

Portanto, testes mais sensíveis, como alguns testes de vigor, podem identificar estágios menos avançados de deterioração das sementes, o que facilita a

decisão sobre o destino ou descarte de lotes (ISTA 2012). Uma das limitações para uso desses testes está relacionada com o tempo gasto para a realização e a subjetividade na avaliação dos testes.

As sementes têm sido estudadas intensamente quanto a composição química de suas reservas. Os processos fisiológicos de germinação e vigor são influenciados pela composição química das sementes como pelo teores de proteína, lipídios, amido e açúcares, de forma que sementes com baixo vigor podem estar sujeitas a redução da velocidade de emergência, menor produção de biomassa seca e taxas de crescimento de plântulas podendo afetar o estabelecimento e o desempenho da cultura ao longo do ciclo e reduzir a produtividade (ZIMMER, 2012; GAZOLLA et al., 2012).

O conhecimento da composição química é de interesse prático em tecnologia de sementes, porque tanto o vigor quanto o potencial de armazenamento das sementes são influenciados pelos teores dos compostos presentes. Outro aspecto importante diz respeito a influência da composição química no gasto das plantas em energia para produzi-las (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000). Não só as mudanças bioquímicas, mas também as alterações estruturais e anatômicas relacionadas ao metabolismo das reservas armazenadas em sementes têm sido descritas por muitos autores em trabalhos que avaliaram essas modificações durante o processo germinativo de diferentes espécies (STONE e GIFFORD, 1997; SILVA et al., 1997; SILVA et al., 1998).

Existem vários métodos de análise para o teor de óleo, desde os químicos, que são demorados e destrutivos, até os que se utilizam de técnicas de infravermelho (NIRt), ressonância nuclear magnética (NMR), e ressonância nuclear magnética de imagem (NRI), métodos estes não-destrutivos e passíveis de fornecer a quantidade de óleo em até um grão de milho, porém com um alto custo de utilização (DYER e FENG, 1996; DYER e FENG, 1997; KING et al., 1997; KOTYK et al., 2005; NEUBERGER et al., 2008). A ressonância magnética nuclear (RMN) tem sido um método alternativo a essa medida, apresentando as seguintes vantagens: rapidez da análise (segundos), não destrói, não precisa de preparação sofisticada, o que pode prescindir o uso de produtos químicos adicionais, as análises podem ser realizadas em tecidos vegetais in vivo (COLNAGO et al., 1996) uma técnica aplicada para a determinação da estrutura de moléculas orgânicas, tanto aquelas de baixo

peso molecular, quanto de macromoléculas como proteínas. Embora seja uma técnica amplamente aplicada, os estudos dessa técnica enquanto ferramenta de análise quantitativa no Brasil são escassos, principalmente na área de sementes.

Técnicas de análise de imagens recentemente utilizadas para a avaliação de imagens de plântulas podem minimizar as limitações dos testes, como: demora para se obter os resultados, dificuldade de realização e subjetividade. No Brasil já está disponível no mercado um sistema de análise de sementes e plântulas, SAS/Groundeye, recentemente desenvolvido pela empresa TBIT – Tecnologia e Sistemas, que apresenta grande potencial de utilização na avaliação da qualidade física e fisiológica das sementes. Esta avaliação é feita por meio de análises de imagens de alta resolução que permitem extrair informações de cor, textura e geometria das sementes, além de fornecer índices de crescimento, uniformidade e vigor de plântulas por meio de imagens escaneadas do teste de germinação (PINTO, 2014).

Sendo assim, existem vários métodos de se determinar, com maior ou menor velocidade, a germinação e o vigor das sementes secas para um bom direcionamento no mercado ou para armazenamento. Durante este estudo alguns métodos de análise do potencial fisiológico das sementes foram necessários. Para o processo de produção de sementes de milho, colhidas em espiga, com umidade próxima ao ponto de maturidade fisiológica, tornam-se importantes testes rápidos de determinação da qualidade fisiológica do material recém colhido, com elevada umidade.

Logo, a presente pesquisa objetivou avaliar a qualidade fisiológica em sementes de milho úmidas por meio de equipamento infravermelho e ressonância nuclear magnética e correlacionar a técnica não destrutiva com o teor de óleo ou matéria seca, das sementes, para antecipar as determinações de qualidade fisiológica e melhor direcionar o processo dentro da UBS (Unidade de Beneficiamento de Sementes), contribuindo para minimizar as perdas.

2 OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi determinar a qualidade fisiológica das sementes de milho úmidas, por meio da relação com o teor de óleo ou matéria seca, das sementes, para antecipar o direcionamento do processo dentro da UBS (Unidade de Beneficiamento de Sementes). Os objetivos específicos são:

- 1) Analisar as sementes recém colhidas na faixa de umidade entre 25% e 35%, por um método não destrutivo (NIR – Near Infra-Red ou RMN – Ressonância Magnética Nuclear) que possa ser relacionado à qualidade fisiológica inicial diretamente por meio de correlações com análises já validadas como o teste de precocidade de emissão de raiz primária.
- 2) Estabelecer relações entre o método não destrutivo (NIR ou RMN) e o teor de óleo das sementes de milho de modo a permitir o conhecimento do teor de óleo por meio indireto e não destrutivo.
- 3) Classificar os lotes de sementes de milho de acordo com classes de qualidade fisiológica de modo a permitir o processamento simultâneo de materiais de qualidade inicial semelhantes, evitando assim perdas de lotes no final do processo.
- 4) Facilitar os rastreamentos de possíveis problemas quando ocorrerem dentro da UBS.
- 5) Trazer critérios mais restritivos para controle de qualidade de lotes potencialmente suspeitos, que por consequência pode trazer melhoria na qualidade dos produtos junto aos agricultores.

3 JUSTIFICATIVAS

O beneficiamento de sementes de milho é uma operação altamente especializada, se comparado com o das sementes de outras espécies, e visa melhorar ou aprimorar as boas características de um lote de sementes, uma vez que esse processo promove a eliminação das impurezas, das sementes de outras espécies ou cultivares, das sementes da espécie ou da cultivar, que por ventura

apresentem características indesejáveis e por fim permite a separação em frações mais uniformes (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000).

A qualidade final de um lote de sementes dependendo do cuidado em manter, durante o beneficiamento, a qualidade obtida no campo, minimizando os danos que possam ocorrer durante o processamento. Conhecer a qualidade inicial do material proveniente do campo é fundamental para direcionar o beneficiamento das sementes da melhor forma.

Vários testes foram normatizados para determinar o vigor de sementes, como o teste de tetrazólio, por exemplo, porém esta metodologia demora pelo menos 24h para informação do resultado, depende de lâminas de corte (que trazem riscos para os operadores) e as avaliações são subjetivas (dependentes dos critérios dos operadores).

Diante desses fatos, tornam-se importantes análises de qualidade fisiológica rápidas e seguras que ajudem a agilizar seu beneficiamento de enviar ao mercado somente lotes de alta qualidade e evitar o possível descarte de sementes boas.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Desenvolvimento, Maturação e Maturidade fisiológica das sementes de milho

A fase de enchimento de grão inicia-se após a fertilização. A formação do endosperma ocorre anteriormente e com maior rapidez, em relação à do embrião. O zigoto, antes de se transformar em embrião, sofre divisões celulares e um processo de diferenciação, transformando-se, a princípio, em pré-embrião, com forma e características próprias da espécie. Este continua seu crescimento e desenvolvimento até a maturação completa da semente (MERCER, 2001; SILVA, 2014).

Após a dupla fertilização, a estrutura celular formada na fusão dos três núcleos primários do endosperma sofre inúmeros ciclos de divisão, ampliando o número de núcleos livres, sem citocinese. Esse processo ocorre na região periférica da célula original (óvulo). Posteriormente, ocorre a citocinese, então, eles migram,

por meio de um grande vacúolo central, para diferentes regiões, até que o endosperma passe a ser constituído de inúmeras células mononucleares (GUIMARÃES, 1997; LOPES E LARKINS, 1993). Após a maturação, a semente está apta a desempenhar as funções fisiológicas que lhe são inerentes, recebendo poucos assimilados fotossintéticos (LIMA e NASCIMENTO, 2003; SILVA, 2014).

Um fato interessante é que, entre 10 a 20 dias após a polinização, ocorre um expressivo aumento na quantidade de DNA do endosperma, passando de 3 C até 690 C. Essa quantidade, na realidade, é variável em função do genótipo avaliado. A razão do aumento na quantidade de DNA das células do endosperma não é bem conhecida. Uma das hipóteses seria que esse processo possibilitaria o armazenamento de nucleotídeos, visando atender à demanda das plântulas em desenvolvimento. Também essa amplificação poderia ser uma estratégia em aumentar os produtos resultantes da expressão dos genes envolvidos na biossíntese de enzimas, promovendo, assim, aumento na produção de proteínas de reserva e de carboidratos, com um reflexo direto, não só no vigor das sementes, como também na produtividade de grãos por planta ou por área (LOPES E LARKINS, 1993; VIDIGAL et al., 2009).

O acompanhamento do desenvolvimento e da maturação das sementes são aspectos importantes a serem considerados na tecnologia de produção de sementes, pois entre os fatores que determinam a qualidade das sementes estão às condições de ambiente predominantes, principalmente, no período entre o florescimento e a colheita. Para facilitar a avaliação desse processo na cultura do milho, o ciclo foi segmentado em estádios fenológicos, que dividem o desenvolvimento da planta em estádios vegetativos (V) e reprodutivos (R). Os vegetativos baseados no número de folhas completamente desenvolvidas, o que é percebido quando a bainha torna-se visível e após o florescimento, os reprodutivos que se baseiam na consistência das sementes.

Tomando como referência os autores Magalhães et al. (2002), Ritchie et al. (2003) e Weismann (2008), discutir-se-á o período reprodutivo, que está entre os estádios R1 à R6, com atenção dedicada a partir do estádio R2. Neste estádio, comumente conhecido como “grão bolha d’água ou cristal”, as sementes apresentam-se brancas na aparência externa (aspecto de bolha d’água). O endosperma apresenta coloração clara, assim como o seu conteúdo, basicamente

um fluido composto por açúcares e, embora o embrião esteja ainda se desenvolvendo vagarosamente, a radícula, o coleóptilo e a primeira folha embrionária já estão formados. Portanto, no embrião em desenvolvimento já se encontra a planta de milho em miniatura. O acúmulo de amido inicia-se nesse estágio, com as sementes experimentando um período de rápida acumulação de matéria seca. A umidade de 85% nas sementes, nessa fase, começa a diminuir gradualmente até a colheita.

No estágio R3, comumente conhecido como “grão leitoso”, o grão apresenta-se com aparência amarela e no seu interior um fluido de cor leitosa, o qual representa o início da transformação dos açúcares em amido, contribuindo para o incremento de matéria seca. Tal incremento ocorre devido à translocação dos fotoassimilados presentes nas folhas e no colmo para a espiga e sementes em formação. Neste estágio, os grãos caracterizam-se pela fase de rápido acúmulo de matéria seca e têm cerca de 80% de umidade.

No estágio R4, ou comumente conhecido como “grão pastoso”, o acúmulo contínuo de amido no endosperma faz com que o fluido interno leitoso se torne mais espesso, atingindo uma consistência pastosa. A deposição de amido é bastante acentuada, caracterizando um período exclusivamente destinado ao ganho de peso por parte da semente. As sementes apresentam cerca de 70% de umidade e já acumularam cerca da metade do peso que podem atingir na maturidade. Geralmente, quatro folhas embrionárias já se formaram até esse momento e o embrião no estágio R4 aumentou significativamente em tamanho desde o estágio R3. Um pouco antes do estágio R5, as sementes ao longo do comprimento da espiga começam a ficar farinácea-duras ou a secar na parte superior. A quinta e última folha embrionária e as raízes seminais laterais já estão formadas nesta época.

No estágio R5, ou comumente conhecido como “grão farináceo”, há o aparecimento de uma concavidade na parte superior da semente, comumente designada de “dente”. É importante relatar que alguns genótipos não são caracterizados pela formação do dente e, portanto, para tais genótipos a identificação da concavidade torna-se difícil, podendo apenas ser relacionado ao aumento gradativo da dureza das sementes. Nessa etapa, as sementes encontram-se em fase de transição do estado pastoso para o farináceo. A divisão desses

estádios é feita pela chamada linha divisória do amido ou linha do leite. Essa linha aparece logo após a formação do dente e, com a maturação, vem avançando em direção à base da semente. O embrião continua desenvolvendo-se, sendo que, além do acentuado acréscimo de volume do endosperma, mediante o aumento do tamanho das células, observa-se também a completa diferenciação da radícula e das folhas embrionárias no interior das sementes. As sementes, nesse estágio, apresentam-se em torno de 55% de umidade.

No estágio R6, ou comumente conhecido como “maturidade fisiológica”, as sementes na espiga alcançam o máximo conteúdo de matéria seca, germinação e vigor, e a linha do amido já avançou até a base da semente com a formação da camada preta. A camada preta ocorre progressivamente das sementes da ponta da espiga para as da base. O ponto de maturidade fisiológica caracteriza o momento ideal para a colheita, com 30 a 38% de umidade, podendo variar entre genótipos e com as condições de ambiente. No entanto, a semente não está ainda em condições de ser colhida e armazenada com segurança, uma vez que deveria estar com 13% a 15% de umidade, para evitar problemas com a armazenagem. No caso de grãos, com a umidade variando de 18% a 25% é possível realizar a colheita, desde que o produto colhido seja submetido a uma secagem artificial antes do armazenamento.

No caso de milho para semente, a colheita é realizada em espiga, pois deste modo é possível colher as sementes muito próximo ao ponto de maturidade fisiológica, com grau de umidade oscilando entre 30% a 35%. Este procedimento tem permitido às empresas disponibilizar para os agricultores, lotes de sementes com germinação acima de 90%, superior a padrão mínimo requerido pela legislação, por meio de instruções normativas do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Outro aspecto positivo refere-se à manutenção da qualidade das sementes redondas de milho, as quais normalmente situam-se nas extremidades da espiga e podem ser afetadas pelas condições de ambiente, quando permanecem por mais tempo no campo (MENEGHELLO, 2014; PESKE, 2014).

Após o entendimento do processo de desenvolvimento da semente, é importante conceituar maturação e maturidade fisiológica das sementes. A maturação refere-se ao processo de alterações morfológicas, físicas, fisiológicas e bioquímicas que ocorrem a partir da fecundação do óvulo e prosseguem até o momento em que as sementes se desligam fisiologicamente da planta. Maturidade

fisiológica é o momento que as sementes atingem a máxima qualidade e são capazes de desempenhar com eficiência plena todas as funções que lhe são inerentes.

O entendimento do processo de maturação é relevante para determinação do momento ideal de colheita das sementes, a fim de correlacionar positivamente produtividade e qualidade. Quando se dá a maturidade fisiológica, as sementes estão fisiologicamente desligadas da planta mãe e, portanto, expostas a eventos que representam potencial ameaça à sua qualidade, tais como, ataques de pragas, microrganismo e condições ambientais adversas como precipitação e elevadas temperaturas (HARRINGTON, 1972).

Os estudos de maturação de sementes são feitos com base nas modificações que ocorrem em características físicas e fisiológicas, como tamanho, teor de água, conteúdo de matéria seca, germinação e vigor, desde a formação zigoto até o momento em que a semente se desliga fisiologicamente da planta mãe. Observa-se que em geral, as sementes crescem em tamanho rapidamente, como resultado da multiplicação e desenvolvimento das células, as quais formam o embrião e o tecido de reserva. Inicialmente, a semente apresenta elevado grau de umidade, variando entre 70% a 80%, uma vez que o meio líquido é fundamental para que haja a transferência de matéria seca da planta mãe à semente. O grau de umidade decresce lentamente, perdurando em altos níveis, praticamente todo o processo de maturação. Após atingir o ponto de máximo acúmulo de matéria seca, o processo de desidratação da semente é desencadeado, o que ocorre de forma rápida, pois, a partir deste momento, as sementes são desconectadas do sistema vascular da planta mãe. O conteúdo de matéria seca da semente tem sido apontado como a característica que melhor apresenta correlação com a maturação das sementes. O máximo peso de matéria seca tem sido mencionado como a característica mais segura para indicar o ponto em que a semente atinge a maturidade fisiológica, coincidindo com o potencial máximo da germinação (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000; MARCOS FILHO, 2015).

Estudos sobre a maturação fisiológica tem se intensificado para diferentes culturas, como para melão que constaram que a qualidade fisiológica de sementes de melão cv. Hales Best Jumbo é influenciada pela época de maturação dos frutos. (DONATO et al., 2015; CASSIANO et al., 2021). Nakada et al. (2011) trabalhando

com pepino (*Cucumis sativus* L.) em diferentes épocas de colheita (30, 35, 40, 45, 50 e 55 DAA), observou que as sementes oriundas de frutos colhidos aos 30 e 35 DAA tiveram baixa germinação e a partir dos 40 DAA a germinação atingiu 99% e 100%, respectivamente.

O vigor é caracterizado como sendo a soma de atributos que confere à semente o potencial para germinar, emergir e resultar rapidamente em plântulas normais, sob ampla diversidade de condições ambientais. Contudo, a capacidade de germinação durante a maturação não está necessariamente associada à formação de plântulas vigorosas. Portanto, a coincidência do máximo acúmulo de massa seca e o máximo vigor das sementes não pode ser adotada como regra geral (DELOUCHE, 1971; DIAS, 2001; MARCOS FILHO, 2015).

Muitos métodos permitem identificar o equilíbrio entre a maturidade fisiológica da semente e o ponto ideal de colheita. Entretanto é comumente utilizado o método que consiste na medição do grau de umidade, sendo mais seguro os métodos diretos que requerem tempo para que haja a desidratação das sementes. Portanto, visando facilitar as tomadas de decisões foram desenvolvidos os métodos indiretos, fazendo uso de equipamentos eletrônicos específicos, como por exemplo, os equipamentos baseados em espectroscopia na região do infravermelho próximo “Near infra-red reflectance” (NIR).

Segundo os autores Daynard e Duncun, (1969), o equilíbrio entre a maturidade fisiológica da semente de milho e o ponto ideal de colheita, também pode ser verificado por meio de indicadores visuais como a formação da camada preta, conhecida como “Black Layer”. A camada preta forma-se na região compreendida entre o endosperma basal e a área vascular do pedicelo das sementes, quando decorrido o processo de maturação, conforme ilustra a Figura 1. Por outro lado, é importante destacar que o processo de formação da “Black Layer” nas sementes de milho pode ser influenciado por condições ambientais adversas, tais como, baixa temperatura, deficiência hídrica e auto sombreamento, induzindo a precocidade na formação da referida camada (TOLLENAARD e DAYNARD, 1978; AFUAKWA et al., 1984). Outro ponto enfatizado em estudos é que devido às condições ambientais que circundam o processo de formação da camada preta, a determinação da maturidade fisiológica pode tornar-se comprometida, uma vez que durante tal processo a umidade dos grãos pode oscilar entre 17% e 75% de

umidade (DAYNARD e DUNCUN, 1969; RENCH E SHAW, 1971; CARTER E PONELEIT, 1973; AFUAKWA et al., 1984). Portanto, é possível inferir que a determinação da “Black Layer” em condições de campo torna-se complexa.

A determinação do ponto ideal de colheita também pode ser avaliada por meio da linha de leite da semente de milho, comumente denominada de “Milk Line”. A linha do leite é conhecida como a camada externamente visível presente na face oposta ao embrião, a qual limita as camadas sólidas e líquidas do endosperma e se desloca da região da coroa para a região da base da semente durante o processo de maturação.

A utilização da linha do leite, foi avaliada por Fahl et al., (1994) como meio visual e prático de monitorar a maturação da semente de milho para determinar o melhor momento de aplicação de dessecantes, visando antecipar a colheita sem ocasionar decréscimos na produtividade. No estudo, os autores dividiram o processo de maturação das sementes em cinco estádios, sendo que os estádios 1 e 5 representaram as fases inicial e final da maturação, respectivamente, e os demais representaram as fases intermediárias do processo (Figura 1).

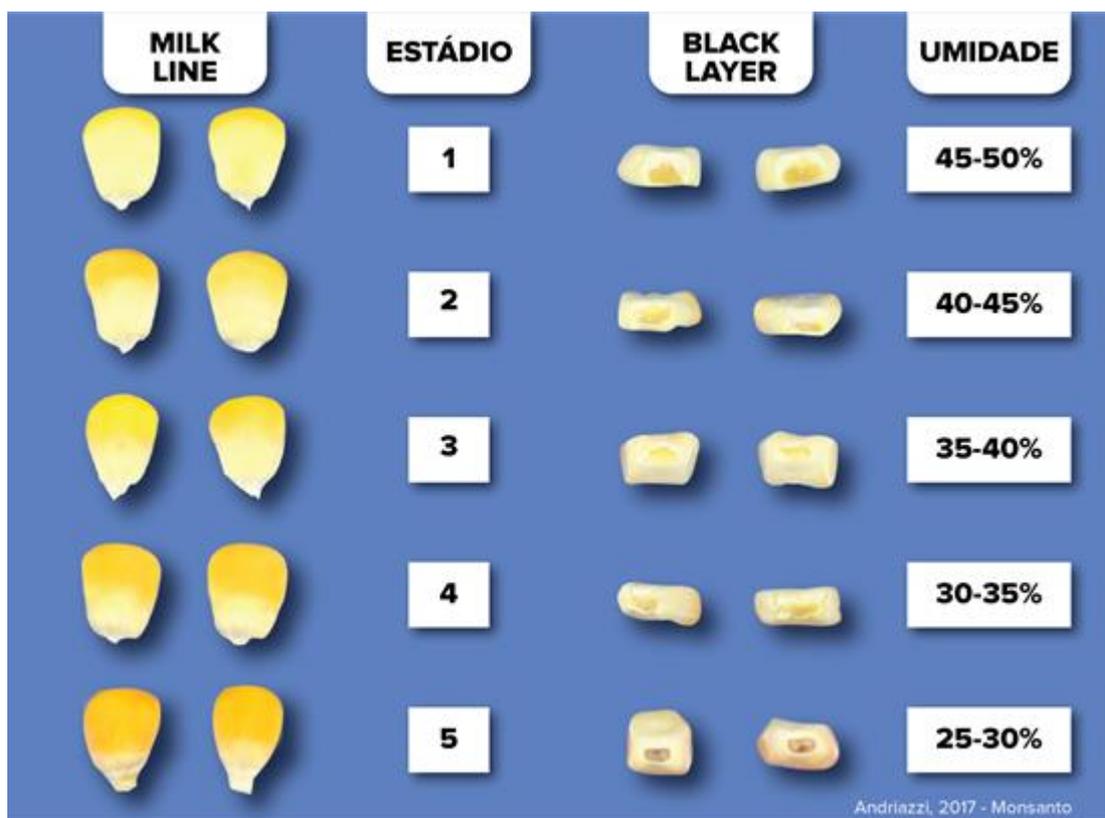


Figura 1. Fases da maturação de grãos de milho, caracterizadas pela linha de leite (“milk line”) e pelo escurecimento da placenta da semente (“black layer”), assim como as respectivas porcentagens de umidade. Adaptada de Fahl et al., 1994.

Fonte: O autor.

O aparecimento da linha do leite, na região da coroa, face oposta ao embrião, ocorreu quando as sementes apresentaram entre 45 e 50% de umidade, caracterizando o estágio 1. Neste estágio, as plantas estavam verdes, com espigas iniciando as perdas dos cabelos, com sementes perdendo o brilho e iniciando o denteamento. O estágio 5 foi caracterizado pelo escurecimento da placenta do grão, quando o grau de umidade estava entre 25 e 30%, e a linha do leite se aproximou da base do grão perdendo a seguir sua visualização externa e, aparentemente, não sendo detectável no endosperma do grão. Nos estádios 3 e 4, as sementes apresentaram umidade próxima à 35% e, após este período não houve significativo acúmulo na massa seca de grãos.

Em outro estudo, com genótipos distintos, Afuakwa e Crookston (1984) verificaram que independente da condição ambiental reinante a linha de leite se encontrava na metade da semente, quando a umidade se mantinha próxima a 40%, e a semente havia acumulado 90% de sua massa seca. Este ponto pode ser considerado estando entre os estádios 2 e 3, definidos por Fahl et al. (1994).

As informações compiladas evidenciam que através do posicionamento da linha do leite ("milk line") – quando a linha do leite atinge a metade do grão, com teor de água próximo de 35% – tem sido possível estimar a umidade do grão no campo possibilitando o acompanhamento do processo de maturação, uma vez que não tem sido relatado acúmulo significativo de massa seca no grão após esse período. Outro dado relevante refere-se ao fato de que os estudos mostram que o desenvolvimento da camada preta ("black layer") na região da placenta do grão ocorre quando a linha do leite atinge a base do grão, com teor de umidade inferior a 30%. Portanto, os parâmetros mencionados – grau de umidade, aspecto das plantas e aparecimento da camada preta na região do pedicelo das sementes – podem ser utilizados para indicar a época de colheita de sementes de milho, consistindo em ferramenta prática, facilmente visível e de fácil adoção em condições de campo.

Concluído o processo de maturação das sementes, a ocorrência de condições ambientais adversas, como temperaturas extremas, alta umidade relativa do ar, ataques de insetos e doenças, normalmente favorecem o processo de deterioração, provocando decréscimo da germinação e do vigor. Assim sendo, as sementes devem ser colhidas o mais próximo possível da maturidade fisiológica, evitando a permanência desnecessária no campo, que frequentemente compromete a qualidade das mesmas.

A qualidade da semente pode ser afetada por extremos de temperatura durante a maturação, flutuações das condições de umidade ambiente, incluindo secas, deficiências na nutrição das plantas, ocorrência de insetos, além da adoção de técnicas inadequadas de colheita, secagem e armazenamento (FRANÇA NETO et al., 1994), bem como de beneficiamento. Pesquisas que visam avaliar os efeitos dos estresses hídrico e salino na germinação e no vigor de sementes de milho em condições controladas são comuns (HOQUE et al., 2014; DINIZ et al., 2018).

A semente de milho normalmente é colhida, despalhada e secada na espiga, para logo ser debulhada, limpa e classificada. A classificação é necessária devido à variação no tamanho e na forma das sementes na própria espiga. Ainda a separação por densidade pode ser recomendada para melhorar a qualidade fisiológica (germinação e vigor) do lote de sementes (MENEZES et al., 2002).

4.2 Constituintes de uma semente

A semente de milho é um fruto denominado cariopse. A extremidade do grão, chamada de pedúnculo, é parte remanescente do tecido que conecta a semente ao sabugo, o que permite uma rápida absorção de umidade (FELKER e SHANNON, 1980).

No interior da semente estão os produtos da fertilização, isto é, o embrião e o endosperma. No caso do endosperma, estrutura encontrada na semente que resulta da fusão dos núcleos polares com um dos núcleos reprodutivos do grão de pólen, é composto basicamente de amido e hemiceluloses (carboidratos do tipo polissacarídeos) (CARVALHO e NAKAGAWA, 2012). Juntamente com a formação do embrião e do endosperma, se dá o crescimento das paredes do ovário que revestirão a semente (pericarpo), e este corresponde a cerca de 5% do peso final da semente.

A camada de aleurona é considerada parte integrante do endosperma. Em cereais, ela é composta por uma ou mais camadas de células que circundam o endosperma amídico (tecido que representa mais de 80% do peso total da semente), exceto na área adjacente ao embrião. A aleurona tem a maior concentração de proteínas solúveis do que o restante do endosperma (JAYARAM e PETERSON, 1992).

Para Reece et al., (2015), tanto as plantas como os animais armazenam açúcares para o seu uso posterior na forma de polissacarídeos. No caso das plantas, o amido é armazenado como grânulos no interior de estruturas celulares denominadas de plastídeos, incluindo os cloroplastos. Assim, segundo os autores, a síntese de amido permite as plantas armazenarem uma fonte extra de glicose. Já a celulose, outro polissacarídeo encontrado nas plantas, se dispõem como microfibrilas constituindo o principal componente que circunda a resistente parede celular dos vegetais (REECE et al., 2015).

O núcleo do endosperma também passa por divisões, acompanhadas ou não pela formação de paredes celulares, formando uma massa celular que pode preencher todo o espaço não ocupado pelo embrião. A diferenciação desse tecido inclui a deposição de reservas provenientes da transferência de matéria seca da planta-mãe para a semente em desenvolvimento. Dessa maneira, forma-se o

endosperma ou albúmen (COPELAND e MCDONALD, 1995). O tecido do endosperma é triplóide ($3n$), com duas partes maternas e uma paterna, tendo a função de fornecer proteção e suporte nutritivo para o desenvolvimento do embrião ou para a germinação, de modo que sua composição é compatível com as necessidades embrionárias (MARCOS FILHO, 2005).

O embrião corresponde, em média, a 10% do peso total do grão e, como mencionado, é proveniente do crescimento e diferenciação do zigoto. No embrião, encontram-se as estruturas que originarão uma nova planta, as quais serão ativadas no momento em que a semente for colocada sob condições favoráveis à sua germinação, para, em seguida, emergir à superfície do solo. O embrião das monocotiledôneas é constituído, essencialmente, por um eixo embrionário e pelo cotilédone. O eixo embrionário contém as seguintes estruturas: na extremidade superior, encontra-se a plúmula ou o epicótilo, que originarão as primeiras folhas, estando a plúmula envolta por uma bainha protetora chamada de coleóptilo; na extremidade inferior, encontra-se a radícula, da qual serão originadas as raízes, e que é esta envolta por uma bainha chamada de coleorriza (MERCER, 2001).

4.3 Composição química das sementes de milho

O advento do milho híbrido no início do Século XX e da produção de sementes para maior nível tecnológico desenvolvidas por empresas públicas e privadas focadas no setor sementeiro, fez com que a produtividade do milho venha aumentando significativamente. O melhoramento acentuado para a produtividade e características agronômicas desejáveis, fez com que o milho perdesse, relativamente, nutrientes, principalmente proteína e óleo (ALEXANDER, 1963). Os avanços tecnológicos visam principalmente o aumento do potencial produtivo do material a ser lançado (PEREIRA FILHO e BORGHI, 2016).

A alta concentração de nutrientes nos grãos tem sido a meta de vários programas de melhoramento de muitos cereais, inclusive o milho, com foco na alimentação humana e animal. O milho tem sido submetido ao mais alto grau de melhoramento genético dentre as espécies cultivadas devido à sua variação herdável ser grande, não somente para produtividade e outros atributos agronômicos, mas também para propriedades nutricionais e industriais,

proporcionando a este cereal uma ampla gama de utilização em indústrias de alimentos para humanos e animais (PATERNIANI, 1990).

Existe uma grande relação entre a química e as sementes, podendo-se verificar por meio dos principais componentes presentes no tecido reserva das sementes (endosperma), os quais são: carboidratos, lipídeos e proteínas (CORRÊA e SILVA, 2008)

A composição química da semente de milho varia de acordo com a cultivar e com as condições ambientais. Os dados da composição média dos componentes que formam a semente estão apresentados na Tabela 1. A predominância é de amido, representando mais de 70% do total dos componentes químicos, concentrando-se, principalmente, no endosperma, enquanto a proteína é o segundo constituinte, com mais de 10%, estando a maior parte concentrada no embrião. Os lipídeos representam menos de 5% do peso total e os açúcares, cerca de 2% (COELHO, 1997).

Tabela 1. Distribuição porcentual dos constituintes químicos da semente de milho. Média de valores obtidos de 11 variedades de milho (EARLE et al., 1946, citados em CARVALHO e NAKAGAWA, 2000).

Componentes da semente	Cinza	Proteína[*]	Óleo	Açúcar	Amido	Inteira
Endosperma	0,31	9,4	0,8	0,64	86,4	81,9
Embrião	10,10	18,8	34,5	10,80	8,2	11,9
Tegumento	0,84	3,7	1,0	0,34	7,3	5,3
Cobertura da ponta	1,56	9,3	3,8	1,54	5,3	0,8
Semente Inteira	1,44	10,3	4,8	1,97	71,5	99,9

(*) Proteína = N x 6,25

Segundo Gonçalves (2021), em seu trabalho com sementes de milho, conclui que a molécula da amilose não possui ramificações e, no espaço, assume conformação helicoidal (forma de hélice). A amilopectina apresenta ramificações, sendo que os “ramos” aparecem a cada 24 a 30 moléculas de glicose.

Os melhoristas de plantas podem manipular a composição química de sementes de muitas espécies cultivadas, melhorando suas qualidades como

alimento, fibras e matéria prima. Variedades modernas de soja, milho, sorgo, e trigo tem sido melhoradas e desenvolvidas para alto teor de óleos, proteínas ou carboidratos, com avanços significativos para as variedades. Estas modificações geralmente afetam o comportamento das sementes, mudando o padrão básico da espécie com relação a aspectos tais como: germinação, vigor, armazenabilidade e interação com patógenos, sendo necessário portanto que os trabalhos de melhoramento considerem estes aspectos, quando do lançamento de novas cultivares (OLIVEIRA, 2015).

De importância fundamental para o acúmulo de reservas é o fornecimento de nitrogênio e carbono absorvidos pelas raízes, e sua remobilização de quase todos os órgãos vegetativos durante o enchimento de grãos (SALON et al., 2001; SCHILTZ et al., 2005; MUNIER-JOLAIN et al., 2008).

Plantas de milho desenvolvidos sobre alta fertilização de nitrogênio ou baixa população produzem sementes com um conteúdo de proteínas mais alto que aquelas produzidas com baixo nitrogênio disponível ou altas populações (WOLFSON e SHEARER 1981).

Um híbrido de milho com teores altos de óleo e com menor proporção de carboidrato possuirá mais energia, devido ao óleo possuir 2,5 vezes mais energia do que o carboidrato. Portanto, um híbrido com alto teor de óleo é muito vantajoso, sob o ponto de vista nutricional principalmente pela alta densidade de lipídeos e do balanço dos aminoácidos, para ser utilizado como componente nas rações de monogástricos, principalmente de aves e suínos (ALEXANDER et al., 1977; ALEXANDER, 1988).

Dados dos ensaios de produtividade, de híbridos nos Estados Unidos da América mostram que em 80 anos de melhoramento, a produção de grãos aumentou em 74 kg/ha/ano e a porcentagem de proteína diminuiu em 30g/kg/ano (DUVICK e CASSMAN, 1999).

O óleo de milho, que está predominantemente no embrião, contém 1,5% de fosfolipídios, 1% de esteróis e pequenas quantidades de ceras, tocoferol e carotenoides nos milhos amarelos e portanto tem uma grande aceitação na alimentação humana, devido a sua grande estabilidade durante a estocagem e cozimento, evitando a necessidade de se adicionar antioxidantes sintéticos. Esta estabilidade é proporcionada pelos tocoferóis, que são antioxidantes naturais, que

protegem as duplas ligações de ácidos graxos insaturados de sofrerem oxidação (ALEXANDER, 1988). O óleo de milho possui baixo teor do ácido tri-insaturado linolênico (18:3), diminuindo a rancificação, e alto teor de ácidos graxos poliinsaturados, principalmente o Linolêico, (ácido cis, cis-9, 12-octadecadieonic) que chega a 60% do total. A vantagem do óleo de milho sobre o de soja é que o de milho contém um menor percentual do ácido oléico, o qual é altamente sujeito à oxidação.

A biossíntese dos ácidos graxos ocorre principalmente nos plastídeos (OHLROGGE e BROUWSE, 1995). Estes ácidos graxos são utilizados como precursores na construção e organização de membranas celulares e também para a síntese de lipídeos de reserva. O lipídio é a principal forma de reserva de carbono nas sementes de muitas espécies de plantas, constituindo aproximadamente 60% do peso seco delas. A via de biossíntese de ácidos graxos é considerada uma via metabólica primária, pois é realizada por todas as células da planta, sendo essencial para o seu crescimento.

Os principais ácidos graxos sintetizados pelas plantas apresentam uma cadeia de 16 a 18 carbonos, contendo de uma a três duplas ligações cis. No plastídeo, uma série de enzimas estão envolvidas no processo de biossíntese destes ácidos graxos.

Quando os três carbonos do glicerol são esterificados com as cadeias de ácido graxos, ocorre a formação de triacilgliceróis, sendo este o principal lipídeo de estocagem nas sementes (OHLROGGE e BROUWSE, 1995).

O embrião é o sítio primário da estocagem de óleo (INGLETT, 1970; DOEHLERT, 1990) e este fato é verificado pela morfologia do embrião do milho alto óleo, que é maior do que o existente no milho normal (CURTIS et al., 1968; DUDLEY et al., 1977). Estudos comparando propriedades metabólicas de semente de milho, com genótipos amplamente divergentes para proteína, amido e óleo, mostraram que diferentes atividades de enzimas estão associadas com acúmulo dos diferentes produtos de estocagem. A atividade da enzima malato desidrogenase (MDH) em embriões isolados, foi correlacionada com a concentração de óleo, talvez devido a maior atividade respiratória requerida para a síntese de óleo. As enzimas sacarose sintetase (SS), uridina difosfato-glicose pirofosforilase (UDPG), fosfoglicoisomerase (PGI), fosfofrutoquinase (PFK) e aldolase (ALDO) também foram correlacionadas

com o conteúdo de óleo. A medida da atividade enzimática indicou que não há uniformidade na distribuição destas dentro da semente, mas que pode haver uma associação da atividade de enzimas específicas com produtos de estocagem (DOEHLERT et al.1988).

Quinze enzimas que fazem parte do metabolismo de açúcar e aminoácidos foram avaliadas e os resultados sugerem que a atividade das enzimas glicoquinase, frutoquinase e fosfofrutoquinase foi primariamente associada com o conteúdo de óleo e que a biossíntese de óleo utiliza a degradação de sacarose medida pela invertase, em uma via que não requer fosfato (DOEHLERT, 1990).

O trabalho mais longo e clássico do melhoramento de milho vem sendo realizado pela Universidade de Illinois. Iniciado em 1896 por C.G. Hopkins e tendo como objetivo a seleção na variedade de polinização aberta Burr's White para alto e baixo teor de óleo e de proteína nas sementes. Após 90 ciclos de seleção, o teor de óleo nas sementes aumentou de 4,7% para 19,3% na variedade chamada de Illinois High Oil (IHO). A seleção para baixo óleo foi realizada somente até a 87 a. geração, pois não houve progresso nos últimos 20 ciclos anteriores, possivelmente devido às limitações fisiológicas advindas do baixo teor de óleo e consequente baixa energia utilizável nas sementes, afetando o vigor e a germinação. Após 87 ciclos de seleção para baixo óleo, na população Burr's White, houve uma redução de óleo de 4,7% para menos de 1,0%. Esta população foi denominada de Illinois Low Oil (ILO) (DUDLEY et al.,1977).

Fatores ambientais podem afetar os teores de óleo no milho, mas o efeito do genótipo no valor do conteúdo de óleo é muito maior. Jellum e Marion (1966), em avaliações para o teor de óleo durante dois anos em diferentes localidades e diferentes períodos nestes anos, mostraram que o genótipo tem maior influência nos valores de óleo do que as condições ambientais, justificando a alta herdabilidade estimada para este caráter.

A qualidade do óleo, ou seja, a composição dos ácidos graxos no óleo de milho, importante característica a ser considerada, também é passível de ser alterada geneticamente. Foi verificada a existência de uma correlação negativa entre o percentual de óleo total e o percentual de ácido linoleico ($r = -0,48$) e uma correlação positiva de ácido oleico com o percentual de óleo ($r = 0,51$) (PONELEIT e BAUMAN, 1970; PAMIN et al., 1986). Foi verificado que devido a correlação

negativa entre percentagem de óleo e ácido linoleico, quando se aumenta o teor de óleo também aumenta-se a percentagem dos ácidos graxos oleico e palmítico (PAMIN et al., 1986).

Balesevic-Tubic et al., (2011), relataram os efeitos do envelhecimento acelerado e natural nas sementes de soja e observaram uma diminuição nas atividades de peroxidação lipídica e superóxido dismutase e per-oxidase que afetam negativamente a viabilidade e o vigor das sementes.

4.4 Uso de métodos não destrutivos em análise de sementes

Os primeiros estudos voltados para a aplicação de imagens digitais no ramo de sementes iniciou com o uso de *softwares* genéricos de processamento de imagens digitais com o objetivo de avaliação da qualidade de sementes de diversas espécies. Dentre essas tecnologias, destaca-se a espectroscopia no infravermelho próximo (NIR), a qual se baseia na absorção de eletromagnéticas radiação em comprimentos de onda na faixa de 780–2500 nm (HUANG et al., 2008; NICOLAÏ et al., 2007).

O NIR baseia-se no fato dos principais componentes químicos de uma amostra terem propriedades particulares de absorção na região do espectro de luz (REICH, 2005). As ligações das substâncias orgânicas absorvem parte da energia incidente, permitindo assim, estimar o tipo de ligação molecular contida nas amostras, que medem a diferença entre quantidade de luz emitida e a refletida (FERNANDES et al., 2010).

O NIR está sendo aplicado em várias áreas como análise de sementes, identificação da qualidade da semente e melhoramento da qualidade dos produtos agrícolas (SHANG et al., 2017): a espectroscopia no infravermelho próximo foi usada para rapidamente avaliar o vigor da semente detectando a quantidade relativa de proteína nas sementes (WEN et al., 2018); NIRS foi usado para prever a taxa de germinação de sementes de trigo (WU et al., 2017).

O tratamento matemático dos dados possibilita correlacionar valores de uma variável qualquer, obtidos pelos métodos químicos convencionais, com aqueles obtidos por meio do NIR. De acordo com Valderrama (2005), os procedimentos

matemáticos que estabelecem a relação entre os dados recebem a denominação de calibração de modelos. As principais técnicas quimiométricas usadas para a elaboração de modelos de calibração são a análise de componentes principais (PCA - Principal Component Analysis), regressão linear múltipla (MLR – Multiple Linear Regression), regressão de componentes principais (PCR – Principal Components Regression) e regressão por mínimos quadrados parciais (PLS – Partial Least Squares) (BURNS e CIURCZAK,2007).

A espectroscopia NIR tem sido empregada na avaliação da qualidade de frutas, hortaliças, plantações e suas sementes (PASQUINI, 2018). Nos últimos anos, tem sido amplamente explorado para detectar a viabilidade da semente (AMBROSE et al. 2016) e a reflexão difusa é a modo mais comumente usado. A viabilidade de sementes de soja foi determinada usando espectroscopia de infravermelho próximo com transformada de Fourier (FT-NIR) (KUSUMANINGRUM et al., 2018). Jiang et al., (2007) sugerem que o NIR seja usado em programas de melhoramento genético em milho, como uma ferramenta precisa e não destrutiva

A espectroscopia FT-NIR com um método de classificação PLS-DA também pode classificar corretamente as sementes de milho viáveis e não viáveis com uma alta precisão de 100% (AMBROSE et al., 2016), e sementes de pimenta com precisão de 90,5% para o conjunto de validação (SEO et al., 2016). Uma classificação supervisionada com método chamado análise de variáveis canônicas estendidas (ECVA) foi explorado para prever a viabilidade de sementes por espectroscopia NIR. O efeito do número de sementes em uma amostra de treinamento definida na capacidade de prever a viabilidade de sementes de repolho ou rabanete foi discutido (SHETTY et al., 2011). Os resultados mostraram que 200 sementes foram ótimas em um conjunto de calibração para dados de repolho e rabanete. Esta conclusão foi semelhante à classificação taxa obtida usando todas as sementes no conjunto de calibração e de forma eficaz melhorou o custo-benefício da análise espectral NIR.

Por tanto, o uso do NIR é uma tecnologia promissora para avaliação da qualidade de sementes, logo a avaliação, e de forma rápida, se possa tomar decisões relacionadas aos lotes de sementes.

REFERÊNCIAS

- AFUAKWA, J. J.; CROOKSTON, R. K. Using the kernel milk line to visually monitor grain maturity in maize. **Crop Science**, Madison, v. 24, p. 687-691, 1984.
- ALEXANDER, D. E. **Breeding special nutritional and industrial types**. Urbana: University of Illinois, 1988.
- ALEXANDER, D. E. Corn as an oil crop. *In*: ANNUAL HYBRID CORN INDUSTRY RESEARCH CONFERENCE, 17., Washington. **Proceedings...** Washington: American Seed Trade Association, 1963.
- AMBROSE, A. *et al.* Comparative nondestructive measurement of corn seed viability using Fourier transform near-infrared (FT-NIR) and Raman spectroscopy. **Sens. Actuator B-Chem**, v. 224, p. 500–506, 2016.
- ARAUJO, T. P.; MELLO, F.M. Processamento digital de Imagens digitais – razão entre bandas. **Geociências**, v. 29, n. 1, p. 121-131, 2010.
- BALESEVIC-TUBIC, S. *et al.* Changes in soybean seeds as affected by accelerated and natural aging. **Romanian Biotechnol. Lett.**, n. 16, p. 6740–6747, 2011.
- BAALBAKI, R. Z. *et al.* **ESeed vigor testing handbook**. Ithaca: Association of Official Seed Analysts, 2009. 341 p.
- BAPTISTELLA, J. L. C. Lavoura 10. **Expectativa do mercado do milho 2020**, jan/20. Disponível em: <https://blog.aegro.com.br/mercado-do-milho-2020/>. Acesso em: 14 ago. 2020.
- BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. New York: Plenum Press, 1985. 367p.
- BHERING, M.C. *et al.* Avaliação do vigor de sementes de melancia (*Citrullus lunatus* Schrad.) pelo teste de envelhecimento acelerado. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 25, n. 2, p. 1-6., 2003.
- BONAT, H. W. **Regressão Local (LOESS)**. 2007. Disponível em: <http://ns.leg.ufpr.br/lib/exe/fetch.php/projetos:saudavel:loess.pdf>. Acesso em: 05 dez. 2019.
- BORGES, J.W.M.; MORAES, E.A.; VIEIRA, M.G.G.C. Efeitos do beneficiamento sobre a viabilidade da semente de feijão armazenada. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 13, n. 2, p. 135-138, 1991.
- BRADFORD, K. J. Manipulation of seed water relations via osmotic priming to improve germination under stress conditions. **HortScience**, Alexandria, v. 21, n. 5, 1986.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Mapa/ACS, 2009. 399 p.

BURNS, D. A.; CIURCZAK, Emil W. (ed.). **Handbook of near-infrared analysis**. CRC press, 2007.

CARTER, M. W.; PONELEIT, C. G. Black layer maturity and filling period among inbred lines of corn (*Zea mays* L.). **Crop Science**, Madison, v. 13, n. 4, p.436-476, 1973.

CARVALHO, L.F. *et al.* Condicionamento osmótico em sementes de sorgo. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 22, n. 1, p. 185-192, 2000.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 5. ed. FUNEP, 2012. p. 590.

CASSIANO, C. V. *et al.* Determinação de alterações morfológicas durante a maturação de sementes de melão com uso de raios X. **Embrapa Hortaliças (ALICE)**, 2021.

COELHO, C. M. **Caracterização das proteínas do endosperma do milho visando à alteração das frações que controlam qualidade nutricional**. 1997. 98f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG, 1997.

COIMBRA, R. A. *et al.* Testes de vigor utilizados na avaliação da qualidade fisiológica de lotes de sementes de milho-doce. **Ciência Rural**, n. 39, p. 2402-2408, 2009.

CONAB. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos – safra 2020/2021**. Décimo levantamento. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos>.

COLNAGO, L. A. *et al.* **Aplicações da ressonância magnética nuclear (RMN) e ressonância paramagnética eletrônica (EPR)**. In: CRESTANA, S. *et al.* Instrumentação agropecuária: contribuições no limiar do novo século. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1996. Cap.1, p.15-50.

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

CORRÊA, P. C.; SILVA, J. S. **Estrutura, composição e propriedades dos grãos**. In: SILVA, JUAREZ DE SOUZA E. (Org.). Secagem e armazenagem de produtos agrícolas. 2. ed. Viçosa, MG: Aprenda Fácil, 2008.

CURTIS, P. E.; LENG, E. R.; HAGEMAN, R. H. Developmental changes in oil and fatty acid content of maize strains varying in oil content. **Crop Science**, Madison, v. 8, p. 689-693, 1968.

DAYNARD, T. B.; DUNCAN, W. G. The black layer and grain maturity in corn. **Crop Science**, Madison, v. 9, p. 473-476, 1969.

DELOUCHE, J. C. Seed maturation. *In: Handbook of seed technology*. State College: Mississippi: Mississippi State University, 1971. p.17-21.

DIAS, C.D.F. Maturidade de sementes. **Revista SeedNews**, ano V, n.6, v.6, 2001. Disponível em: http://www.seednews.inf.br/html/site/content/edicoes_anteriores/index.php#. Acesso em: 25 de jul. 2017.

DINIZ, R. P. *et al.* Qualidade fisiológica e expressão de alfa-amilase em sementes de milho produzidas em condições de estresse salino e hídrico. **Brazilian Journal of Maize and Sorghum**, n. 17, v. 1, p. 37-48, 2018.

DOEHLERT, D. C. Distribution on enzyme activities within the developing maize (*Zea mays*, L.) kernel in relation to starch, oil, and protein accumulation. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 78, p. 560-567, 1990.

DOEHLERT, D. C.; KUO, T. M.; FELKER, F. C. Enzymes of sucrose and hexose metabolism in developing kernels of two inbreds of maize. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 86, p. 1013-1019, 1988.

DONATO, L. M. S. *et al.* Qualidade fisiológica de sementes de melão em função do estágio de maturação dos frutos. **Comunicata Scientiae**, v. 6, n. 1, p. 49-56, 2015.

DUDLEY, J. W.; LAMBERT, R. J.; DE LA ROCHE, I. A. Genetic analysis of crosses among corn strains divergently selected for percent oil and protein. **Crop Science**, Madison, v. 17, p. 111-117, 1977.

DUVICK, D. N.; CASSMAN, K. G. Post-green revolution trends in yield potential of temperate maize in the North-Central United States. **Crop Science**, Madison, v. 39, p. 1622-1630, 1999.

FAHL, J. I. *et al.* Avaliação da maturação de grãos de milho através da linha do leite para aplicação de dessecantes químicos. **Bragantia**, v. 53, n. 2, p. 209-218, 1994.

FELKER, C. F.; SHANNON, J. C. Movement of ¹⁴C-labeled assimilates into kernels of *Zea mays* L. **Plant Physiology**, Rockville, v. 65, n. 5, p. 864-870, sept. 1980.

FERREIRA, S. A. D. N.; GENTIL, D. F. D. O. Armazenamento de sementes de camu-camu (*Myrciaria dubia*) com diferentes graus de umidade e temperaturas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25, p. 440-442, 2003.

FERNANDES, F. A. *et al.* Uso de espectrometria de refletância no infravermelho próximo (NIRS) na análise de carbono de Neossolos do Pantanal. **Embrapa Pantanal Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2010.

FERREIRA, R. L. **Etapas do beneficiamento na qualidade física e fisiológica de sementes de milho**. 2010. 49f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Ilha Solteira, SP, 2010.

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

GAZOLLA-NETO, A. *et al.* A. Níveis de umidade do solo de várzea e seus efeitos sobre a emergência e crescimento inicial de plântulas de soja. **Informativo ABRATES**, v. 22, n. 2, p. 28-31, 2012.

GOBEL, C. *et al.* Teste de viabilidade e germinação de sementes de milho e feijão: uma proposta de atividade experimental de Botânica para o Ensino Médio. **Research, Society and Development**, n. 10, v. 4, 2021.

GUIMARAES, R. M. **Tolerância à dessecação e condicionamento fisiológico em sementes de cafeeiro (Coffea arabica L.)**. 2000. 180f. Tese (Doutorado) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.

GUIMARÃES, V. D. **Fatores que controlam a dureza do endosperma do grão de milho**. 1997. 67 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1997.

GUTKOSKI, L. C. *et al.* Avaliação da composição química de milho seco e armazenado em silo tipo alambrado com ar natural forçado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 4, p. 879-885, out./dez. 2009.

HARRINGTON, J. F. Seed storage and longevity. *In*: KOZLOWSKI, T. T. **Seed biology**. New York Academic Press, 1972. v. 3, p.145-245.

HOQUE, M. M. I.; JUN, Z.; GUOYING, W. Impact of salinity stress on seed germination indices of maize (*Zea mays* L.) genotypes. **Kragujevac Journal Science**, v. 36, p. 155-166, 2014.

HUANG, M.; WANG, Q. G.; ZHU, Q. B. *et al.* Review of seed quality and safety tests using optical sensing technologies. **Seed Sci. Technol.**, v. 43, n. 3, p. 337–366, 2015.

HYMOWITZ, T. *et al.* Estimations of protein and oil concentration in corn, soybean, and oat seed by near-infrared light reflectance. **Crop Science**, Madison, v. 14, p. 167–170, 1974.

INGLETT, G. E. Kernel structure composition and quality. *In*: INGLETT, G. E. (Ed.). **Corn: culture, processing products**. West Port: The Avi Publishing Company, 1970.

ISTA. **Handbook of vigour test methods**. 3. ed. Zurich: ISTA: 2012. 117p.

JAYARAM, C.; PETERSON, P. A. Anthocyanin pigmentation and transposable elements in maize aleurone. *In*: JANICK, J. (Ed.). **Plant breeding reviews**. Portland: Timber, 1992. p. 91-137.

JELLUM, M. D.; MARION, J. E. Factors affecting oil content and oil composition of corn (*Zea mays*, L) grain. **Crop Science**, Madison, v. 6, p. 41, 1966.

JIANHUA, Z.; McDONALD, M. B. The saturated salt accelerated aging test for small-seeded crops. **Seed Science and Technology**, v. 25, p. 123-131, 1996.

KING, J. W. V.; O'FARREL, S. F. E. New method to measure oil content. **Inform**, Silver Spring, v. 8, p. 1047–1051, 1997.

KOTYK J. J. *et al.* High-throughput determination of oil content in corn kernels using nuclear magnetic resonance imaging. **Journal of the American Oil Chemists Society**, Heidelberg, v. 82, n. 12, p. 2005.

KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA-NETO, J. B. **Vigor de Sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999, 218p.

KUSUMANINGRUM, D.; LEE, H.; LOHUMI, S. Nondestructive technique for determining the viability of soybean (*Glycinemax*) seeds using FT-NIR spectroscopy. **J. Sci. Food Agric.**, v. 98, n. 5, p. 1734–1742, 2018.

LIMA, G. P.; NASCIMENTO, W. M. Influência da idade e armazenamento dos frutos na qualidade de sementes de melão cv. Eldorado 300. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 2, p. 398, jul. 2003.

LOPES, M. A.; LARKINS, B. A. Endosperm origin, development, and function. **The Plant Cell**, Rockville, v. 5, n. 10, p. 1383-1399, oct. 1993.

MAGALHÃES, P. C. *et al.* **Fisiologia do milho**. Sete Lagoas: MAPA/Embrapa Milho e Sorgo, 2002. 23 p. (Circular Técnica, 22).

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

MATTHEWS, S. *et al.* Early counts of radicle emergence during germination as a repeatable and reproducible vigour test for maize. **ISTA New Bulletin**, Zurich, n. 141, p. 20-26, apr. 2011.

MENEGHELLO, G.E. qualidade de sementes: umidade e temperatura. **Revista SeedNews**, ano XVIII, n.6, 2014. Disponível em: http://www.seednews.inf.br/html/site/content/reportagem_capa/imprimir.php?id=208. Acesso em: 25 de jul. 2017.

MENEZES, N. L.; LERSCH-JUNIOR, I.; STORCK, L. Qualidade física e fisiológica das sementes de milho após beneficiamento. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 24, n.1, p. 97-102, 2002.

MERCER, J. R. **Implicações do fenômeno Xênia nos programas de melhoramento de milho**. 2001. 53 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2001.

MUNIER-JOLAIN, N.; LARMURE, A.; SALON, C. Determinism of carbon and nitrogen reserve accumulation in legume seeds. **Biologies**, v. 331, p. 780-787, 2008.

NAKADA, P. G. *et al.* Desempenho fisiológico e bioquímico de sementes de pepino nos diferentes estádios de maturação. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 33, n. 1, p. 22-30, 2011.

NEUBERGER, T. *et al.* Nondestructive measurement of fruit and vegetable quality by means of NIR spectroscopy: a review. **Postharvest Biol.Technol.**, v. 46, n. 2, p. 99–118, 2007.

OHLROGGE, J.; BROWSE, J. Lipid biosynthesis. **The Plant Cell**, Rockville, v. 7, p. 957-970, 1995.

OLIVEIRA, L. E. M. **Fatores que afetam a composição química das sementes**. 2015. Disponível em: <http://www.ledson.ufra.br/metabolismo-da-germinacao/mobilizacao-de-reservas/fatores-que-afetam-a-composicao-quimica-das-sementes/>. Acesso em 05 jan. 2018.

PAMIN, K. *et al.* Genetic variation and selection response for oil composition in corn. **Crop Science**, Madison, v. 26, p. 279-282, 1986.

PASQUINI, C. Near infrared spectroscopy: a mature analytical technique with new perspectives – a review. **Anal. Chim. Acta**, v. 1026, p. 8–36, 2018.

PATERNIANI, E. Importância do milho na agroindústria. *In*: OSUNA, J. A.; MORO, J. R. (Ed.). **Produção e melhoramento do milho**. Jaboticabal: FUNEP, 1990. p. 125-154.

PEREIRA FILHO, I, A.; BORGHI, E. **Mercado de sementes de milho no Brasil safra 2016/2017**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2016. 33p. (Embrapa Milho e Sorgo. Documentos, 202).

PESKE, S.T. Colheita: quando e como?. **Revista SeedNews**, ano XVIII, n.5, 2014. Disponível em: http://www.seednews.inf.br/html/site/content/reportagem_capa/imprimir.php?id=200. Acesso em: 25 de jul. 2017.

PINTO, C. A. G. **Análise de imagens na avaliação do potencial fisiológico de sementes de milho**. 2014. 52f. Dissertação (Mestrado). Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

PONELEIT, G. C.; BALMAN, L. F. Diallel analyses of fatty acids in corn (*Zea mays*, L.). **Crop Science**, Madison, v. 10, p. 338-341, 1970.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2013.

REICH, G. Near-infrared spectroscopy and imaging: basic principles and pharmaceutical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 8, p. 1109-1143, 2005.

RENCH, W. E.; SHAW, R. H. Black layer development in corn. **Agronomy Journal**, Madison, v. 63, n. 2, p. 303-305, 1971.

RITCHIE, S. W.; HANWAY, J. J.; BENSON, G. O. **Como a planta de milho se desenvolve**. Piracicaba, Potafos, 2003. 20p. (Informações Agronômicas; 103).

SALON, N. G. *et al.* Grain legume seed filling in relation to nitrogen acquisition: a review and prospects with particular reference to pea. **Agronomie**, v. 21, p. 539–552, 2001.

SCHILTZ, N. *et al.* Dynamics of exogenous nitrogen partitioning and nitrogen remobilization from vegetative organs in pea revealed by N-15 *in vivo* labeling throughout seed filling. **Plant Physiol.**, v. 137, p. 1463–1473, 2005.

SEO, Y. W. *et al.* Non-destructive sorting techniques for viable pepper (*Capsicum annuum* L.) seeds using Fourier transform near-infrared and Raman spectroscopy. **J. Biosyst. Eng.**, v. 41, n. 1, p. 51–59, 2016.

SESTINI, M.F. **Variáveis geomorfológicas no estudo de deslizamentos em Caraguatatuba – SP utilizando imagens TM-LANDSAT e SIG**. 1999. 140 p. Dissertação (Mestrado) – Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, 1999.

SHANG, Z.W. *et al.* Quality analysis with near infrared spectroscopy in perilla seed. **Spectrosc. Spectr. Anal.**, v. 37, n. 12, p. 3719–3724, 2017.

SHETTY, N. *et al.* Optimal sample size for predicting viability of cabbage and radish seeds based on near infrared spectra of single seeds. **J. Near Infrared Spectrosc.**, v. 19, n. 6, p. 451–461, 2011.

SILVA, P. P. **Características fisiológicas, bioquímicas e morfológicas de sementes de abóbora durante o desenvolvimento**. 2014. 112f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Pelotas, 2014.

SILVA, T. R. G.; CORTELAZZO, A. L.; DIETRICH, S. M. C. Variation in storage compounds during germination and early plantlet growth of *Dalbergia miscolobium*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 10, n. 2, p. 119-124, 1998.

SILVEIRA, J.F.; VIEIRA, M.G.G.C. Beneficiamento de sementes. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 8, n. 9, p. 50-56, 1982.

STONE, S. L.; GIFFORD, D. J. Structural and biochemical changes in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) seeds during germination and early-seedling grown. I. Storage protein reserves. **International Journal of Plant Science**, v. 158, n. 6, p. 727-737, 1997.

TIBCO Spotfire AB. Spotfire Technology Network. Disponível em:
<http://stn.spotfire.com/stn/Default.aspx>.

TOLLENAAR, M.; DAYNARD, T. B. Effect of defoliation on kernel development in maize. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 58, p. 207-212, 1978.

VALDERRAMA, P. *et al.* **Avaliação de figuras de mérito em calibração 93 multivariada na determinação de parâmetros de controle de qualidade em indústria alcooleira por espectroscopia no infravermelho próximo**. 2005. Dissertação (Mestrado) –Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

VANZOLINI, S.; TORRES, R. M.; PANIZZI, R. C. Efeito do tamanho, da densidade e do tratamento fungicida sobre a qualidade das sementes de amendoim. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 47, n. 274, 2000.

VIDIGAL, D. S. *et al.* Alterações fisiológicas e enzimáticas durante a maturação de sementes de pimenta (*Capsicum annuum* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n. 2, p. 129-136, 2009.

WEBB, A.; BORISJUK, L. **Quantitative imaging of oil storage in developing crop**
WEISMANN, M. **Fases de Desenvolvimento da Cultura do Milho. Tecnologia e Produção: Milho Safrinha e Culturas de Inverno**. 2008. Disponível em:
<http://atividaderural.com.br/artigos/4fb3e56aa8c56.pdf>. Acesso em: 25 de jul. 2020.

WEN, D. *et al.* Rapid evaluation of seed vigor by the absolute content of protein in seed within the same crop. **Sci. Rep.**, v. 8, n. 1, p. 5568–5569, 2018.

WOLFSON, J. L.; SHEARER G. Amino acid composition of grain protein of maize grown with and without pesticides and standard commercial fertilizers. **Agronomy Journal**, v. 73, p. 611-613, 1981.

WU, J.Z. *et al.* Research on optimization of wheat seed germination rate NIR model based on Si-cPLS. **Spectrosc. Spectr. Anal.**, v. 37, n. 4, p. 1114–1117, 2017.

ZIMMER, P. D. Fundamentos da qualidade de sementes. *In*: PESKE, S. T.; VILLELA, F. A.; MENEGHELLO, G. E. (Orgs.). **Sementes: fundamentos científicos e tecnológicos**. 3. ed. Pelotas: Editora. Universitária/UFPel, 2012. p.106-160.

CAPÍTULO 1

Classificação de lotes de sementes de milho por infravermelho próximo

RESUMO

Classificação de lotes de sementes de milho por infravermelho próximo

A técnica espectroscópica do Infravermelho Próximo por Refletância (NIR) não invasiva, pode fornecer rapidamente informações físicas e químicas sobre a qualidade de sementes de milho. Sendo assim, a presente pesquisa objetivou validar o equipamento infravermelho (NIR) para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de milho úmidas em função do teor de óleo das sementes. O experimento foi realizado na Bayer Brasil, Uberlândia-MG e contemplou três fases: relação óleo e fisiológico, curva de deterioração controlada e validação do equipamento. Foram coletadas em três vezes na semana na recepção da Unidade de Beneficiamento amostras de milho em espiga, 10 a 15 espigas em cada amostra, durante três safras, com umidade de colheita entre 25% e 36%. Após a coletas as amostras foram analisadas no NIR XDS com espectro completo (400-2500 nm) com auxílio do software ISIScan. Parte das amostras foram encaminhadas para avaliação do teor de óleo e medição da umidade em instituição de referência. A qualidade fisiológica foi avaliada por meio do teste padrão de germinação (TPG) e pela protrusão da raiz primária (RET). Os dados obtidos foram submetidos à análise de dispersão e Qui-quadrado, PCA (Principal Component Analysis) e análise de cluster (método de K-means com a correlação de Pearson). O teste Qui-quadrado não mostrou significância entre o vigor e o teor de óleo, confirmando, portanto, que não há correlação entre as variáveis. A deterioração controlada mostrou-se eficiente, no sentido de manter o grau de umidade das sementes durante o decorrer do teste entre 20 e 25% e mostrar uma segregação dos espectros das amostras de qualidade fisiológica boa e ruim. Com o terceiro conjunto de dados, da validação, foi possível criar regras matemáticas e concluir que os espectros gerados por equipamento NIR XDS podem ser utilizados de forma rápida para tomadas de decisão sobre as amostras de semente de milho, considerando uma classificação binária para os parâmetros de Germinação e Vigor de acordo com os valores de aprovação e reprovação de lotes utilizados pela empresa.

Palavras-chave: teor de óleo; qualidade fisiológica; *Zea mays*, NIR.

ABSTRACT

Classification of corn seed lots by near infrared

The non-invasive Near Infrared Reflectance (NIR) spectroscopic technique can quickly provide physical and chemical information on the quality of maize seeds. Thus, the present research aimed to validate the infrared equipment (NIR) for evaluating the physiological quality of fresh corn seeds as a function of the oil content of the seeds. The experiment was carried out at Bayer Brasil, Uberlândia-MG and included three phases: oil and physiological relationship, controlled deterioration curve and validation of the equipment. Samples of corn on the cob, 10 to 15 ears in each sample, were collected three times a week at the reception of the Processing Unit, with harvest moisture between 25% and 36%. After collection, the samples were analyzed using NIR XDS with full spectrum (400-2500 nm) using the ISIScan software. Part of the samples were sent for assessment of oil content and moisture measurement in a reference institution. Physiological quality was assessed using the standard germination test (TPG) and primary root protrusion (RET). The data obtained were submitted to dispersion analysis and Chi-square, PCA (Principal Component Analysis) and cluster analysis (K-means method with Pearson correlation). The Chi-square test did not show significance between vigor and oil content, thus confirming that there is no correlation between the variables. Controlled deterioration proved to be efficient, in the sense of maintaining the moisture content of the seeds during the course of the test between 20 and 25% and show the segregation between samples with physiological quality good and bad. It was possible to conclude that the spectra generated by NIR XDS equipment can be used quickly for decision making on corn seed samples, considering a binary classification for the Germination and Vigor parameters according to the pass and fail values used by the company.

Keywords: oil content; physiological quality; *Zea mays*; NIR.

1 INTRODUÇÃO

Uma das técnicas não destrutivas, com boa precisão, extremamente segura para o operador e largamente utilizada para a mensuração dos componentes do grão é o espectrofotômetro - NIR (Infravermelho Próximo por Refletância) (DYER, 2004). As publicações descrevendo as aplicações do NIR nas análises do grão do milho, começaram a aparecer na metade da década de 1970. Os primeiros trabalhos reportaram resultados promissores para a análise de proteína e óleo em amostras de milho moído utilizando um espectrofotômetro Dikey John com um coeficiente de múltipla determinação de 0,99 para a calibração e 0,91 para validação de cada análise (HYMOWITZ et al., 1974; DYER e FENG, 1997).

A espectroscopia NIR é a técnica que mede a detecção da absorbância do infravermelho próximo por uma amostra. O infravermelho próximo está na faixa de 800 nm a 2500 nm e possui energia suficiente para excitar sobretons (ligações orgânicas), combinações de vibrações moleculares a autos níveis de energia. O espectrofotômetro NIR é tipicamente utilizado para medições quantitativas de grupos funcionais orgânicos, especialmente O-H (ácidos graxos), N-H (proteínas), e C=O (ésteres). Os limites de detecção são da ordem de 0,1% e as aplicações incluem análises em produtos farmacêuticos, agrícolas, polímeros, e análises clínicas (ALEXANDER et al., 1967).

No espectro eletromagnético, o infravermelho (IR, infrared) faz limites com a região visível e região de microondas. A região espectral do infravermelho compreende a radiação com número de onda que varia de 12.800 a 4.000 cm^{-1} . Na Figura 2 pode-se perceber qual a divisão do espectro eletromagnético com demarcações nas faixas do Infravermelho próximo (SKOOG et al., 2009).

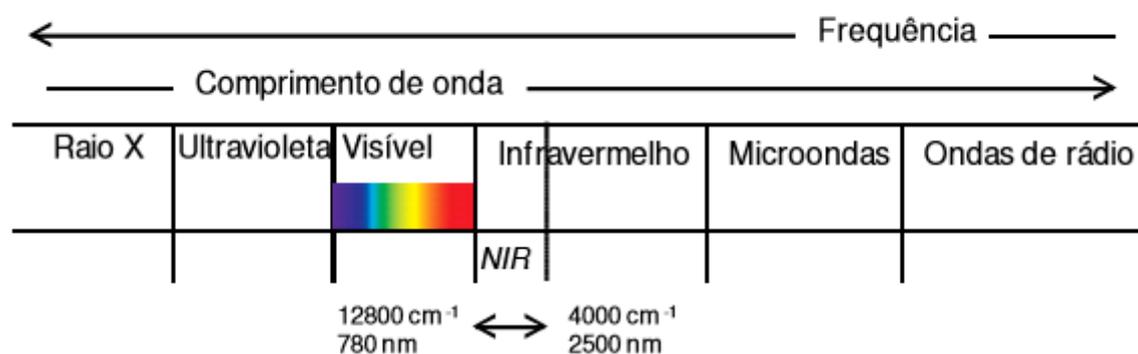


Figura 2. Espectro eletromagnético com regiões do infravermelho e infravermelho próximo demarcadas. (Skoog et al., 2009)

No início do desenvolvimento da tecnologia, foram relatadas calibrações na região de espectro do infravermelho (5500 – 16500 nm) para óleo, proteína e carboidrato em amostras de soja moída nos quais a composição dos componentes foi alterada adicionando-se ou retirando-se óleo. Apesar da calibração ainda incipiente tecnologicamente, encontraram-se coeficientes de correlação de 0,93 para proteína e 0,96 para óleo (DYER e FENG, 1996).

A radiação da região eletromagnética do NIR (700 a 2498nm ou 14286 a 4003 cm⁻¹) é absorvida pela água e por compostos orgânicos (carboidrato, proteína, óleo e álcool). Os NIRs lidam com a absorção da radiação NIR e cada pico tem uma frequência, forma e altura da banda bem definidas. Quando uma frequência de luz corresponde a uma vibração molecular, é absorvida pela amostra. A fração de luz transmitida pela amostra em comparação com o incidente de luz em função da frequência fornece o espectro infravermelho próximo da amostra (OLESEN et al., 2011).

Estudo com tomate demonstra o potencial do uso de espectroscopia NIR para prever sementes de tomate viáveis e não viáveis. Ele demonstra que o uso de apenas variáveis relevantes para a classificação e ignorar o restante das informações espectrais poderia melhorar o desempenho do modelo. O estudo ainda sugere que os comprimentos de onda que contêm informações químicas da água e das proteínas têm uma grande influência na classificação de sementes de tomate viáveis e não viáveis (SHRESTHA et al., 2017).

O principal objetivo desta técnica é obter informações de grupos funcionais de uma amostra, porque cada grupo funcional absorve em uma frequência característica desta região (SILVERSTEIN e WEBSTER, 1998).

Em sementes, os primeiros trabalhos utilizando essa técnica foram realizados na determinação do teor de água de soja e milho (HART et al., 1962). Com o avanço de utilização dessa técnica, foi possível a determinação de compostos como proteína, carboidratos, óleo, ácidos graxos totais e livres (WILLIAMS, 1973; WILSON et al., 1973).

Em sementes de milho, a técnica do NIR foi utilizada na determinação do conteúdo de óleo, proteína e amido (DUDLEY et al., 1975; HILLIARD e DAYNARD, 1976) e estudos relacionados à dureza, densidade e contaminações por microrganismos (GREENE et al., 1992; POMERANZ et al., 1984; SISKÁ e HURBURGH, 1996).

Esta técnica espectroscópica não invasiva pode fornecer rapidamente informações físicas e químicas sobre os mais diversos tipos de amostras. No entanto, o NIR apresenta um espectro com bandas altamente sobrepostas que por si só não trazem informações úteis. Para extrair informações qualitativas e quantitativas de espectros NIR é necessário a utilização de técnicas de análise multivariada como a regressão por quadrados mínimos parciais (PLS) e o PLS para análise discriminante (PLS-DA), respectivamente, dentre outras (McCLURE, 2003; PASQUINI, 2003; WORKMAN E WEYER, 2007).

Atualmente, essa técnica tem sido utilizada em substituição às análises tradicionais para a determinação de constituintes de alimentos, como a detecção de óleo em milho (MITTELMANN et al., 2006), na determinação de organismos geneticamente modificados em alimentos contendo soja (CONCEIÇÃO *et al.*, 2006) e na composição química de grãos de milho submetidos à secagem e armazenados (GUTKOSKI et al., 2009). Em sementes, o NIR tem sido também utilizado na seleção de genótipos de interesse comercial, como em aveia (SILVA et al., 2008), em ensaios de competição de cultivares visando a selecionar genótipos com maior conteúdo de óleo em girassol (GRUNVALD et al., 2009), na seleção de populações de milho com maior teor de óleo (MITTELMANN et al., 2006).

Sendo assim, a presente pesquisa objetivou validar o equipamento infravermelho (NIR) para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de milho úmidas em função do teor de óleo das sementes.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Condução do experimento NIR XDS

O experimento foi conduzido na Bayer do Brasil em Uberlândia - MG, na Planta Piloto da área de Pesquisa de Produção. Foram utilizadas espigas de milho das safras Inverno 2018, Inverno 2019, Verão 2019 ou Inverno 2020, com umidade de colheita entre 25% e 36%.

Utilizou o equipamento NIR XDS da marca FOSS (XDS Rapid Content Analyser™), conforme Figura 3. Este equipamento é de espectro completo, 400-2500 nm, que permite aos laboratórios a construção de suas próprias calibrações para quaisquer amostras e parâmetros adequados para NIR, como por exemplo: proteína, gordura, umidade, fibra, amido, aminoácidos, entre outros (Figura 4). Foi realizada a instalação do software (programa ISIScan™ versão 1.20 e Visio) em um computador específico para uso deste equipamento.

O projeto contemplou três fases: relação óleo e parâmetros fisiológicos, curva de deterioração controlada e validação do equipamento no processo de decisão para beneficiamento das sementes.



Figura 3. Equipamento NIR XDS marca FOSS, instalado na Planta Piloto da Bayer de Uberlândia – MG.
Fonte: O autor.

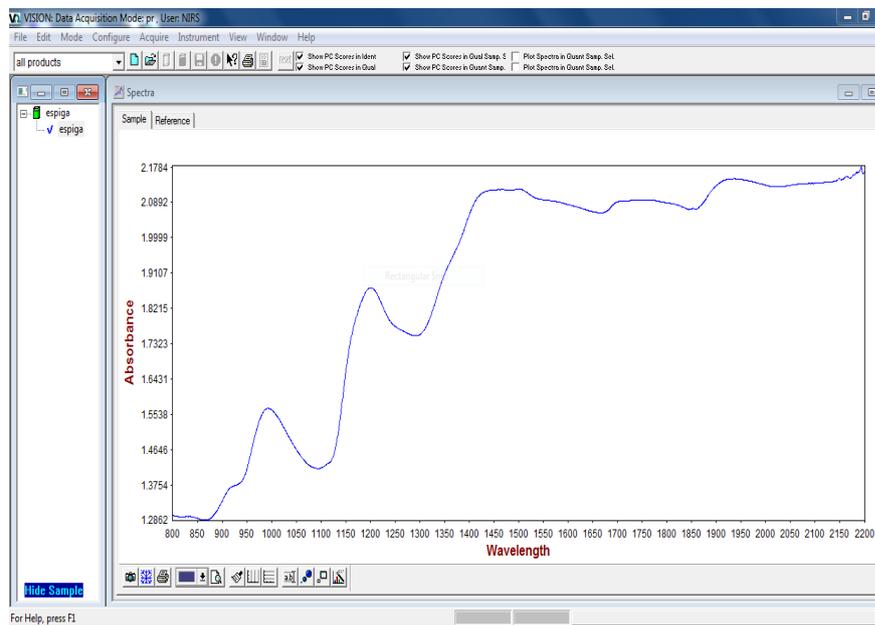


Figura 4. Exemplo do espectro possível de ser analisado pelo NIR XDS marca FOSS.
Fonte: O autor.

2.1.1 Fase de estudo da relação óleo com parâmetros fisiológico

Os analisadores XDS oferecem análise simples e rápida de amostras líquidas e / ou sólidas e viscosas de acordo com a aplicação. A apresentação de amostra flexível torna ideal para testar amostras diversas. As amostras podem ser testadas em frascos, sacos ou garrafas originais ou com uma ampla escolha de módulos de apresentação de amostras.

O software ISIScan™ fornece uma interface amigável que suporte as mais recentes tecnologias de calibração com LIMS (Advanced Data Exchange) e recursos de relatórios.

Foram coletadas 228 amostras de milho em espiga, sendo 10 a 15 espigas em cada amostra, em diferentes momentos da safra. A coleta foi feita diretamente nos caminhões que chegaram com matéria prima bruta do campo de produção. Foram colhidos amostras de espigas, em diferentes umidades de colheita (25% - 36%). As coletas foram feitas às segundas, terças e sextas-feiras, até às 10h da manhã de cada dia, prazo exigido pelo SENAI (Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial) para conseguir realizar as análises de umidade e determinação do teor de óleo no mesmo dia.

Cada amostra coletada foi identificada com etiqueta específica utilizada nos ensaios de pesquisa de produção da Bayer. Foram levadas à planta piloto, imediatamente despalhadas e debulhadas manualmente. Na sequência foram passadas pelo equipamento NIR XDS e em seguida 300g de cada amostra foram acondicionadas em sacos plásticos bem vedados e depois foram colocadas em sacos de papel com identificação. Essas amostras foram enviadas ao SENAI Uberlândia para medições de umidade e teor de óleo. Aproximadamente 500g de cada amostra foram acondicionadas em embalagem teladas e secas em secador experimental, tratadas com tratamento de calda padrão de acordo com Tabela 2.

Tabela 2. Ingredientes da calda básica utilizados para tratamento de amostras.

Calda básica Maxim Advanced	Dosagens L/t
K-obiol	0,08
Actellic	0,02
Haiten	0,01
Maxim Advanced	1
água	6,9
consumo médio/t	8,01

Fonte: O autor.

Após tratamento, foram acondicionadas em sacos de papel multifoliado com identificação, enviadas ao LAS Bayer (Laboratório de Análises de Sementes) na mesma planta de Uberlândia – MG, para análise de TPG (Teste Padrão de Germinação), segundo RAS (Regras para Análises de Sementes), (BRASIL, 2009) e RET – protrusão da raiz primária como teste de vigor, sendo este de metodologia própria, desenvolvida pela Bayer, o qual utiliza base gel, com duração de sete dias em câmara fria a 14°C e avaliação do crescimento radicular por equipamento de imagem. Porções de sementes, sem tratamento, da mesma amostra foram guardadas para análises de NIR, TPG e RET após 6 e 12 meses. Foram armazenadas sem tratamento químico e tratadas antes de cada período de análises.

2.1.2 Determinação da curva de deterioração controlada

Ainda na fase inicial do estudo foi feita uma curva de deterioração controlada com o objetivo de conhecermos o espectro de viabilidade e de morte das sementes de milho.

Foi necessário criar uma “câmara úmida” para uniformizar a umidade inicial das sementes. Foram escolhidos lotes de genótipos com qualidade inicial alta e baixa e de safra nova. Foram montadas aproximadamente 230 caixas plásticas tipo Gerbox® com tela para acondicionar todo o volume das sementes necessárias para estudos de germinação, vigor e NIR. Nas caixas foi criado um microclima com solução saturada de sulfato de potássio. As sementes foram dispostas sobre as telas, para evitar o contato direto com a solução e a caixa foi fechada com tampa. Foram montadas 3 repetições de cada híbrido, sendo 38 caixas para cada repetição.

Os lotes escolhidos eram de sementes amarelas, provenientes de silos ou Big Bags, secas (~11%), debulhadas e classificadas. Foi realizada análise fisiológica inicial por meio de TPG - teste padrão de germinação, RET – protrusão da raiz primária segundo procedimento interno da Bayer, e a umidade inicial com equipamento Aquamatic 5200 da marca Perten após o que as amostras foram pesadas.

A solução saturada de sulfato de potássio em cada caixa permitiu a elevação da umidade relativa interna para cerca de 95%. As caixas com a solução e com as

sementes sobre telas foram vedadas e deixadas sobre bancadas em ambiente de temperatura controlada (25°C).

Foi medida a massa inicial de 6 caixas (2 de cada repetição de cada híbrido) e a cada 24h foi realizada nova pesagem até a massa das sementes não variar mais.

Foi montado um teste piloto com os dois materiais escolhidos para conhecermos o tempo necessário para a umidade das sementes entrarem em equilíbrio com a solução saturada, conforme Figura 5.



Figura 5. Exemplo de caixa montada para projeto piloto de câmara úmida com solução de sulfato de potássio.

Fonte: O autor.

Uma vez as sementes já estarem com a umidade inicial uniformizada, as caixas com a solução e as sementes foram levadas para câmaras de envelhecimento acelerado (Symphony™ modelo: 3078) com umidade saturada e temperatura de 42°C (+-1°C), câmara do tipo B.O.D. por 96h (+-1h) que é equivalente a quatro dias (ou até termos germinação e vigor muito baixos) (KRZYZANOWSKI et al., 1999), conforme Figura 6.

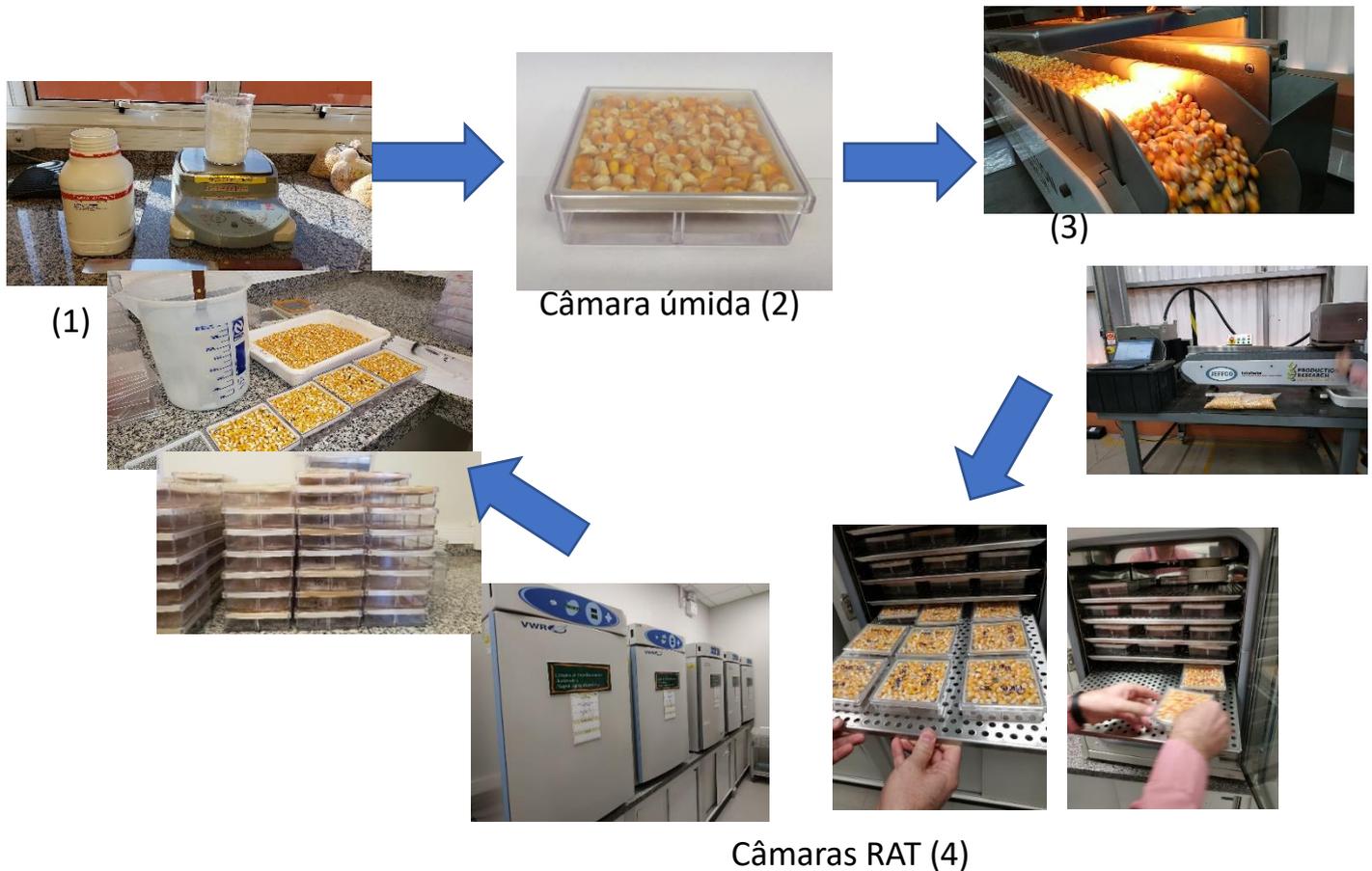


Figura 6. Resumo do processo de montagem da curva de deterioração controlada. (1) preparação da solução de sulfato de potássio e colocação das sementes sobre as telinhas; (2) câmara úmida preparada aguardando as sementes entrarem em equilíbrio de umidade; (3) passagem das sementes pelo equipamento NIR XDS; (4) colocação das caixinhas (câmaras úmidas em equilíbrio) nas câmaras RAT (Rapid Aging Test) para iniciar o processo de deterioração controlada.

Fonte: O autor.

A cada 24h as caixas foram retiradas da câmara, as sementes foram passadas no equipamento NIR XDS, foram medidas as umidades em equipamento Aquamatic 5200 da marca Perten e foram montados TPG - teste padrão de germinação, segundo as RAS (BRASIL, 2009) e teste de vigor chamado RET – protrusão da raiz primária.

2.1.3 Fase de validação do processo NIR XDS

Seguindo o objetivo proposto acima, é de grande importância o desenvolvimento de tecnologias que nos permitam determinar o potencial fisiológico

de um lote de sementes de milho recém-colhidas em espiga, com alta umidade, a fim de antecipar as decisões de beneficiamento e conseguir um melhor aproveitamento dos lotes gerados.

Assim, muitas amostras de sementes (~200), sendo 10 a 15 espigas em cada amostra, foram retiradas diretamente dos caminhões que chegaram com matéria prima bruta do campo de produção. Foram colhidos vários híbridos, em diferentes umidades de colheita (25%-36%). Cada amostra coletada foi identificada com etiqueta específica utilizada nos ensaios de pesquisa de produção da Bayer. Foram levadas à planta piloto, imediatamente despalhadas e debulhadas manualmente. Foram passadas pelo equipamento NIR XDS e em seguida 500g de cada amostra foram acondicionadas em embalagem teladas e secas em secador experimental, tratadas com tratamento de calda básica de acordo com Tabela 2.

Após tratamento, foram acondicionadas em sacos de papel multifoliado com identificação, enviadas ao LAS Bayer (Laboratório de Análises de Sementes) na mesma planta de Uberlândia – MG, para análise de TPG (Teste Padrão de Germinação), segundo RAS (Regras para Análises de Sementes), (BRASIL, 2009) e RET – protrusão da raiz primária como teste de vigor, sendo este de metodologia própria, desenvolvida pela Bayer.

Os resultados obtidos pelo NIR XDS foram comparados com os resultados do TPG e RET. Foram feitas comparações, por duas regras distintas, entre os resultados fisiológicos obtidos no LAS Bayer e os resultados dos espectros do equipamento para óleo ou qualquer outro espectro desconhecido, porém com alta relação.

3 Análise estatística

NIR XDS: os dados obtidos foram submetidos à análise de dispersão e Qui-quadrado. Também foi feita uma PCA (Principal Component Analysis) para estudo da relação entre o teor de óleo com os indicadores fisiológicos. Para os dados da deterioração controlada foi feita uma análise de cluster nos dados de TPG – Teste Padrão de Germinação e RET – protrusão da raiz primária e óleo. Na análise de cluster utilizou-se o método de K-means com a correlação de Pearson por medida de similaridade, as análises foram implementadas através do programa estatístico

TIBICO Spotfire e R (R CORE TEAM, 2013). No método de K-Means objetivou-se agrupar as distâncias nos comprimentos de ondas para criar índices, classificações que separassem os materiais estudados por tratamentos da deterioração controlada afim de se ter uma classificação por qualidade fisiológica. Foi aplicado também um método de suavização (Loess - Bonat, 2007). Regressão Local (Loess) é um método não paramétrico que estima curvas e superfícies através de suavização (smoothing) e foi utilizado para melhor compreensão dos picos e vales dos espectros em estudo. Para o conjunto de dados de validação foram utilizadas duas metodologias diferentes: para a regra #1 foi feita uma comparação entre a classificação dos índices gerados pelo espectro de cada amostra e a classificação dos padrões de germinação e vigor e para a regra #2 foram utilizados o PLS-DA (BARKER E RAYENS, 2003), o algoritmo por meio do método de Kennard-Stone (KENNARD E STONE, 1969) e “seleção dos preditores ordenados” para análise discriminante (OPSDA) (ROQUE, 2019; ROQUE et al., 2019).

4 Resultados e discussões

4.1 Fase de análise da relação do teor de óleo e fisiológico.

O primeiro conjunto de dados foi composto de 456 amostras considerando duas repetições, sendo estas divididas em tempos de armazenamento (0, 6 ou 12 meses) e umidade (seco ou úmido). Além dos espectros, neste conjunto estão disponíveis os valores referentes aos testes de germinação (80 – 100 %) e vigor (53 – 100 %), além dos valores de teor de óleo (2,50 – 3,92 %). Com esses dados foi feita a análise PCA conforme Figura 7.

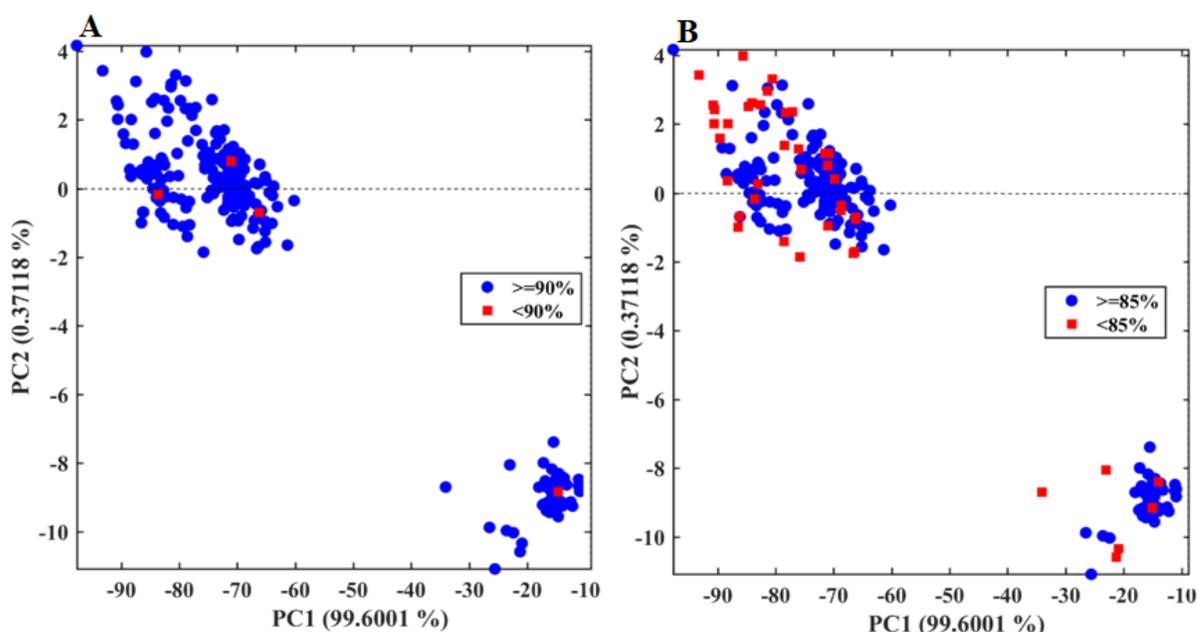


Figura 7. Escores do PCA de duas componentes principais do primeiro conjunto de dados com os dados categorizados em relação à TPG – germinação (A) e RET – vigor (B).
Fonte: O autor.

Análise de componentes principais (PCA) é um método multivariado de redução dimensional de dados que transforma um conjunto de variáveis correlacionadas em um conjunto de variáveis latentes linearmente independentes chamadas de componentes principais (BRO e SMILDE, 2014; GELADI et al., 2004).

Após a média das repetições do primeiro conjunto de dados foram obtidas 228 amostras, sendo que apenas 4 (aproximadamente 1%) delas apresentaram germinação menor que 90%. Para o vigor, das 228 amostras, apenas 19 amostras (aproximadamente 8%) apresentavam vigor menor que 85%.

Além disso, foi possível notar, tanto para a germinação quanto para o vigor que, a quantidade de amostras foi desproporcional entre as classes. Bem como pelo PCA não há nenhuma evidência de separação dessas classes, o que provavelmente pode ser devido a essa desproporcionalidade. O PCA apresentado neste trabalho é dos espectros NIR sem nenhum pré-tratamento espectral, mas vale ressaltar que nenhum pré-tratamento foi capaz de proporcionar uma melhor separação entre as classes. Sendo assim, uma modelagem das classes de germinação e vigor foi inviável a partir deste conjunto de dados.

Diante desta análise foi necessário avaliar a relação do teor de óleo com resultados fisiológicos de outra forma. A Figura 8 (A e B) mostra gráficos de

dispersão dos valores de germinação e vigor relacionados com os valores de teor de óleo.

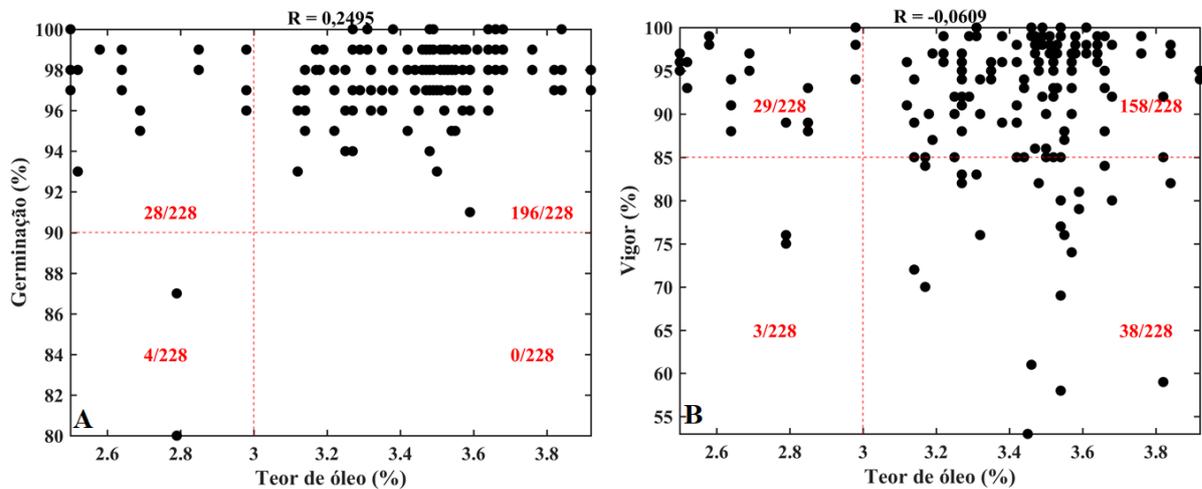


Figura 8. Gráfico de dispersão entre germinação com o teor de óleo (A) e vigor com o teor de óleo (B).

Fonte: O autor.

A Figura 8A mostra que a germinação e o teor de óleo apresentam correlação ($R = 0,2495$), com a maior parte das amostras (86%) com maior teor de óleo e alta germinação, mesmo estas variáveis não apresentando correlação. Para a Figura 8B a correlação ($R = -0,0609$) entre o vigor e o teor de óleo é praticamente nula.

Os quadrantes foram obtidos através da divisão utilizando o limiar de 90% de germinação, 85% de vigor, e o teor de óleo de 3%. Dessa forma foi possível realizar uma contagem da quantidade de amostras em cada quadrante, como pode ser visto nas Figuras 8A e 8B. A partir disso, um teste de Qui-quadrado para independência (AGRESTI, 2013) foi realizado para verificar a eventual relação entre resultados de vigor e teor de óleo. Vale ressaltar que para germinação e o teor de óleo não foi possível realizar este teste, visto que a distribuição das amostras entre os quadrantes foi desproporcional. O p-valor (0,26) foi maior que 5%, logo, não rejeitamos a hipótese de que as variáveis vigor e teor de óleo seriam independentes. O teste Qui-quadrado não mostrou significância estatística entre o vigor e o teor de óleo ($p > 0,05$), confirmando, portanto, que não há correlação entre as variáveis.

Neste sentido, Jiang et al., 2007 objetivando conduzir análises do teor de proteína, amido e óleo em grãos de milho inteiros e intactos por espectroscopia de refletância (NIRS) em milho concluíram que a validação cruzada e os coeficientes de

validação externa para proteína foram 0,91 e 0,94, para amido 0,90 e 0,89 e para óleo 0,94 e 0,95, respectivamente, sendo assim, os autores sugerem que o NIRS seja usado em programas de melhoramento genético, como uma ferramenta precisa e não destrutiva. Baye, Pearson e Settles 2005, também em estudos com sementes de milho e analisando teor de óleo por espectroscopia de refletância (NIRS) resultaram que o NIR é eficiente para tal análise, corroborando com os resultados deste estudo.

4.2 Determinação da curva de deterioração controlada

Diante do exposto mencionado acima, onde não foi possível encontrar uma relação significativa entre o teor de óleo e o percentual de germinação ou vigor para as sementes de milho, optou-se pela realização de uma curva de deterioração controlada para entendermos se há uma relação significativa de qualquer outra parte do espectro com os percentuais de germinação ou vigor.

Na Figura 9 podemos ver os resultados das amostras do teste piloto da câmara úmida. A umidade relativa média encontrada nas caixas Gerbox® com solução salina de Sulfato de Potássio foi de 97%. As sementes estavam com 10,4% (material A) e 10,5% (material B) de umidade inicial e entraram em equilíbrio no quarto dia após montagem do teste com 22,1% e 23% de umidade respectivamente.

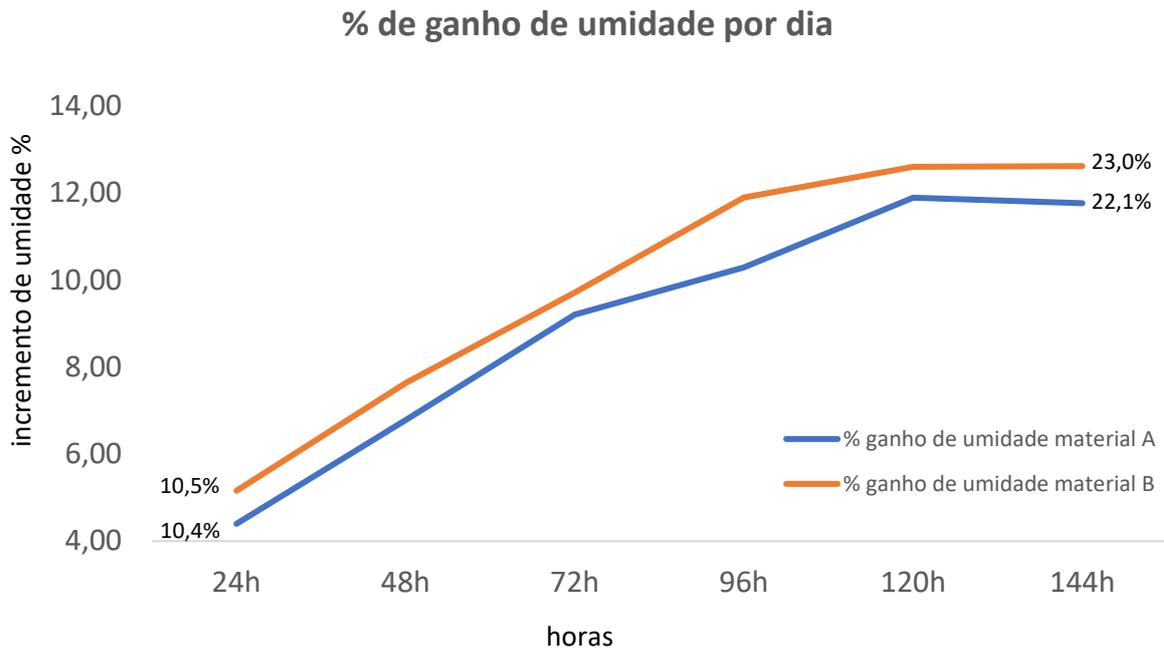


Figura 9. Gráfico do ganho de umidade percentual por dia/horas das amostras do teste piloto, instalado na Planta experimental da Bayer de Uberlândia – MG.
Fonte: O autor.

O teor de água das sementes influencia diretamente vários aspectos da sua qualidade fisiológica, por isso sua determinação é fundamental nos testes oficiais de qualidade dos lotes de sementes (Sarmiento et al. 2015).

De posse destas informações foi possível programar a melhor data para a realização do experimento.

O material A ficou com a germinação estável nas primeiras 24h, por volta de 90%, e depois reduziu o percentual de germinação gradativamente até 41% com 96h, Figura 10.

Curva de deterioração controlada - germinação (TPG)

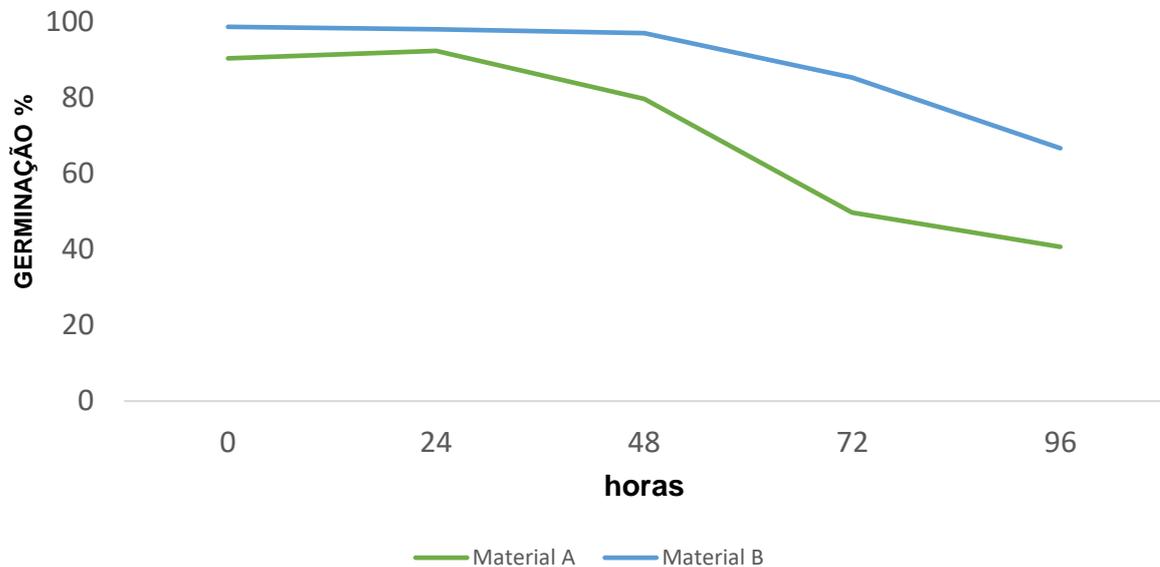


Figura 10. Gráfico da germinação (%) dos materiais A e B, em função do tempo de deterioração controlada (h), instalado no laboratório de análises de sementes da Bayer de Uberlândia – MG. Fonte: O autor.

Para o teste RET, Figura 11, podemos ver que este material teve o mesmo comportamento do teste de germinação, ficou estável nas primeiras 24h, com resultados ao redor de 95%, e depois reduziu o percentual de vigor até 21% com 96h. Já o material B teve um comportamento estável até as 48h para germinação e vigor, após, houve uma redução drástica destes percentuais. A germinação para este material passou de 99% para 67% e o RET passou de 98% para 53%.

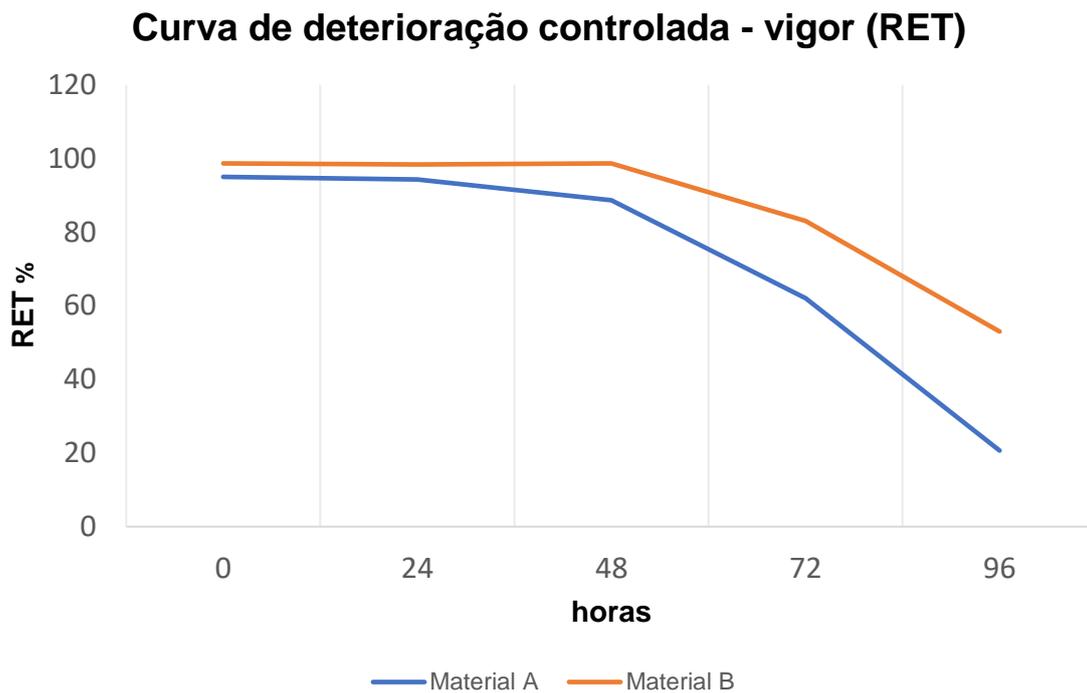


Figura 11. Gráfico do RET (vigor %) dos materiais A e B, em função do tempo de deterioração controlada (h), instalado no laboratório de análises de sementes da Bayer de Uberlândia – MG.
Fonte: O autor.

Alguns trabalhos a fim de descobrir um método de exame não destrutivo rápido para a taxa de germinação, como o trabalho de Cheng et al., 2011 com sementes de tomate, os quais estudaram o nariz eletrônico em dois métodos, sendo eles classificadas o de componentes principais (PCA) e análise de discriminação linear (LDA). O Nariz Eletrônico é um equipamento de análise de odores empregado em diversas áreas, como em análise de alimentos e controle ambiental. Sua função consiste em mimetizar o nariz humano por meio de sensores que reagem com componentes voláteis e gases liberados de uma amostra, resultando na modificação de um circuito elétrico que é interpretada por um *software*. Os resultados mostraram que as taxas de reconhecimento dos índices de germinação de sementes de tomate pelos dois métodos alcançaram 93,6% e 97,4% respectivamente com conjunto de treinamento e 65,2% e 72,7% respectivamente com conjunto de previsão.

Durante a realização desta fase de deterioração controlada também foi medida a umidade das sementes em cada dia e pela Figura 12 podemos verificar que não houve ganho expressivo de umidade por nenhum dos materiais em relação ao início do teste. A técnica utilizada para a deterioração controlada mostrou-se eficiente, no sentido de manter o grau de umidade das sementes durante o decorrer

do teste entre 20 e 25%. Uma vantagem da utilização de soluções saturadas de sais é que os valores de umidade relativa permanecem em níveis inferiores, suficientes para impedir o crescimento de microrganismos, minimizando, assim, a preocupação com efeitos de patógenos associados às sementes sobre os resultados dos testes de germinação e vigor com a semente deteriorada (JIANHUA E MCDONALD, 1996).

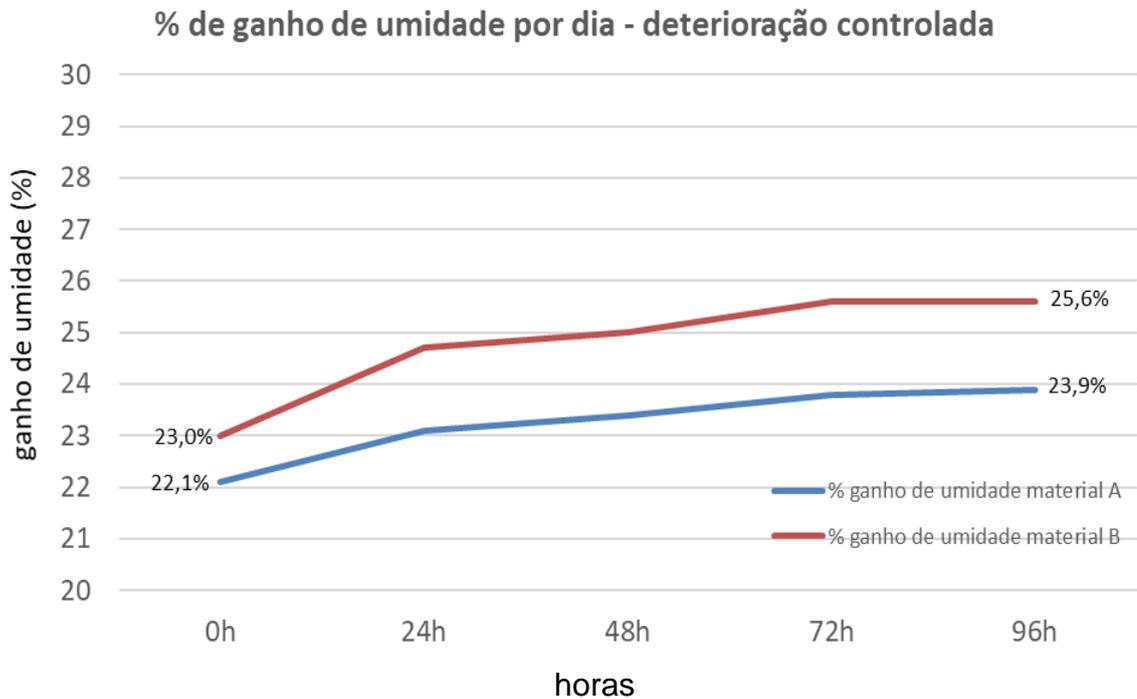


Figura 12. Gráfico do ganho de umidade percentual por dia/horas das amostras do experimento, durante a etapa de deterioração controlada, instalado no laboratório de análises de sementes da Bayer de Uberlândia – MG.

Fonte: O autor.

Uma vez as sementes já estavam com a umidade inicial uniformizada, as caixas com a solução e as sementes foram levadas para câmaras de envelhecimento acelerado e pela Figura 13 podemos notar uma separação dos tempos de medição do envelhecimento na deterioração diretamente nos espectros sem nenhum pré-tratamento dos dados. Tem-se os espectros brutos das amostras do experimento, passadas pelo equipamento NIR XDS, durante a etapa de deterioração controlada, o qual é possível observar para ambos genótipos (A e B), comportamento semelhante dos espectros.

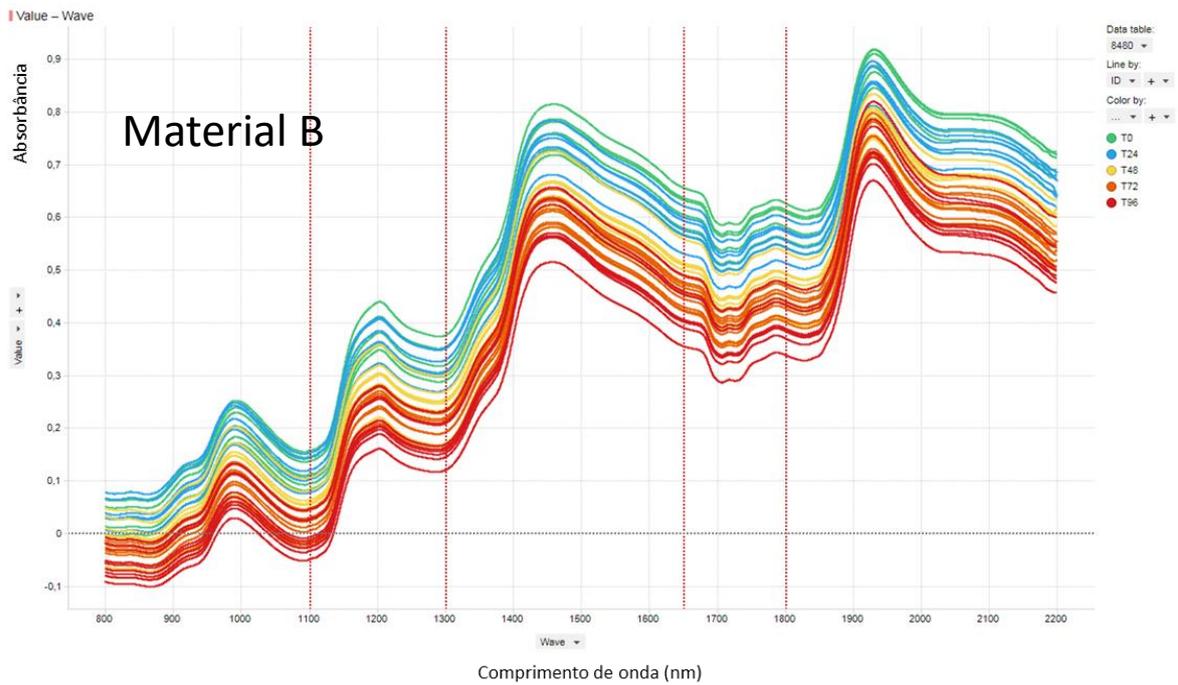
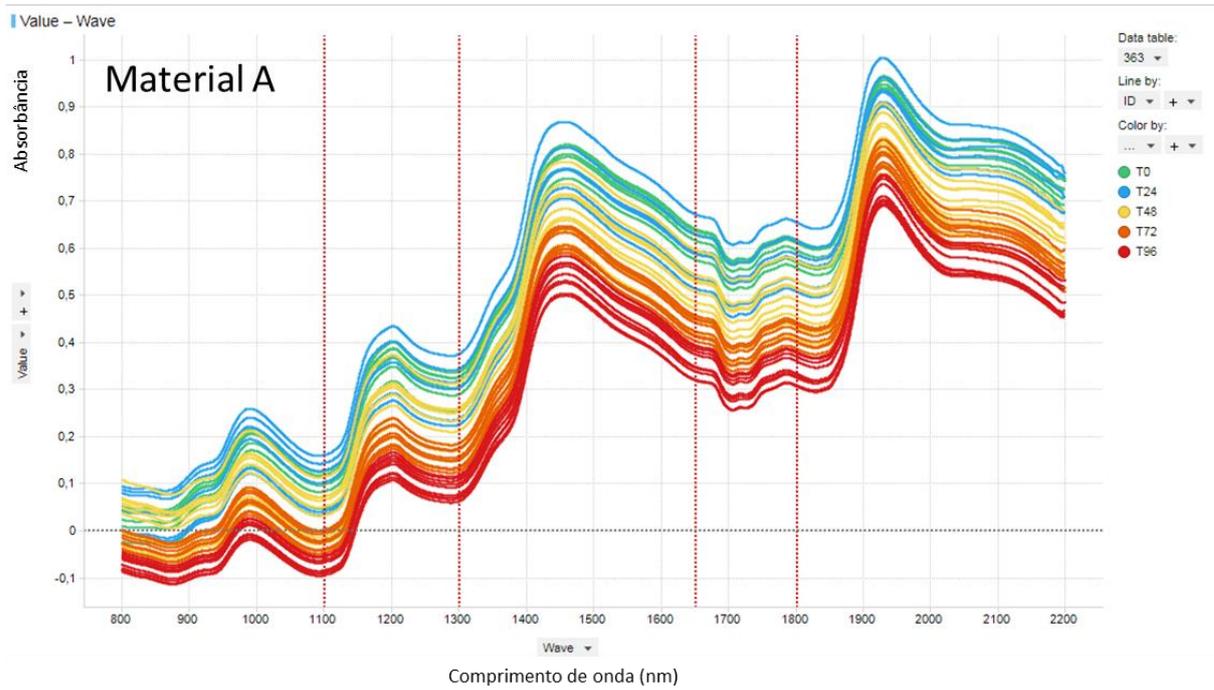


Figura 13. Gráficos dos espectros brutos das amostras do experimento, passadas pelo equipamento NIR XDS, durante a etapa de deterioração controlada, instalado no laboratório de análises de sementes da Bayer de Uberlândia – MG.
Fonte: O autor.

Como os espectros mantiveram comportamentos semelhantes para os dois genótipos, as análises foram feitas em conjunto, análise de cluster hierárquica nos dados de TPG – Teste Padrão de Germinação e RET – protrusão da raiz primária e óleo, por programa estatístico Spotfire e R, conforme Figura 14.

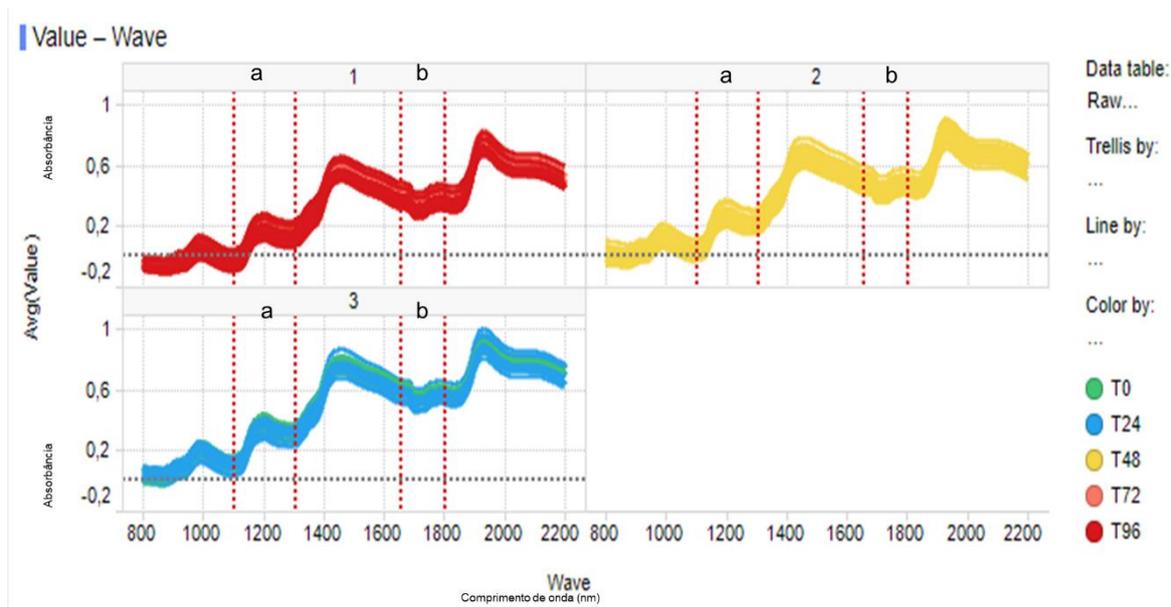


Figura 14. Gráficos dos espectros brutos das amostras do experimento clusterizados, passadas pelo equipamento NIR XDS, durante a etapa de deterioração controlada, instalado no laboratório de análises de sementes da Bayer de Uberlândia – MG. a – banda de pico do espectro onde ocorre concentração de CH_2 e provavelmente se encontra o óleo; 1100-1300 nm. b - banda de vale do espectro onde ocorre concentração de CH_2 e provavelmente se encontra o óleo; 1650-1800 nm
Fonte: O autor.

Para possibilitar as análises das bandas escolhidas, a e b da Figura 14, foram determinados o P10 e o P90 dos dados em cada tempo do estudo.

O P10 correspondem aos menores valores de absorvância da banda de pico (1100 a 1300 nm) e da banda do vale (1650 a 1800 nm), já o P90 correspondem aos maiores valores de absorvância das bandas de pico e de vale.

A espectroscopia de infravermelho próximo é baseada na absorção de radiação eletromagnética em comprimentos de onda na faixa de 780 – 2500nm de espectro eletromagnético da luz. Seus espectros resultam da vibração e consequente absorvância, principalmente em ligações de Carbono-Hidrogênio (C-H), Oxigênio-Hidrogênio (O-H), Enxofre-Hidrogênio (S-H) e Nitrogênio-Hidrogênio (N-H), presentes em compostos naturais, como demonstrado na Figura 15.

suavização (smoothing) e foi utilizado para melhor compreensão dos picos e vales dos espectros em estudo, conforme Tabela 3.

Pela Tabela 3 podemos observar que um índice de razão de banda maior, o espectro tem uma amplitude maior e menor potencial fisiológico. E o contrário é válido, ou seja, quando o índice de razão de bandas for menor, a amplitude do espectro é menor e, notam-se maiores valores para germinação e vigor.

Tabela 3. Valores médios de absorbância dos híbridos A e B nas prováveis bandas de óleo, razão de bandas, média de TPG (% de germinação) e média de teste RET (% vigor) em cada período de envelhecimento.

Time	P10	P90	P10	P90	P90/P10	P90/P10	Germinação	Vigor
	Banda1	Banda1	Banda2	Banda2	Banda1	Banda2	AVG TPG %	AVG RET %
T0	0,13	0,38	0,53	0,63	2,96	1,18	95	97
T24	0,14	0,38	0,50	0,62	2,83	1,24	95	96
T48	0,07	0,30	0,40	0,53	4,44	1,34	88	94
T72	0,02	0,24	0,36	0,45	15,19	1,25	68	73
T96	(0,03)	0,21	0,29	0,43	(8,34)	1,47	41	37

*() valores negativos

Fonte: O autor.

A operação matemática Razão entre Bandas permite discriminar sutis diferenças existentes no comportamento espectral de diferentes alvos, pois em bandas originais apenas diferenças grosseiras são observadas (ARAÚJO, 2010).

Assim, observando o comportamento espectral dos alvos de interesse, para a aplicação da razão, as bandas são selecionadas visando seus valores máximos e mínimos de absorbância, afim de que se expressem os gradientes da curva espectral dos objetos de interesse, proporcionando o realce destes alvos (SESTINI, 1999).

$$R = \frac{A_{\lambda >}}{A_{\lambda <}}$$

R = Razão de bandas

$A_{\lambda >}$ = absorbância no comprimento de onda maior

$A_{\lambda <}$ = absorbância no comprimento de onda menor

Pérez-Vich et al. 1998 estudando sementes de girassol concluíram que é possível obter a determinação de óleo e ácidos graxos usando espectroscopia NIR. O método foi mais preciso com sementes descascadas mas os autores consideraram preciso o suficiente para pré segregação de genótipos ressaltando o fato de ser não destrutivo, rápido, simples e preciso. Mais recente, Karn et al., 2016 trabalhando com sementes de soja em relação a determinação de óleo e ácidos graxos por espectroscopia NIR concluíram que o uso do NIR é eficiente para tal objetivo. Tais estudos são similares aos resultados desse estudo.

4.3 Fase de validação do processo NIR XDS

O terceiro conjunto de dados conteve 452 amostras com duas repetições, sendo todas elas úmidas e com zero meses de armazenamento. Este conjunto foi obtido no intuito de ser usado para validação das análises desenvolvidas com os conjuntos anteriores. Os teores de germinação (9 – 99 %) e vigor (4 – 97 %) foram verificados. Os espectros das sementes de milho referentes a este conjunto são apresentados na Figura 16.

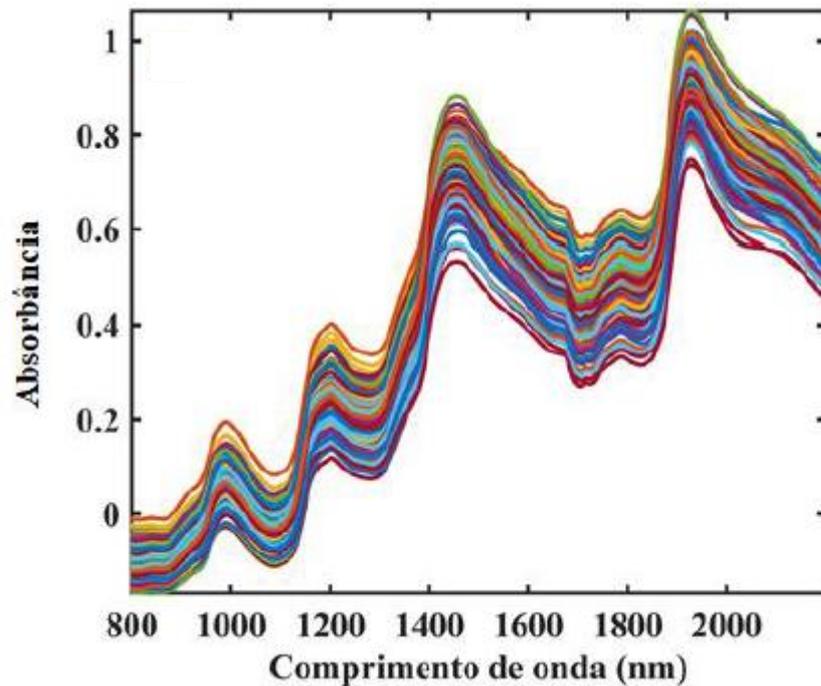


Figura 16. Espectros NIR de sementes de milho obtidas do terceiro conjunto de dados, de validação. Cada cor representa uma amostra.
Fonte: O autor.

No terceiro conjunto de dados, após a média das repetições, foram obtidas 226 amostras, sendo 225 com dados de germinação e 221 com dados de vigor. Das 225 amostras de germinação, 142 amostras (aproximadamente 63%) com germinação maior e igual a 90% e 83 amostras (aproximadamente 37%) com germinação menor que 90%. Em relação ao vigor, 104 amostras (aproximadamente 47%) apresentavam vigor maior ou igual a 85% e 117 amostras (aproximadamente 53%) com vigor menor que 85%. Na Figura 17 estão apresentados os escores do PCA com as classes de germinação e vigor definidas no terceiro conjunto de dados.

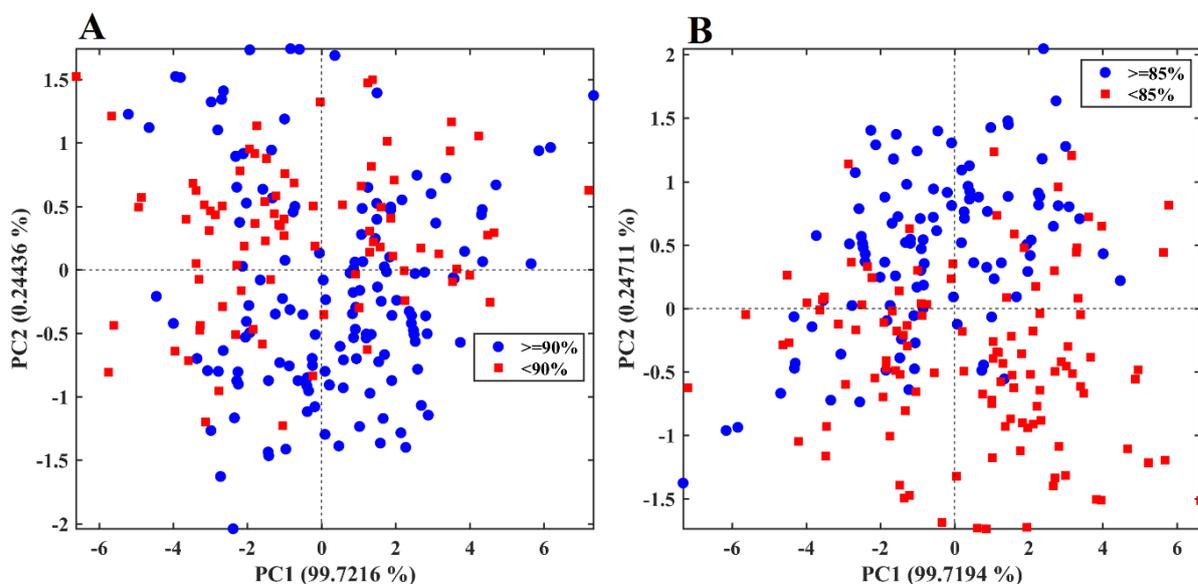


Figura 17. Escores da PCA de duas componentes principais dos dados de validação categorizados em relação à TPG – germinação (A) e RET – vigor (B).

Fonte: O autor.

Na figura acima pode-se perceber que não houve uma separação completa entre as classes, tanto de germinação quanto de vigor com os espectros NIR centrados na média. Também não foi obtida essa separação com nenhum pré-tratamento testado. Uma leve tendência de separação das classes referentes principalmente em relação ao vigor pode ser observada pela Figura 17B. Além disso, a proporção entre as classes é aceitável e pelo gráfico dos escores do PCA existe uma tendência de separação entre as classes.

Assim, neste conjunto de dados foram aplicadas duas regras para relacionar os espectros com os valores fisiológicos representados por germinação (TPG) e vigor (RET).

Regra #1 – análise de frequência por meio da classificação de germinação e vigor.

As 225 amostras de germinação e as 221 amostras de vigor foram submetidas ao método de K-means e objetivou-se agrupar as distâncias nos comprimentos de ondas para criar índices, classificações para separar os materiais estudados por tratamentos de acordo com os índices gerados pela deterioração controlada afim de se ter uma classificação por qualidade fisiológica. Foi aplicado também um método de suavização (Loess - Bonat, 2007). A Regressão Local

(Loess) é um método não paramétrico que estima curvas e superfícies através de suavização (smoothing) e foi utilizado para melhor compreensão dos picos e vales dos espectros em estudo, conforme Tabela 3 da deterioração controlada.

Foram determinados os valores de P10 e P90 e a razão de bandas (P90/P10) para a banda 2 dos espectros de cada amostra e então foram geradas classificações: “Boas” para as amostras que tiveram este índice abaixo de 1,34 e “Ruins” para as amostras que tiveram este índice acima de 1,34 (Tabela 3).

Também foram geradas as classificações de “Boas”, para as amostras que ficaram com valores de germinação $\geq 90\%$ e vigor $\geq 85\%$ e foram classificadas como “Ruins” as amostras que ficaram com os resultados fisiológicos, medidos por germinação e vigor, abaixo destes percentuais.

Foi possível relacionar a classificação do rating da banda 2 e a classificação dos resultados fisiológicos para 224 amostras com 84% de concordância entre as classes.

Regra #2 – Modelagem.

Como mencionado anteriormente, o terceiro conjunto de dados foi utilizado para a modelagem. As amostras com germinação maior ou igual a 90% foram definidas como pertencentes a uma classe e as amostras com germinação menores que 90% pertencentes a outra classe. Da mesma forma, as amostras foram divididas em duas classes em relação ao valor de 85% de vigor.

O PLS-DA (BARKER e RAYENS, 2003) é um método baseado na regressão PLS (FERREIRA et al., 1999; MIAW et al., 2018), em que a variável dependente é categórica. Este é um método de reconhecimento de padrão supervisionado que usa a matriz X de variáveis independentes, ou seja, os espectros NIR com a variável categórica Y para construir modelos de classificação. Para construção de modelos PLS-DA, é necessário um conjunto de treinamento com as classes bem definidas, além de um conjunto para validação, para que o modelo possa ser utilizado para classificação de novas amostras.

Os conjuntos completos de dados de germinação e vigor foram divididos em conjunto de treinamento e teste usando o algoritmo Kennard-Stone (KENNARD e STONE, 1969) separadamente para cada classe a fim de manter a proporcionalidade das classes. A separação dos conjuntos de treinamento e teste foi

realizada para cada classe seguindo a proporção de 70 e 30%, respectivamente. A Tabela 4 apresenta a distribuição das amostras dos conjuntos de germinação e vigor, para cada classe nos conjuntos de treinamento e teste.

O conjunto de treinamento foi utilizado para construção do modelo de classificação. O PLS-DA com validação cruzada randômica foi aplicada com divisões de 10% do conjunto de treinamento. Os modelos tanto para germinação quanto para vigor foram construídos com os espectros NIR centrados na média.

Tabela 4. Quantidade de amostras em cada classe nos conjuntos de treinamento e teste para Germinação e Vigor.

	Total	Classes	Total/Classe	Treinamento	Teste
Germinação	225	>= 90%	142	99	43
		< 90%	83	58	25
Vigor	221	>= 85%	104	73	31
		< 85%	117	82	35

Fonte: O autor.

Além de construir os modelos PLS-DA com todas os comprimentos de onda do espectro NIR, ou seja, com todas as variáveis, também foi utilizado um método de seleção de variáveis chamado “seleção dos preditores ordenados” para análise discriminante (OPSDA) (ROQUE, 2019; ROQUE et al., 2019). A seleção de variáveis é empregada a fim de melhorar a capacidade preditiva de um modelo, além de tornar o modelo interpretativo com a seleção de comprimentos de onda relacionados a uma propriedade ou característica modelada. O OPSDA é um método baseado na obtenção de um vetor informativo que contém informações sobre a localização das variáveis para melhorar a classificação. Assim, este método testa vários subconjuntos de variáveis e encontra aquele que apresenta os melhores parâmetros de classificação. Após a seleção de variáveis propriamente dita, o OPSDA constrói um modelo PLS-DA utilizando apenas as variáveis selecionadas.

O desempenho do modelo foi avaliado através dos parâmetros sensibilidade, especificidade e erro de classificação do conjunto de treinamento e teste, os quais foram calculados de acordo com as equações. (1), (2) e (3), respectivamente (ROQUE et al., 2017).

$$\text{Sensibilidade} = \frac{VP}{(VP+FN)} \quad (1)$$

$$\text{Especificidade} = \frac{VN}{(VN+FP)} \quad (2)$$

$$\text{Erro} = \frac{FP+FN}{(VP+VN+FP+FN)} \quad (3)$$

VP é verdadeiro positivo e VN é verdadeiro negativo, FN é falso negativo e FP é falso positivo. A sensibilidade ou taxa de verdadeiro positivo é a porcentagem de amostras que pertencem a classe que foram corretamente classificadas como sendo da classe. A especificidade ou taxa de verdadeiro negativo é a porcentagem de amostras que não pertencem a classe que foram corretamente classificadas como não sendo da classe. O erro de classificação é a porcentagem de amostras que foram classificadas incorretamente.

Os modelos de classificação obtidos com as variáveis selecionadas pelo OPSDA apresentaram uma melhor capacidade preditiva que aqueles construídos com todos os comprimentos de onda. Assim, os resultados apresentados a seguir foram obtidos com o OPSDA e as variáveis selecionadas para germinação e vigor conforme Figura 18 (A e B).

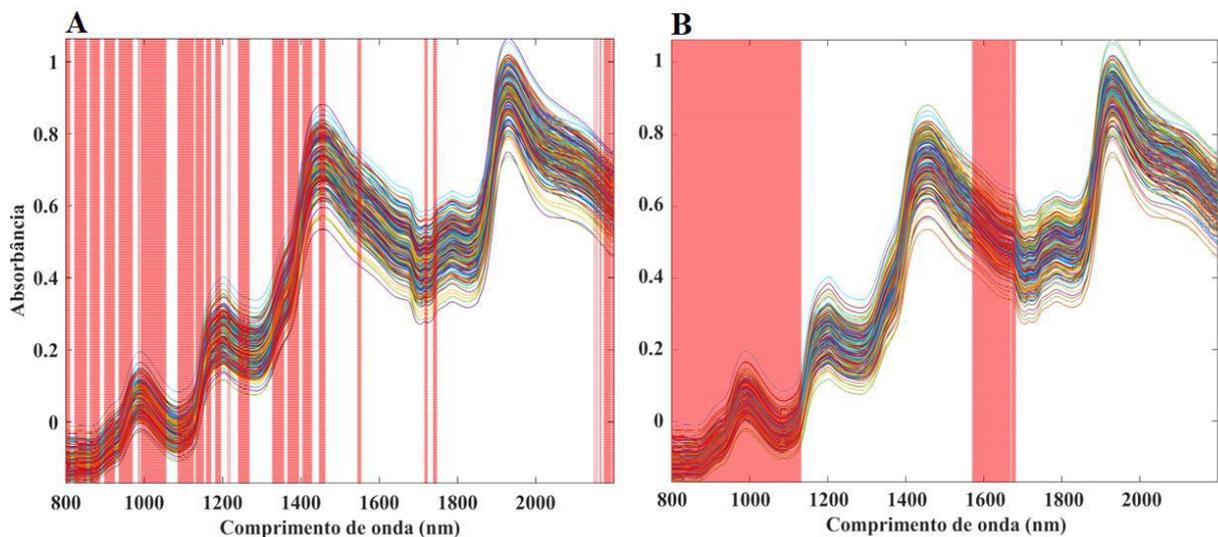


Figura 18. Variáveis selecionadas pelo método OPSDA para Germinação (A) e para Vigor (B).
Fonte: O autor.

Para germinação foram selecionadas 900 variáveis (comprimentos de ondas), sendo estas espalhadas por boa parte de todo o espectro, estando mais concentrado entre 800 e 1500 nm, com algumas pequenas faixas de seleção em maiores comprimentos de onda, como pode ser visto na Figura 18A.

Em relação a germinação Lee et al., 2017 ao usarem sementes intactas de tomate e sementes envelhecidas pelo teste de envelhecimento acelerado, conseguiram prever com precisão a viabilidade das sementes a ponto do autores concluírem que tem potencial para substituir o teste de germinação com a vantagem de ser uma técnica de avaliação não destrutiva por absorbância/reflectância NIR na faixa 400–2500 nm.

Em relação ao vigor, Figura 18B, 880 variáveis foram selecionadas sendo elas nas faixas entre 800 – 1132 nm e 1571 – 1681 nm. Os modelos construídos utilizando as variáveis selecionadas para germinação e vigor apresentaram melhor capacidade preditiva, ou seja, menor erro de classificação que os modelos com todas as variáveis. Faixas de comprimento de onda semelhantes foram encontradas no trabalho de Shrestha et al., 2017 ao estudarem viabilidade de sementes de tomate.

Na Tabela 5 são apresentados os parâmetros de avaliação do desempenho dos modelos de classificação para germinação e vigor. Os parâmetros são apresentados em valores entre 0 e 1, onde uma classificação ideal apresenta sensibilidade e especificidade 1 e erro 0.

Tabela 5. Parâmetros de avaliação dos modelos OPSDA para Germinação e Vigor em espectros NIR de sementes de milho.

Modelos OPSDA		Germinação (%)		Vigor (%)	
		15 nvls*		6 nvls*	
Classes		>= 90%	< 90%	>= 85%	< 85%
Treinamento	Sensibilidade	0,939	0,983	1,000	1,000
	Especificidade	0,983	0,939	1,000	1,000
	Erro	0,038		0,000	
Teste	Sensibilidade	0,907	0,840	1,000	0,943
	Especificidade	0,840	0,907	0,943	1,000
	Erro	0,118		0,030	

*nvls: número de variáveis latentes do PLS-DA.

Fonte: O autor.

Pela análise destes resultados, pode-se perceber que os erros tanto do conjunto de treinamento como o de teste são menores para o vigor quando comparados aos erros para germinação. No modelo de germinação, a sensibilidade

e a especificidade foram menores que 1, indicando a ocorrência de falsos negativos e falsos positivos. Considerando a classe com germinação menor ou igual a 90%, a ocorrência de falsos negativos não é um cenário preocupante, uma vez que amostras incorretamente classificadas com baixa germinação serão segregadas e beneficiadas separadamente e com maior rigor, em termos de proteção fisiológica, assim como as amostras que realmente tem germinação menor que 90%. Um cenário preocupante é com os falsos positivos, pois estes serão tratados como amostras com alta germinação, sendo que isso não é verdade. Para o modelo de vigor, o conjunto de treinamento não apresentou erros, e o conjunto teste apresentou alguns erros com o pior cenário, ou seja, falsos positivos considerando a classe de vigor maior ou igual a 85%.

Wang et al., 2020 ao estudarem detecção de vigor para sementes de milho doce com uso de espectroscopia de infravermelho próximo (NIRS), conseguiram classificar as sementes em sementes envelhecidas (germinação 3%-6%) de sementes não envelhecidas, com precisão de 98% da técnica. Bem como, Kandpal et al., 2016 conseguiram separar sementes de melão viáveis de não viáveis pela técnica não destrutiva NIR. Kusumaningrum et al., 2018 afirmaram que é possível avaliar de maneira rápida e não destrutiva a viabilidade de sementes de soja pelo NIR. O que reitera o fato de que método proposta neste estudo é mais discriminatório. Em contrapartida, Agelet et al., 2012 não conseguiram separar sementes viáveis de não viáveis para as culturas de soja e milho, utilizando o NIR.

Na Figura 19 são apresentados os gráficos com os valores de Y preditos pelos modelos OPSDA para germinação e vigor. Durante a construção dos modelos OPSDA o limite de discriminação entre as classes é determinado através de uma função de densidade de probabilidade normal, na qual valores de Y acima do valor limite de discriminação são considerados pertencentes a classe em análise, e valores abaixo não pertencem àquela classe.

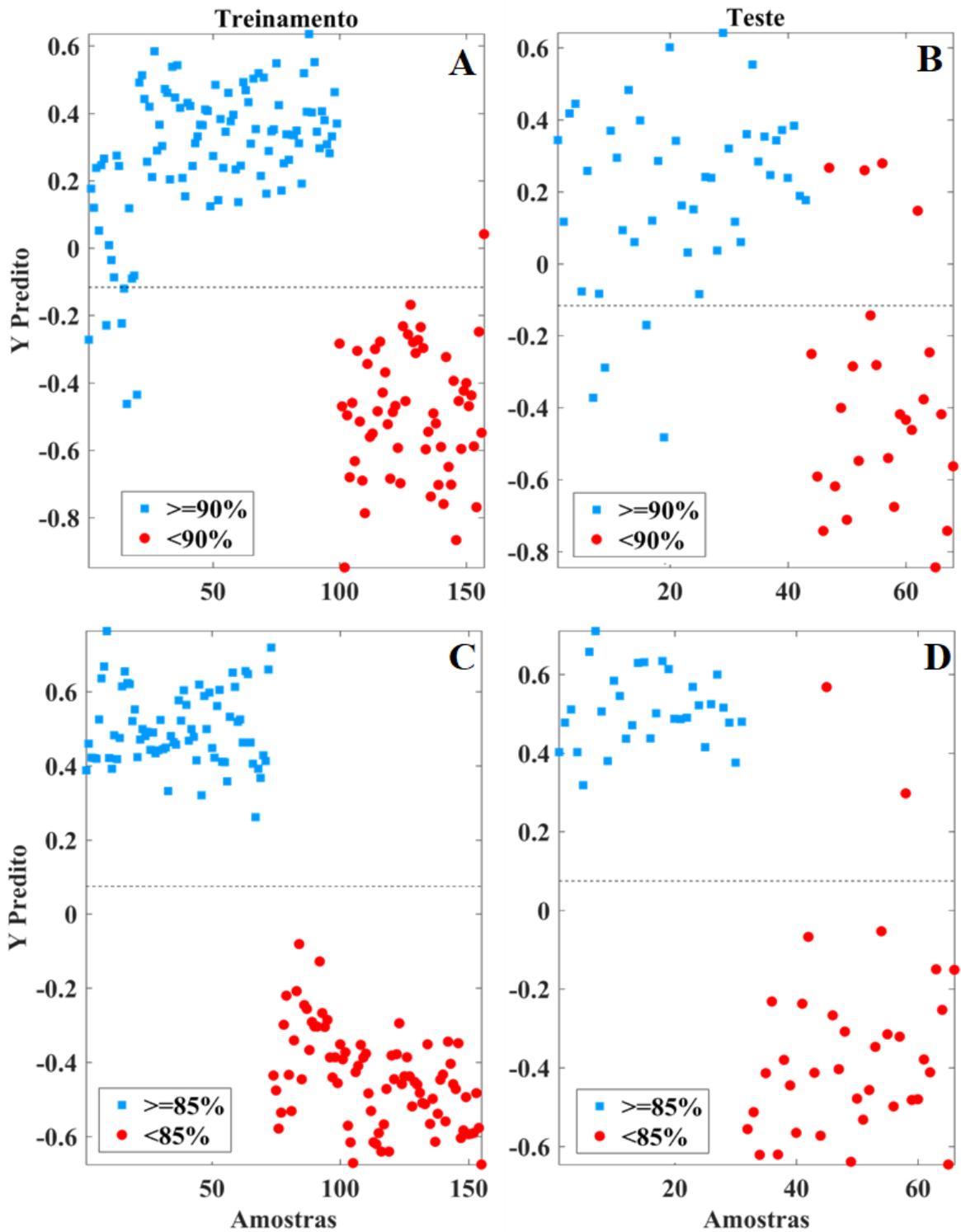


Figura 19. Valores de Y preditos para os conjuntos de treinamentos (A e C) e testes (B e D) dos modelos OPSDA para Germinação (A e B) e para Vigor (C e D). A linha horizontal tracejada é o limite de discriminação das classes.

Fonte: O autor.

Nas Figuras 19A e 19B referentes a germinação pode-se perceber os falsos negativos e falsos positivos no conjunto de treinamento e teste, respectivamente, como mencionado anteriormente. Na Figura 19C, referente ao vigor, o resultado da classificação é ideal com 100% de acerto. No entanto, na Figura 19D, referente ao conjunto teste do modelo do vigor, nota-se alguns falsos positivos.

A partir dos resultados apresentados, os modelos OPSDA apresentam alta acurácia (Acurácia = 1 – Erro), ou seja, porcentagem de acertos do modelo, sendo de 0,962 (96,2%) e 0,882 (88,2%) nos conjuntos de treinamento e teste, respectivamente, para a germinação. Para o vigor a acurácia foi ainda maior, sendo de 100% para o conjunto de treinamento e de 97% para o teste. Dessa forma, estes modelos OPSDA baseados em espectros NIR podem ser utilizados de forma rápida para tomada de decisão sobre as amostras de semente de milho, considerando uma classificação binária para os parâmetros de Germinação e Vigor de acordo com os valores de aprovação e reprovação de lotes utilizados pela empresa.

He et al., 2019 avaliando a imagem hiperespectral no infravermelho próximo (NIR-HSI) combinada com vários métodos de pré-processamento de dados e modelos de classificação para identificar a vitalidade das sementes de arroz avaliadas em anos distintos, concluíram que a técnica NIR-HSI tem grande potencial para identificar vitalidade e vigor de sementes de arroz com alta precisão de classificação de 93,67%.

Qin et al., 2016, objetivando usar a série MicroNIR-1700 de espectrômetro de infravermelho em miniatura para identificação de grãos de milho haploide notaram que os espectros de transmitância difusa do infravermelho próximo analisam amostras não uniformes e todas as informações do interior da amostra podem ser obtidas, de modo que os espectros de transmitância possam identificar o milho haploide de forma eficaz e ser dessensibilizados às posições do kernel, sendo assim os autores predizem que as técnicas de análise qualitativa NIRs como recursos de análise rápida e não destrutiva podem identificar a varredura do espectrômetro haploide e Micro-NIR com rapidez e custo menor.

5 CONCLUSÕES

Espectros gerados por equipamento NIR XDS podem ser utilizados de forma rápida para tomadas de decisão sobre as amostras de semente de milho, considerando uma classificação binária para os parâmetros de Germinação e Vigor de acordo com os valores de aprovação e reprovação de lotes considerados neste estudo.

REFERÊNCIAS

- AGELET, L. E. *et al.* Feasibility of near infrared spectroscopy for analyzing corn kernel damage and viability of soybean and corn kernels. **Journal of Cereal Science**, v. 55, n. 2, p. 160-165, 2012.
- AGRESTI, A. **Categorical data analysis**. 3. ed.. Hoboken: Wiley-Interscience, 2013.
- ALEXANDER, D. E. *et al.* Analysis of oil content of maize by Wide-line NMR. **Journal of the American Oil Chemists Society**, Chicago, v. 44, n. 10, p. 555-558, 1967.
- BARKER, M.; E RAYENS, W. Partial least squares for discrimination. **Journal of Chemometrics**, n. 17, v. 3, p. 166–173, 2003.
- BAYE, T. M., PEARSON, T. C., E SETTLES, A. M. Development of a calibration to predict maize seed composition using single kernel near infrared spectroscopy. **Journal of Cereal Science**, v. 43, n. 2, p. 236-243, 2006.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Mapa/ACS, 2009. 399p.
- BRO, R.; SMILDE, A. K. Principal component analysis. **Anal. Methods**, v. 6, n. 9, p. 2812–2831, 2014.
- CHENG, S. *et al.* Detection of germination rate of tomato seeds by electronic nose. **Transactions of the CSAE**, v. 27, n. 12, p. 132–135, 2011.
- CONCEIÇÃO, F. R.; MOREIRA, A. N.; BINSFELD, P. C. **Detecção e quantificação de organismos geneticamente modificados em alimentos e ingredientes alimentares**. Ciência Rural, Santa Maria, v. 36, n. 1, p. 315-324, 2006.
- DUDLEY, J. W. *et al.* Near-infrared reflectance measurement of protein and oil concentration in corn, soybean, and oat seed. *In*: HILL, L. D. (Ed.). **Quality in world markets**. Saddle River: Corn Quality in World Markets, 1975. p. 205-210.

DYER, D. J. Analysis of oilseeds and coarse grains. In: ROBERTS, C. A.; WORKMAN, J.; REEVES III, J. B. **Near-Infrared spectroscopy in agriculture**. Madison: IM Publishing, 2004. (Agronomy Monograph, 44).

DYER, D. J.; FENG, P. Near infrared applications in development of genetically altered grains. In: DAVIS, A. M. C.; WILLIAMS, P. (Ed.). **Near infrared spectroscopy: the future waves**. Chichester: NIR Publications, 1996. p. 490-493.

DYER, D. J.; FENG, P. **NIR destined to be major analytical influence**. Feedstuffs, p. 16-15, nov. 1997.

FERREIRA, M. M. C. *et al.* Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**, v. 22, n. 5, p. 724–731, 1999.

GELADI, P. *et al.* Chemometrics in spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 59, n. 9, p. 1347–1357, 2004.

GREENE, R. Y. *et al.* Detection of fungal contamination in corn: potential of FTIR-PAS and –DRS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 40, n. 7, p. 1144-1149, jul. 1992.

GRUNVALD, A. K. *et al.* Curva de calibração para predição do teor de óleo pela análise do espectrômetro de infravermelho próximo (NIR) em ensaios de competição de cultivares de girassol no Brasil. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DO GIRASSOL, 18.; SIMPÓSIO SOBRE A CULTURA DO GIRASSOL, 6., 2009, Pelotas. **Anais** [...]. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2009. p. 51-58.

GUTKOSKI, L. C. *et al.* Avaliação da composição química de milho seco e armazenado em silo tipo alambrado com ar natural forçado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 4, p. 879-885, 2009.

HART, J. R.; NORRIS, K. H.; GOLUMBIC, C. Determination of the moisture content of seeds by near-infrared spectrophotometry of their methanol extracts. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 39, p. 94-99, 1962.

HE, X. *et al.* Rapid and nondestructive measurement of rice seed vitality of different years using near-infrared hyperspectral imaging. **Molecules**, v. 24, n. 12, p. 2227, 2019.

HILLIARD, J. H.; DAYNARD, T. B. Measurement of protein and oil in grains and soybeans with reflected near-infrared light. **Canadian Institute of Food Science and Technology**, Ottawa, v. 9, n. 1, p. 11-14, jan. 1976.

JIANG, H. Y. *et al.* Analysis of protein, starch and oil content of single intact kernels by near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) in maize (*Zea mays* L.). **Plant breeding**, v. 126, n. 5, p. 492-497, 2007.

KANDPAL, L. M. *et al.* Near-infrared hyperspectral imaging system coupled with multivariate methods to predict viability and vigor in muskmelon seeds. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 229, p. 534-544, 2016.

KARN, A. *et al.* Development of rigorous fatty acid near-infrared spectroscopy quantitation methods in support of soybean oil improvement. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 94, n. 1, p. 69-76, 2017.

KENNARD, R. W.; STONE, L. A. Computer aided design of experiments. **Technometrics**, v. 11, n. 1, p. 137-148, 1969.

KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA-NETO, J. B. **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999, 218p.

KUSUMANINGRUM, D. *et al.* Non-destructive technique for determining the viability of soybean (*Glycine max*) seeds using FT-NIR spectroscopy. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, n. 5, p. 1734-1742, 2018.

LEE, H. S. *et al.* Large-scale screening of intact tomato seeds for viability using near infrared reflectance spectroscopy (NIRS). **Sustainability**, v. 9, n. 4, p. 618, 2017.

MCCLURE, W. F. 204 years of near infrared technology: 1800-2003. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, v. 11, n. 6, p. 487-518, 2003.

MIAW, C. S. W. *et al.* Determination of main fruits in adulterated nectars by ATR-FTIR spectroscopy combined with multivariate calibration and variable selection methods. **Food Chemistry**, v. 254, p. 272-280, 2018.

MITTELMANN, A. *et al.* Análise dialéctica do teor de óleo em milho. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 12, n. 2, p. 139-143, abr./jun. 2006.

OLESEN, M. H. *et al.* Classification of Viable and Non-Viable Spinach (*Spinacia Oleracea* L.) Seeds by Single Seed near Infrared Spectroscopy and Extended Canonical Variates Analysis. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, United Kingdom, v. 19, p. 171-180, 2011.

PASQUINI, C. Near Infrared Spectroscopy: fundamentals, practical aspects and analytical applications. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 2, p., 198-219, 2003.

PÉREZ-VICH, B.; VELASCO, L.; FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, J. M. Determination of seed oil content and fatty acid composition in sunflower through the analysis of intact seeds, husked seeds, meal and oil by near-infrared reflectance spectroscopy. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 75, n. 5, p. 547-555, 1998.

POMERANS, Y. *et al.* Corn hardness determination. **Cereal and Chemistry**, Saint Paul, v. 61, n. 2, p. 147-150, 1984.

QIN, H. *et al.* Identification of haploid maize kernel using nir spectroscopy in reflectance and transmittance modes: a comparative study. **Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi**, v. 36, n. 1, p. 292-297, 2016.

ROQUE, J. V.; DIAS, L. A. S.; E TEÓFILO, R. F. Multivariate Calibration to Determine Phorbol Esters in Seeds of *Jatropha curcas* L. Using Near Infrared and Ultraviolet Spectroscopies. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 8, p. 1506–1516, 2017.

ROQUE, J. V. **New features of ordered predictors selection for multivariate regression and classification**. 2019. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, 2019.

ROQUE, J. V. *et al.* Comprehensive new approaches for variable selection using ordered predictors selection. **Analytica Chimica Acta**, v. 1075, 2019.

SARMENTO, H. G. S. *et al.* Determinação do teor de água em sementes de milho, feijão e pinhão-manso por métodos alternativos. **Revista Energia na Agricultura**, v. 30, n. 3, p. 249-256, 2015.

SHRESTHA, S.; DELEURAN, L. C.; GISLUM, R. Separation of viable and non-viable tomato (*Solanum lycopersicum* L.) seeds using single seed near-infrared spectroscopy. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 142, p. 348-355, 2017.

SHRESTHA, S.; DELEURAN, L.C.; GISLUM, R. Separation of viable and non-viable tomato (*Solanum lycopersicum* L.) seeds using single seed near-infrared spectroscopy. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 142, p. 348–355, 2017.

SILVA, C. F. L. *et al.* Near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) to assess protein and lipid contents in *Avena sativa* L. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 8, p. 127-133, feb. 2008.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Spectrometric identification of organic compounds**. 6. ed. New York: John Wiley e Sons, 1998. 464 p.

SISKA, J.; HURBURGH, C. R. Corn density measurement by near infrared transmittance. **Transactions ASAE**, Oxford, v. 38, p. 1821-1824, 1996.

SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R.; HOLLER, F. J. **Princípios da análise instrumental aplicada**. 6. ed. Porto Alegre: Bookman, 2009.

WANG, Y. *et al.* Feasibility analysis of NIR for detecting sweet corn seeds vigor. **Journal of Cereal Science**, v. 93, 2020.

WILLIAMS, P. C. The application of the Neotec grain quality analyzer to the analyses of cereal grains and oilseeds I: preliminary observations. **Cereal Science Today**, Minneapolis, v. 18, p. 284, 1973.

WILSON, J. M.; KRAMER, A.; BEN-JERA, I. Quantitative determination of fat, protein and carbohydrates of soy products with infrared attenuated total reflectance. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 38, n. 1, p. 14-17, jan. 1973.

WORKMAN, J.; WEYER, L. **Practical Guide to Interpretive Near-Infrared Spectroscopy**. CRC Press, 2007. Disponível em:
<https://books.google.com.br/books?id=TJZYWo7gUN8C>.

CAPÍTULO 2

Classificação de lotes de sementes de milho por ressonância nuclear magnética.

RESUMO

Classificação de lotes de sementes de milho por ressonância nuclear magnética.

O emprego da ressonância magnética nuclear na determinação de componentes químicos em sementes apresenta inúmeras vantagens por ser uma análise rápida, não-destrutiva e robusta. Sendo assim, a presente pesquisa objetivou estabelecer relações entre o método não destrutivo de ressonância magnética nuclear e o teor de óleo das sementes de milho de modo a permitir o conhecimento do teor de óleo por meio indireto e não destrutivo e relacionar com valores fisiológicos. O experimento foi realizado na Bayer Brasil, Uberlândia-MG. Foram coletadas em três vezes na semana na recepção da Unidade de Beneficiamento 228 amostras de milho em espiga, durante três safras, com umidade de colheita entre 25% e 36%. Foram analisadas pelo equipamento Minispec 33g de cada amostra utilizando os modelos de calibração obtidos previamente nessa pesquisa e o restante das amostras foram acondicionadas em sacos de papel multifoliado com identificação. Parte das amostras foram encaminhadas para avaliação do teor de óleo e matéria seca e umidade em instituição de referência. A qualidade fisiológica foi avaliada por meio do teste padrão de germinação (TPG) e pela protrusão da raiz primária (RET). Foram feitas análises de regressão entre os valores obtidos pelo equipamento e os valores de referência para teor de óleo, matéria seca e umidade para obtenção dos modelos. E para as demais variáveis utilizou-se as técnicas de componentes principais, gráficos de dispersão, estimativas de correlação linear simples e canônica. Para a matéria seca foi obtida uma correlação de 96% entre os valores de referência e os valores preditos pelo equipamento, que representa uma boa assertividade do equipamento. Verifica-se que as correlações canônicas foram de baixa magnitude e apresentaram-se não significativas. Por meio do equipamento Minispec foi possível obter resultados válidos para a determinação de matéria seca, teor de óleo e umidade. Foi observada uma relação entre matéria seca e valores de germinação e vigor, porém não possibilitam, com uma sensibilidade suficiente, uma classificação dos lotes a partir de leituras de matéria seca no equipamento de ressonância magnética.

Palavras-chave: matéria seca; UBS; *Zea mays*, lipídeos, NMR.

ABSTRACT

Classification of corn seed lots by nuclear magnetic resonance.

The use of nuclear magnetic resonance in the determination of chemical components in seeds has numerous advantages for being a fast, non-destructive and robust analysis. Thus, the present research aimed to establish relationships between the non-destructive method of nuclear magnetic resonance and the oil content of corn seeds in order to allow the knowledge of the oil content through indirect and non-destructive means and correlate with physiological determinations. The experiment was carried out at Bayer Brasil, Uberlândia-MG. 228 samples of corn on the cob were collected three times a week at the reception of the Processing Unit, with harvest moisture between 25% and 36%. 33g of each sample were analyzed by the Minispec equipment using the calibration models previously obtained in this research and the rest of the samples were packed in a paper bags with identification. Part of the samples were sent for evaluation of oil and dry matter and moisture content in a reference institution. Physiological quality was assessed using the standard germination test (WPG) and primary root protrusion (RET). Regression analyzes were performed between the values obtained by the equipment and the SENAI reference values for oil content, dry matter and moisture to obtain the models. And for the other variables, the techniques of principal components, scatter plots, simple linear and canonical correlation estimates were used. For dry matter, a correlation of 96% was obtained between the reference values and the values predicted by the equipment, which represents a good assertiveness of the equipment. The canonical correlations were of low magnitude and not significant. Through the Minispec equipment, it was possible to obtain valid results for the determination of dry matter, oil content and moisture. A relationship between dry matter and germination and vigor values was observed, but they do not allow, with sufficient sensitivity, a classification of lots from dry matter readings in the magnetic resonance equipment.

Keywords: dry matter; moisture; *Zea mays*, oil content, NMR.

1 INTRODUÇÃO

A ressonância nuclear magnética teve seu uso na detecção do teor de óleo em milho através de trabalhos inicialmente desenvolvidos por ALEXANDER et al., (1967). A técnica tornou-se largamente utilizada no melhoramento do milho alto óleo e tem sido utilizada em vários trabalhos como instrumento para a determinação do percentual de óleo, preservando a integridade da amostra ou grão analisado, revelando-se mais exata e precisa que a técnica NIR principalmente na análise de um grão de milho (DYER, 2004; SONG et al., 2004).

Ressonância Nuclear Magnética – NMR, é um fenômeno que ocorre quando o núcleo de certos átomos são imersos em um campo magnético e expostos a um segundo campo magnético oscilatório. Alguns núcleos expressam este fenômeno outros não, depende se eles possuem ou não uma propriedade chamada spin que emite uma radiação eletromagnética. Somente aqueles átomos que possuem número ímpar de prótons e/ou nêutrons serão capazes de produzir um sinal em NMR. Embora uma variedade de mais de 300 diferentes tipos de núcleos possuam momento angular, apenas um seletivo grupo tem utilidade na biologia dentre esses: hidrogênio, carbono, sódio, fósforo e flúor.

De todos os átomos, o hidrogênio é o mais simples, pois ele possui apenas um próton. Além de sua abundância nos sistemas biológicos, o hidrogênio é altamente magnético, o que o torna extremamente sensível a NMR. Outros núcleos também podem gerar imagens em NMR, porém possuem imagens mais pobres comparadas às do hidrogênio.

A quimiometria é o campo da química que utiliza ferramentas estatísticas e matemáticas para o planejamento e otimização das condições experimentais e para extração de informação química relevante de dados químicos multivariados. Tornase uma ferramenta valiosa para retirar as informações contidas nos sinais eletromagnéticos permitindo a identificação e a quantificação de diversos parâmetros em diferentes matrizes (SOUZA, et al., 2013).

A medida de umidade em produtos agrícolas e alimentos é a principal aplicação da RMN de baixa resolução. O conhecimento do teor de água é usado para cálculo de matéria seca do produto e também é usada para avaliar a

probabilidade de deterioração ou contaminação de produtos agrícolas/alimentos por microorganismos patogênicos ou não.

A metodologia clássica de determinação do teor de óleo em sementes e grãos consiste em secá-los até peso constante, moagem até pó bem fino, extração exaustiva com solventes orgânicos em extratores soxhlet e evaporação do solvente até peso constante. Nesse método, o óleo é considerado como o material solúvel no solvente e não apenas os triglicerídeos. Esse é um processo demorado e que destrói as amostras analisadas. A ressonância magnética nuclear (RMN) tem sido um método alternativo a essa medida, apresentando as seguintes vantagens: rapidez da análise (segundos), não destrói a amostra (a análise pode ser repetida na mesma amostra), não precisa de preparação sofisticada, o que pode prescindir o uso de produtos químicos adicionais, as análises podem ser realizadas em tecidos vegetais in vivo (o que permite usar as próprias sementes analisadas em projetos de melhoramento genético) e os resultados da análise podem ser coletados, processados e armazenados diretamente em microcomputador (COLNAGO, 1996).

O emprego da ressonância magnética nuclear na determinação de componentes químicos em sementes apresenta inúmeras vantagens por ser uma análise rápida, não-destrutiva e robusta, além de requerer pouca manutenção e pouco treinamento, não possuir fonte de radiação ionizante, dispensar o emprego de solventes e pode-se determinar simultaneamente vários componentes.

Sendo assim, a presente pesquisa objetivou estabelecer relações entre o método não destrutivo de ressonância magnética nuclear e o teor de óleo das sementes de milho de modo a permitir o conhecimento do teor de óleo por meio indireto e não destrutivo e relacioná-lo com germinação e vigor para predizer a qualidade fisiológica das sementes testadas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Condução do experimento RNM

O experimento foi conduzido na Bayer do Brasil em Uberlândia - MG, na Planta Piloto da área de Pesquisa de Produção.

Foram utilizadas espigas de milho das safras Inverno 2019, Verão 2020, Inverno 2020 e Verão 2021, com umidade de colheita entre 25% e 36%.

2.1.1 Fase de estudo para estimativas dos modelos de determinação de óleo, matéria seca e umidade nas sementes

O analisador Minispec TD-NMR Mq10, conforme Figura 20, fornece uma abordagem espectroscópica, mas difere das técnicas quimiométricas: a calibração é muito simples e robusta.



Figura 20. Equipamento Minispec TD-NMR Mq10, instalado na Planta Experimental da Bayer de Uberlândia – MG.
Fonte: O autor.

O equipamento da marca Bruker possui sistema de 10 MHz, inclui tubos e blocos de alumínio. A preparação da amostra consiste em definir a porção de sementes ideal para a análise em tubo de vidro. Foram necessários aproximadamente 4 cm de altura do tubo preenchidos com sementes inteiras, aproximadamente 33 g de sementes. As etapas da análise são: enchimento do tubo com a amostra, registro do peso e inserção do tubo com a amostra no equipamento Minispec. Esta etapa foi realizada com balança ligada diretamente ao equipamento, o que minimizou a possibilidade de erros de digitação. Existem rotinas de verificação diária, que iniciam uma série automatizada de testes do sistema. Os testes de instrumentos aprovados com sucesso garantem que o sistema esteja em

conformidade com os regulamentos internacionais de BPL (Boas Práticas Laboratoriais).

O espectrômetro Minispec TD-NMR Mq10 permitiu a determinação simultânea de óleo, matéria seca e umidade em sementes de milho úmidas.

A calibração foi realizada com 60 amostras, sendo 30 amostras úmidas e 30 amostras secas. Cada amostra foi dividida em duas partes: uma parte foi passada pelo equipamento ainda úmida e outra parte foi processada, passada pelo secador e tratadas para a obtenção de amostras secas. As amostras úmidas que foram passadas pelo equipamento, logo após foram enviadas ao SENAI (análises de referência) e mais 30 amostras dos mesmos lotes que foram processadas (secas e tratadas) também foram enviadas ao SENAI para obtermos os valores de referência de umidade, determinação de matéria seca e óleo pelo método de extração.

Uma vez que obtivemos os resultados do equipamento Minispec TD-NMR Mq10 e inserimos os valores de referência do SENAI foi possível construir um modelo de calibração para cada item analisado para as sementes.

Parte destas amostras úmidas, já debulhadas, foram processadas em planta experimental, secas, passadas novamente pelo equipamento, foram acondicionadas em sacos de papel multifoliado com identificação, enviadas ao LAS Bayer (Laboratório de Análises de Sementes) na mesma planta de Uberlândia – MG, para análise de TPG (Teste Padrão de Germinação), segundo RAS (Regras para Análises de Sementes), (BRASIL, 2009) e RET – protrusão da raiz primária como teste de vigor, sendo este de metodologia própria, desenvolvida pela Bayer.

2.1.2 Fase de análise da relação dos componentes espectrocópicos com aspectos fisiológicos das sementes

Muitas amostras de sementes (~300) foram preparadas para passagem pelo equipamento, estas foram retiradas diretamente dos caminhões que chegaram com matéria prima bruta do campo de produção. Foram colhidos vários híbridos, em diferentes umidades de colheita (25%-36%). Cada amostra coletada foi identificada com etiqueta específica utilizada nos ensaios de pesquisa de produção da Bayer. Foram levadas à planta piloto, imediatamente despalhadas e debulhadas

manualmente (úmidas). Foram passadas pelo equipamento Minispec 33g de cada amostra utilizando os modelos de calibração obtidos previamente e o restante das amostras foram acondicionadas em sacos de papel multifoliado com identificação, enviadas ao LAS Bayer (Laboratório de Análises de Sementes) na mesma planta de Uberlândia – MG, para análise de TPG (Teste Padrão de Germinação), segundo RAS (Regras para Análises de Sementes) (BRASIL, 2009) e RET – protrusão da raiz primária como teste de vigor, sendo este de metodologia própria, desenvolvida pela Bayer (Bayer legacy).

Os resultados de teor de óleo e matéria seca obtidos pelo Minispec foram comparados com os resultados do TPG e RET obtidos no LAS da Bayer. Foi feita uma comparação entre os resultados fisiológicos obtidos no LAS Bayer e os resultados dos spins do equipamento para lipídeos e matéria seca.

3 Análise estatística

Foram feitas análises de regressão entre os valores obtidos pelo equipamento e os valores de referência determinados para cada amostra pelo SENAI para teor de óleo, matéria seca e umidade para obtenção dos modelos. Para verificar se alguma das variáveis analisadas por meio do equipamento no laboratório, pudesse ter relações com aspectos fisiológicos testados por germinação e vigor utilizou-se as técnicas de componentes principais, gráficos de dispersão, estimativas de correlação linear simples e canônica. Na correlação canônica, comparou-se os grupos de variáveis fisiológicas (germinação e vigor) com o grupo de variáveis obtidas pelo equipamento.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Fase de geração dos modelos de óleo, matéria seca e umidade

Na Tabela 6 podemos ver os resultados de cada amostra úmida e seca que foi enviada para o SENAI, os valores de referência de óleo, matéria seca e umidade, em percentual e em gramas e os resultados de germinação e vigor em percentual.

Tabela 6. Resultados de óleo, massa seca e umidade, em % e em g, de amostras úmidas e secas enviadas ao SENAI e resultados de germinação e vigor em %, de amostras secas, enviadas ao laboratório de análises de sementes da Bayer de Uberlândia.

Sample Name	Característica	Híbrido	massa (g)	Umidade (%)	Teor de óleo (%)	Massa Seca (%)	Germinação %	Vigor %	Umidade (g)	Teor de óleo (g)	Massa Seca (g)
3819-PTU-U	Umido	O	33,025	30,15	2,75	69,80	88	84	9,957	0,908	23,051
4089-PTU-U	Umido	L	33,318	22,34	3,90	77,60	92	84	7,443	1,299	25,855
4221-PTU-U	Umido	K	33,379	33,37	2,31	66,60	92	86	11,139	0,771	22,230
4264-PTU-S	Umido	H	33,226	32,48	2,49	67,50	96	92	10,792	0,827	22,428
3413-PTU-U	Umido	D	32,936	28,58	3,28	71,40	96	92	9,413	1,080	23,516
3993-PTU-U	Umido	H	33,970	25,89	2,45	74,11	98	96	8,795	0,832	25,175
3994-PTU-U	Umido	H	33,185	26,02	2,61	73,98	96	94	8,635	0,866	24,550
4239-PTU-U	Umido	J	33,167	26,94	3,11	73,00	97	95	8,935	1,031	24,212
4341-PTU-S	Umido	J	33,129	24,16	3,62	75,80	91	85	8,004	1,199	25,112
4348-PTU-S	Umido	G	33,104	31,61	2,59	68,30	94	88	10,464	0,857	22,610
4350-PTU-S	Umido	G	33,118	34,09	2,61	65,90	93	89	11,290	0,864	21,825
4705-PTU-S	Umido	H	33,360	24,85	2,14	75,10	93	90	8,290	0,714	25,053
4501-PTU-S	Umido	F	33,128	30,00	3,37	70,00	95	91	9,938	1,116	23,190
4869-PTU-S	Umido	H	33,218	25,71	2,34	74,20	90	85	8,540	0,777	24,648
4032-PTU-U	Umido	D	33,206	30,38	2,84	69,60	95	91	10,088	0,943	23,111
4250-PTU-S	Umido	J	33,238	28,20	3,57	71,80	87	82	9,373	1,187	23,865
4420-PTU-S	Umido	B	33,247	31,30	2,97	68,70	95	92	10,406	0,987	22,841
4424-PTU-S	Umido	B	33,478	33,37	2,94	66,60	96	93	11,172	0,984	22,296
4702-PTU-S	Umido	M	33,083	28,38	2,74	71,62	97	95	9,389	0,906	23,694
4704-PTU-S	Umido	P	33,081	31,17	1,43	68,83	96	94	10,311	0,473	22,770
4850-PTU-S	Umido	E	33,167	30,11	3,10	69,89	96	94	9,987	1,028	23,180
4851-PTU-S	Umido	E	33,334	28,72	2,54	71,28	98	96	9,574	0,847	23,760
4996-PTU-S	Umido	H	33,098	30,67	2,12	69,33	97	95	10,151	0,702	22,947
5030-UDI-S	Umido	H	33,095	36,91	2,18	63,09	93	90	12,215	0,721	20,880
5146-UDI-S	Umido	C	33,248	28,41	3,18	71,59	93	87	9,446	1,057	23,802
5181-UDI-S	Umido	N	33,111	31,45	2,92	68,55	94	91	10,413	0,967	22,698
4628-PTU-S	Umido	I	33,293	34,18	2,02	65,82	90	87	11,380	0,673	21,913
4772-PTU-S	Umido	F	33,040	30,20	3,55	69,80	94	91	9,978	1,173	23,062
4775-PTU-S	Umido	F	33,158	31,71	3,65	68,29	93	88	10,514	1,210	22,644
4942-PTU-S	Umido	A	33,143	22,62	3,01	77,38	94	89	7,497	0,998	25,646

3819-PTU-S	Seco	O	33,325	10,16	3,44	89,84	88	84	3,386	1,146	29,939
3993-PTU-S	Seco	H	33,484	9,05	2,43	90,95	98	96	3,030	0,814	30,454
4089-PTU-S	Seco	L	33,150	10,93	3,26	89,07	92	84	3,623	1,081	29,527
4221-PTU-S	Seco	K	33,295	11,06	3,45	88,94	92	86	3,682	1,149	29,613
4264-PTU-U	Seco	H	33,184	11,79	3,34	88,21	96	92	3,912	1,108	29,272
3413-PTU-S	Seco	D	33,084	9,20	3,67	90,80	96	92	3,044	1,214	30,040
3994-PTU-S	Seco	H	33,010	9,47	2,75	90,53	96	94	3,126	0,908	29,884
4239-PTU-U	Seco	J	33,200	9,09	4,15	90,91	97	95	3,018	1,378	30,182
4341-PTU-U	Seco	J	33,160	9,25	3,59	90,75	91	85	3,067	1,190	30,093
4705-PTU-U	Seco	H	33,077	9,33	2,53	90,67	93	90	3,086	0,837	29,991
4032-PTU-S	Seco	D	33,054	9,54	3,61	90,46	95	91	3,153	1,193	29,901
4348-PTU-U	Seco	G	33,005	9,19	2,48	90,81	94	88	3,033	0,819	29,972
4350-PTU-U	Seco	G	33,024	10,69	2,73	89,31	93	89	3,530	0,902	29,494
4501-PTU-U	Seco	F	33,217	10,54	4,34	89,46	95	91	3,501	1,442	29,716
4869-PTU-U	Seco	H	33,036	10,11	2,19	89,89	90	85	3,340	0,723	29,696
4250-PTU-U	Seco	J	33,027	9,28	4,14	90,72	87	82	3,065	1,367	29,962
4420-PTU-U	Seco	B	33,690	9,82	3,81	90,18	95	92	3,308	1,284	30,382
4424-PTU-U	Seco	B	33,186	10,23	4,15	89,77	96	93	3,395	1,377	29,791
4702-PTU-U	Seco	M	33,057	11,38	4,62	88,62	97	95	3,762	1,527	29,295
4850-PTU-U	Seco	E	33,170	11,61	4,61	88,39	96	94	3,851	1,529	29,319
4704-PTU-U	Seco	P	33,136	10,73	4,08	89,27	96	94	3,555	1,352	29,581
4851-PTU-U	Seco	E	33,276	11,32	4,18	88,68	98	96	3,767	1,391	29,509
4996-PTU-U	Seco	H	33,198	11,88	3,04	88,12	97	95	3,944	1,009	29,254
5030-UDI-U	Seco	H	33,290	15,82	2,90	84,18	93	90	5,266	0,965	28,024
5146-UDI-U	Seco	C	33,077	14,90	3,57	85,10	93	87	4,928	1,181	28,149
4628-PTU-U	Seco	I	33,021	12,16	3,34	87,84	90	87	4,015	1,103	29,006
4772-PTU-U	Seco	F	33,178	12,37	4,29	87,63	94	91	4,104	1,423	29,074
4775-PTU-U	Seco	F	33,325	12,51	4,83	87,49	93	88	4,169	1,610	29,156
4942-PTU-U	Seco	A	33,147	11,28	3,58	88,72	94	89	3,739	1,187	29,408
5181-UDI-U	Seco	N	33,144	14,17	4,03	85,83	94	91	4,697	1,336	28,447

Fonte: O autor.

O equipamento analisa cada amostra passada considerando a intensidade do sinal versus o tempo de decaimento: T1 é a relaxação longitudinal e T2 é a relaxação transversal (mais usada). Em geral o tempo de relaxação T2, de amostras sólidas é menor que de amostras líquidas (Figura 21).

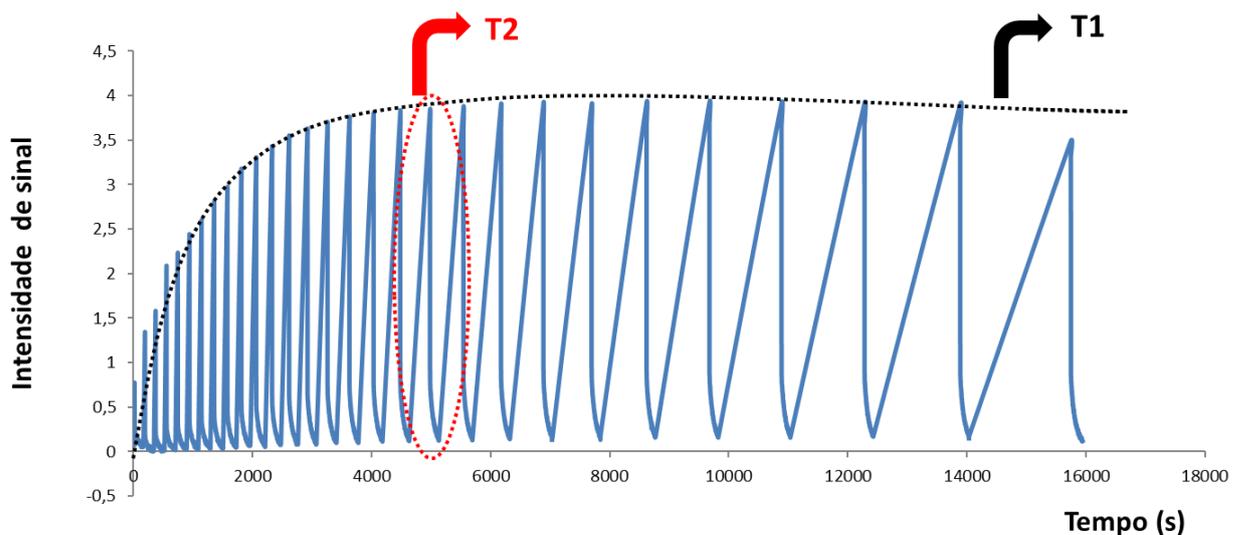


Figura 21. Exemplo da captura do sinal pelo equipamento e comportamento das curvas do tempo de relaxação T1 e T2.

Fonte: O autor.

As medições usadas nos modelos multivariados fazem simultaneamente as medições das curvas de T1 e T2 para determinação de óleo, umidade e matéria seca nas sementes de milho. Os resultados são adquiridos via sequência de pulsos CRelax que determina simultaneamente os tempos de relaxação T1 e T2 (citação pessoal).

Depois que cada amostra foi passada no equipamento, automaticamente foi salvo um arquivo “rawdata” para ser lido no software OPUS. OPUS é um software onde é construída a matriz de dados multivariados e foram adicionados manualmente os resultados de referência de óleo, umidade e matéria seca obtidos pelo SENAI para cada amostra para a construção da matriz de dados.

Os valores de referência foram convertidos de percentual (%) para gramas (g) por meio da massa usada na pesagem de cada amostra. A massa da pesagem também serve para normalizar o sinal para cada amostra.

O OPUS abre todos os espectros do banco de dados e faz uma validação cruzada com todos os valores de referência e espectros selecionados aleatoriamente via método “cross validation”. Em seguida foram criados modelos de regressão multivariada. Lembrando que parte das amostras foram selecionadas para construir o modelo e outra parte das amostras foram usadas para fazer a validação do modelo (~20%).

Ainda falta conhecimento sobre o mecanismos moleculares que tornam as práticas alternativas eficazes e como eles influenciam as respostas metabólicas das plantas. Acredita-se que o uso de tecnologias moleculares avançadas técnicas analíticas, como espectroscopia de NMR podem contribuir para identificar e compreender as mudanças ocorridas em plantas devido a tratamentos de campo com inovadores sustentáveis práticas. Em particular, HRMAS (ângulo mágico de alta resolução spinning) e MRI (ressonância magnética) representam técnicas de NMR não destrutivas que podem fornecer informações moleculares e estruturais em amostras de plantas (DOTY et al., 1998; MAZZEI et al., 2017a; MAZZEI et al., 2017b)

Os gráficos abaixo (Figuras 22, 23 e 24) foram construídos considerando os valores de referência do SENAI e os valores obtidos pelo equipamento para cada parâmetro estudado: matéria seca, teor de óleo e umidade, considerando os

resultados das amostras secas, onde encontramos melhores relações que em amostras úmidas.

Predito vs. Real – massa seca – amostras secas

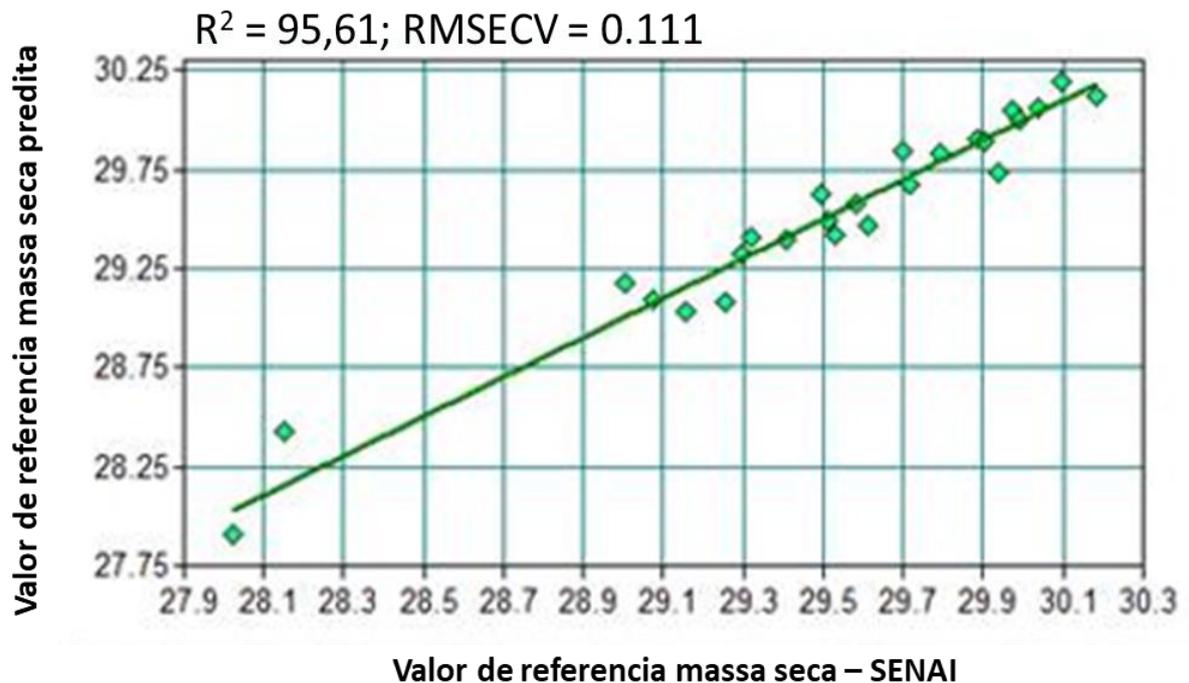


Figura 22. Correlação entre valores de referência e valores preditos pelo equipamento para matéria seca, em amostras de sementes secas, em gramas.
Fonte: O autor.

Para a característica estudada de matéria seca, foi obtida uma correlação de 96% entre os valores de referência e os valores preditos pelo equipamento, que representa uma boa assertividade do equipamento. O RMSECV, ou seja, o erro absoluto do modelo em gramas, nos indica o intervalo de variação em gramas que os resultados preditos podem sofrer. Uma amostra com valor predito de 28 g poderá estar com valores entre: 27,889 g a 28,111 g (Figuras 22,24 e 24).

Predito vs. Real – teor de óleo – amostras secas

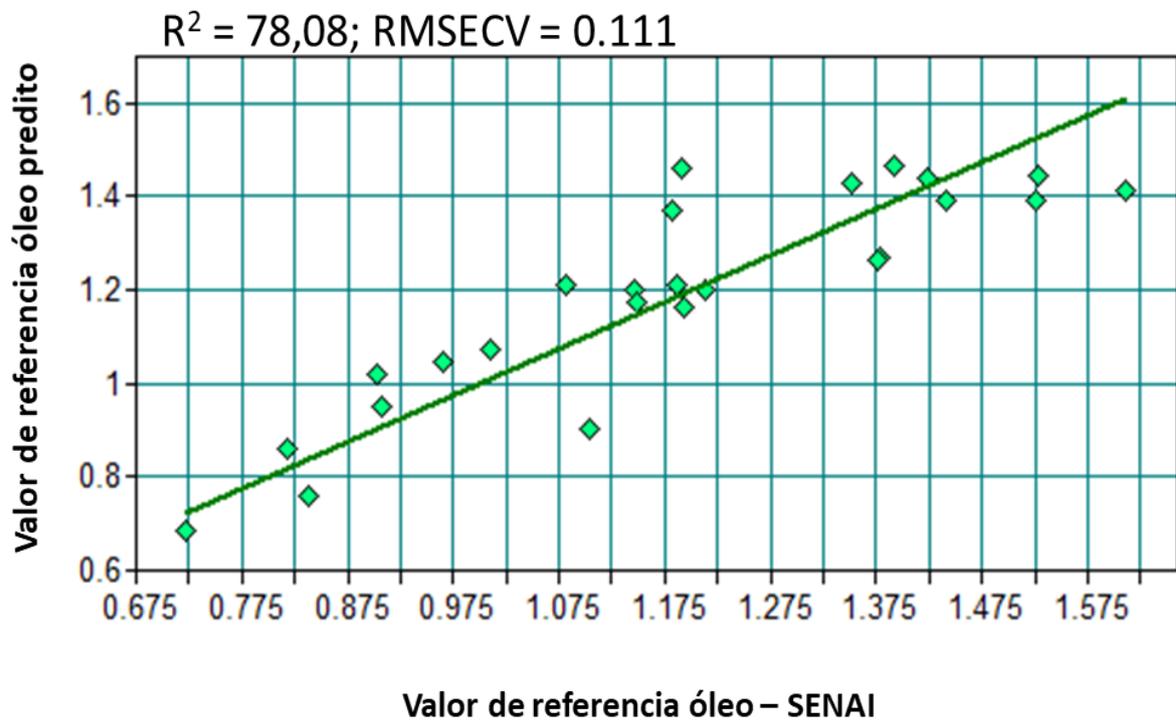


Figura 23. Correlação entre valores de referência determinados pelo SENAI e valores preditos pelo equipamento para teor de óleo, em amostras de sementes secas, em gramas.
Fonte: O autor.

Predito vs. Real – umidade – amostras secas

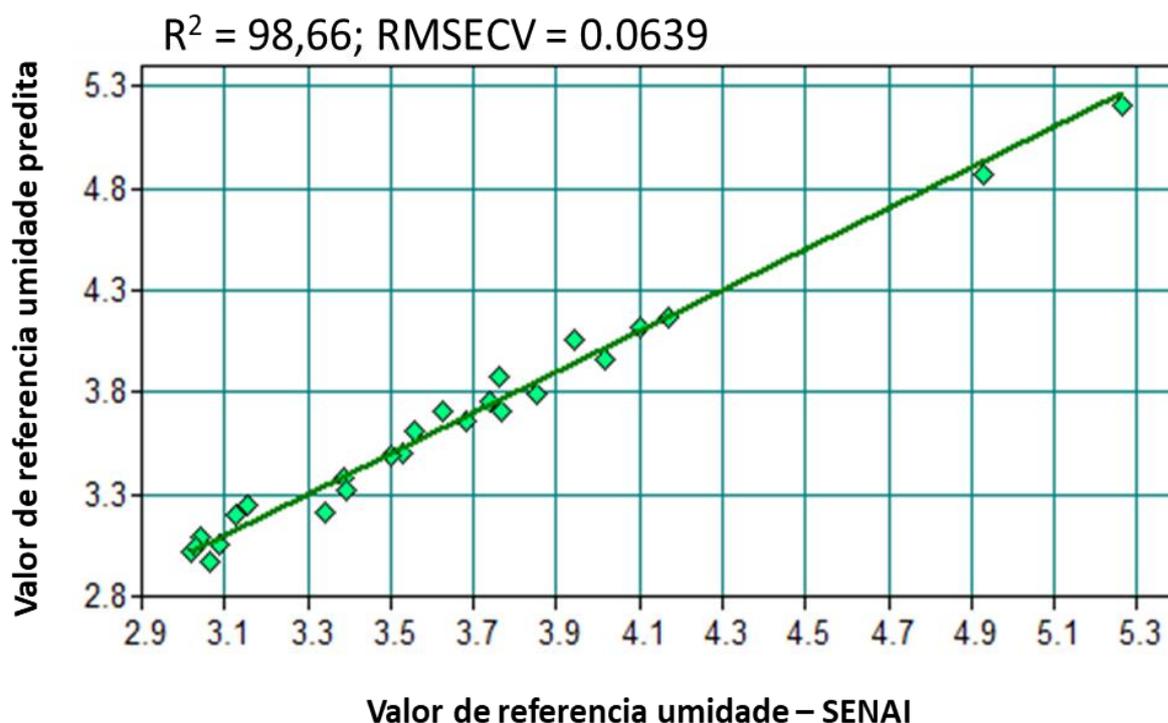


Figura 24. Correlação entre valores de referência determinados pelo SENAI e valores preditos pelo equipamento para umidade, em amostras de sementes secas, em gramas.
Fonte: O autor.

Apesar de seu grande potencial específico, a ressonância magnética ainda é subutilizada na pesquisa com plantas e alimentos (SCHMIDT et al., 1996; VAN et al., 2009). Apenas alguns trabalhos têm relatado aplicações de ressonância magnética para plantas e sementes de milho. Como exemplo, os efeitos dos processos de maceração em cariopses de milho foram seguidos por imagens 2D e perfil de umidade de ressonância magnética, (RUAN et al., 1996). Van et al., (2002) aplicaram a ressonância magnética para investigar o balanço hídrico celular de plantas de milho durante o estresse osmótico. Imagens de ressonância magnética e tempos de relaxamento foram usados para examinar as mudanças no estado físico da água das sementes de milho quando secas a menos de zero temperaturas (BOROMPICHAICHARTKU et al., 2004). Janas et al., (2010) aplicaram a MRI para projetar um modelo físico de transferência de calor e massa em cariopses de milho

para assim, avaliar a grau de desidratação e degradação da qualidade das sementes durante secagem.

Os gráficos abaixo (Figuras 25, 26 e 27) foram construídos considerando os valores de referência do SENAI e os valores obtidos pelo equipamento para cada parâmetro estudado: matéria seca, teor de óleo e umidade considerando os resultados das amostras úmidas. Com comportamento linear, percebe-se sutis variações de valores ao avaliar matéria seca, uma vez que a correlação apresentou um R^2 de 94,25% (Figura 25), o similar pode ser encontrado para equipamento para umidade (Figura 27), com R^2 de 96,32%, enquanto o equipamento para teor de óleo apresentou valores dispersos com com R^2 de 64,61% (Figura 26).

Predito vs. Real – massa seca – amostras úmidas

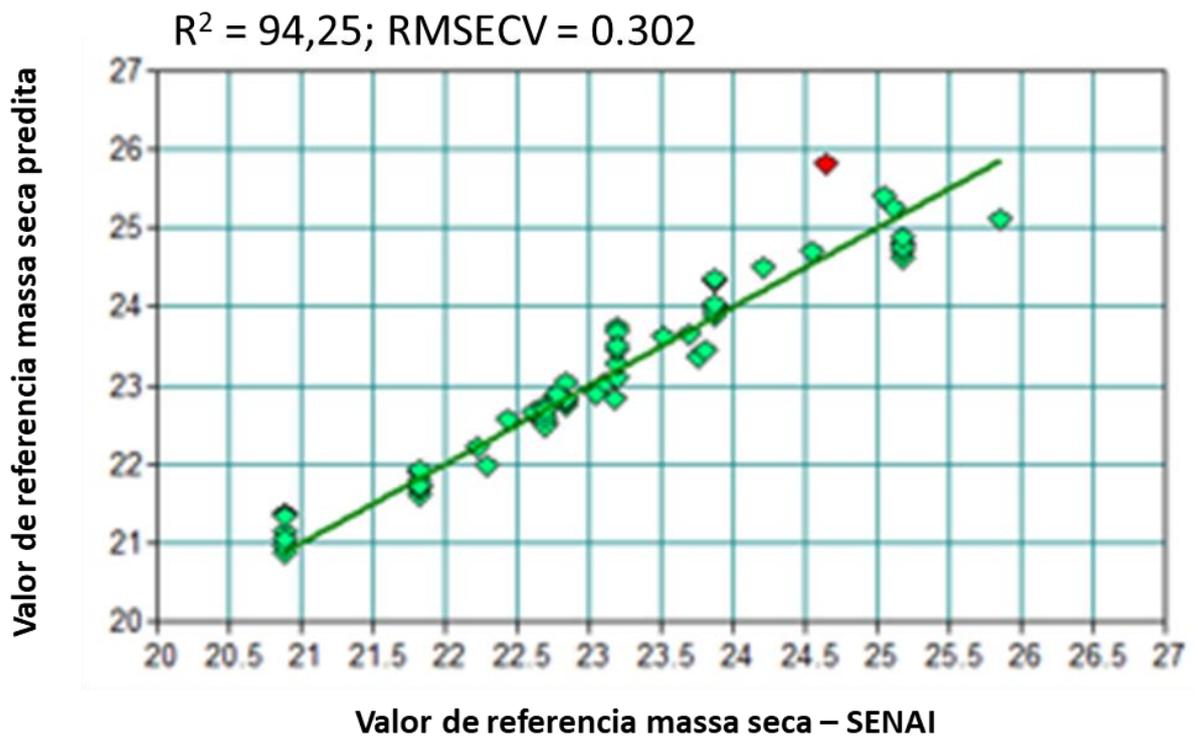


Figura 25. Correlação entre valores de referência determinados pelo SENAI e valores preditos pelo equipamento para matéria seca, em amostras de sementes úmidas, em gramas.
Fonte: O autor.

Predito vs. Real – teor de óleo – amostras úmidas

$R^2 = 64,61$; $RMSECV = 0.096$

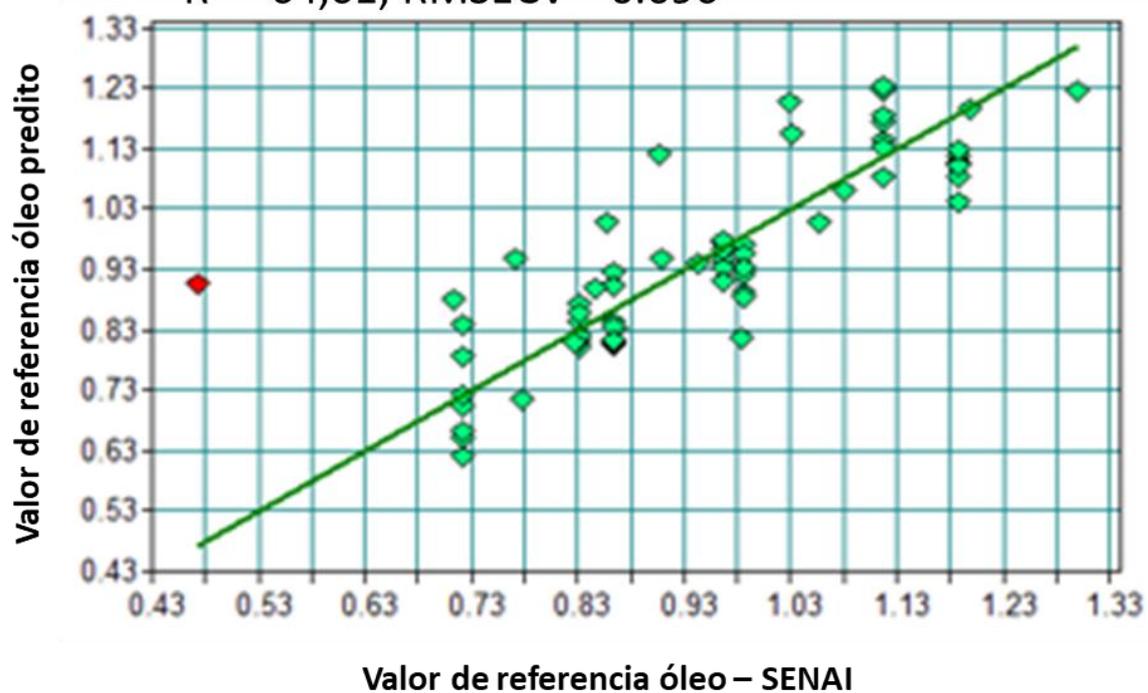


Figura 26. Correlação entre valores de referência determinados pelo SENAI e valores preditos pelo equipamento para teor de óleo, em amostras de sementes úmidas, em gramas.
Fonte: O autor.

Predito vs. Real – umidade – amostras úmidas

$$R^2 = 96,32; RMSECV = 0.214$$

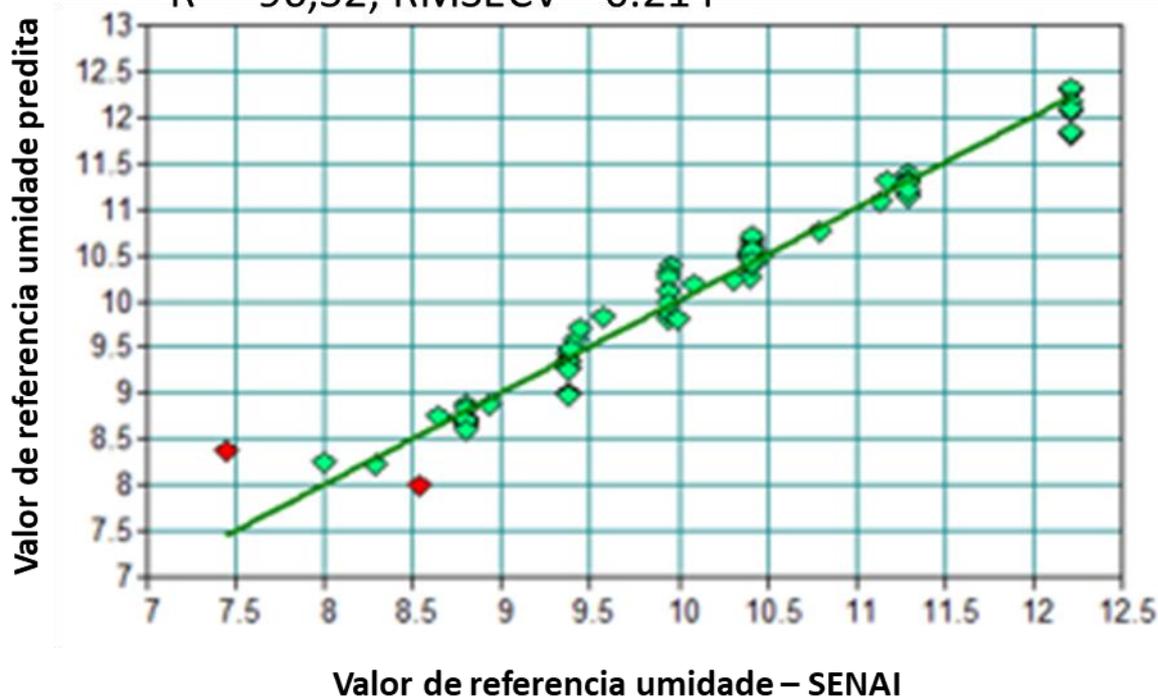
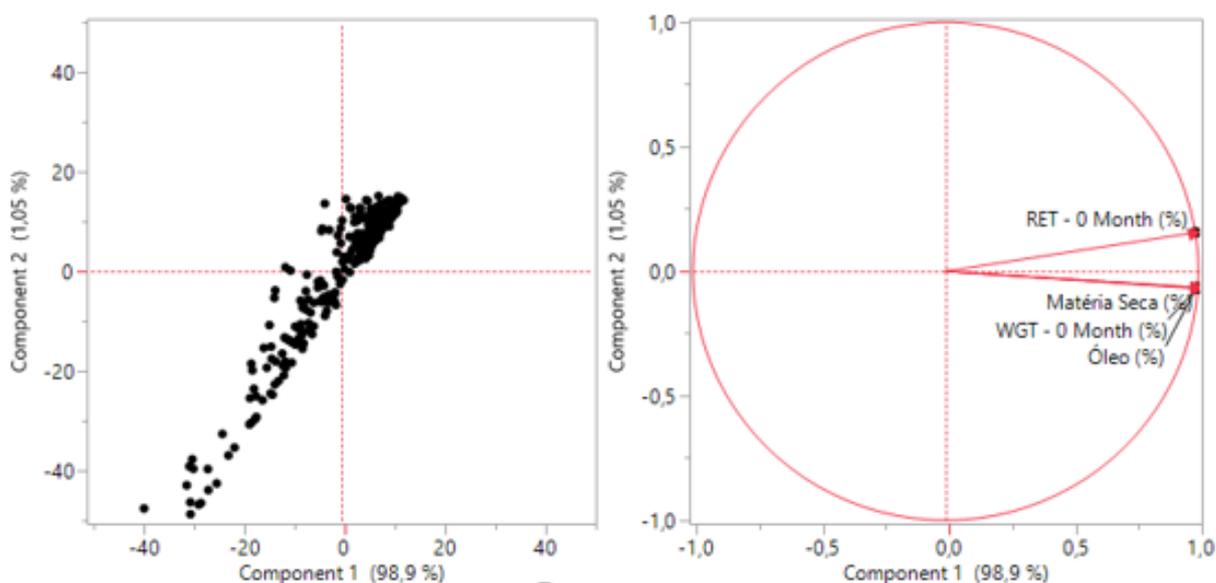


Figura 27. Correlação entre valores de referência determinados pelo SENAI e valores preditos pelo equipamento para umidade, em amostras de sementes úmidas, em gramas.
Fonte: O autor.

4.2 Fase de análise da relação dos componentes químicos com aspectos fisiológicos

Após a obtenção dos modelos, 300 amostras foram passadas pelo Minispec TD-NMR Mq10. As diferenças entre as curvas úmidas e secas foram pequenas, optou-se por passar as amostras nos modelos secos que ficaram com uma assertividade maior.

Os resultados de teor de óleo e matéria seca obtidos pelo Minispec, em gramas e em percentual, foram comparados com os resultados do TPG e RET obtidos no LAS da Bayer, em percentual. Foi feita uma comparação entre os resultados fisiológicos obtidos no LAS Bayer e os resultados dos spins do equipamento para lipídeos e matéria seca por meio de uma PCA, para analisar simultaneamente múltiplas medidas, conforme Figura 28.



Vetores característicos:

	Prin1	Prin2	Prin3	Prin4
WGT - 0 Month (%)	0,62642	-0,39697	-0,67040	-0,02411
RET - 0 Month (%)	0,54664	0,83723	0,01503	-0,00044
Matéria Seca (%)	0,55456	-0,37541	0,74177	-0,03625
Óleo (%)	0,03548	-0,02284	0,01074	0,99905

Figura 28. Análise dos principais componentes para Germinação, representada por WGT, Vigor representado por RET, matéria seca e teor de óleo.

Fonte: O autor.

O resultado da Figura 28 mostra uma redução para dois principais componentes sendo que o componente 1, representado por Germinação (TPG), Vigor (RET) e Matéria Seca, contribui com 98,9% para explicar as relações entre essas variáveis.

O vigor da semente é um dos indicadores importantes da qualidade da semente, e é intimamente relacionado à qualidade de emergência de sementes (RODO e MARCOS FILHO, 2003; HE et al., 2019). É o desempenho abrangente das características da semente que determinam o nível de viabilidade e comportamento da semente ou semente lote durante a germinação e emergência (KAPOOR et al., 2011). Sementes de alto vigor têm vantagens óbvias de crescimento e potencial de produção, que pode aumentar a taxa de emergência no campo e ter forte resistência ao estresse de campo (LI et al., 2015; GRASSO et al., 2018). Para manter as sementes de alto vigor, as condições de armazenamento devem ser estritamente

limitado. E as condições de temperatura e umidade mais altas diminuirão a vitalidade das sementes (WEN et al., 2018; D. WANG, 2001). O reitera o fato de correlacionar as variáveis do SENAI com o vigor dos materiais estudados.

A análise fez um agrupamento das variáveis, segundo as variações das características estudadas, ou seja, segundo o comportamento das mesmas em relação aos dois primeiros componentes principais.

Apesar da matéria seca aparecer no primeiro componente principal, juntamente com a germinação e o vigor, não foi observado uma relação direta entre essas características, com R^2 igual ou muito próximo a zero tanto para germinação quanto para vigor, conforme Figura 29. Estes resultados demonstram também que o comportamento entre as variáveis matéria seca x vigor e matéria seca x germinação, não apresentaram padrão de comportamento linear ou qualquer outro, ou seja, a distribuição dos pares ordenados é totalmente aleatória.

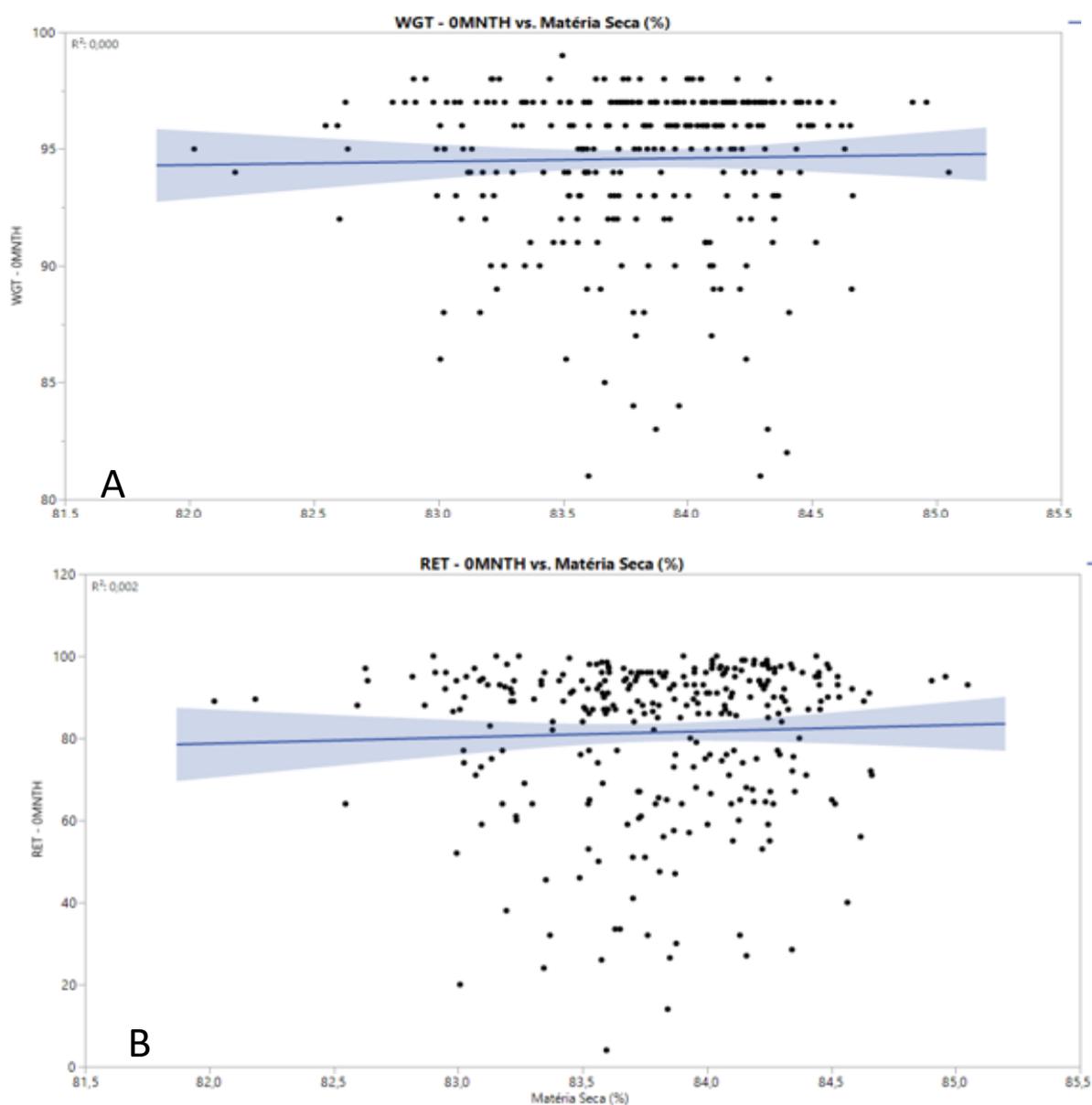


Figura 29. Análise de regressão da matéria seca com a germinação (A) e análise de regressão da matéria seca com o vigor (B).
Fonte: O autor.

Segundo Marcos Filho, 2015, há uma complexidade muito grande dos mecanismos de produção de matéria seca, sua transferência para as sementes e assimilação, culminando com a reversão do metabolismo de desenvolvimento para o de germinação. O final do processo de maturação coincide com o ápice do acúmulo de matéria seca, porém, a secagem próxima ou após o ponto de máximo acúmulo de matéria seca pelas sementes deve alterar o comportamento de alguns

compostos, promover o desaparecimento ou a inativação de outros, constituindo mais uma razão da frequente falta de coincidência entre os pontos de máxima massa de matéria seca, germinação e vigor, verificada em várias pesquisas sobre o assunto.

Diante disso, evidencia-se que há relação de matéria seca com aspectos fisiológicos e faz-se necessário continuar os estudos dessas relações, com uma população mais padronizada em relação ao ponto de maturidade fisiológica.

O diagrama de dispersão entre as variáveis analisadas é apresentado na Figura 30. Verifica-se que somente as variáveis % matéria seca e % óleo apresentaram entre elas um comportamento linear, que estão relacionadas negativamente. Todas as outras combinações de variáveis não apresentaram nenhum padrão. Borisjuk et al., (2011) concluiu que o uso de ressonância magnética é eficiente para análises lipídicas.

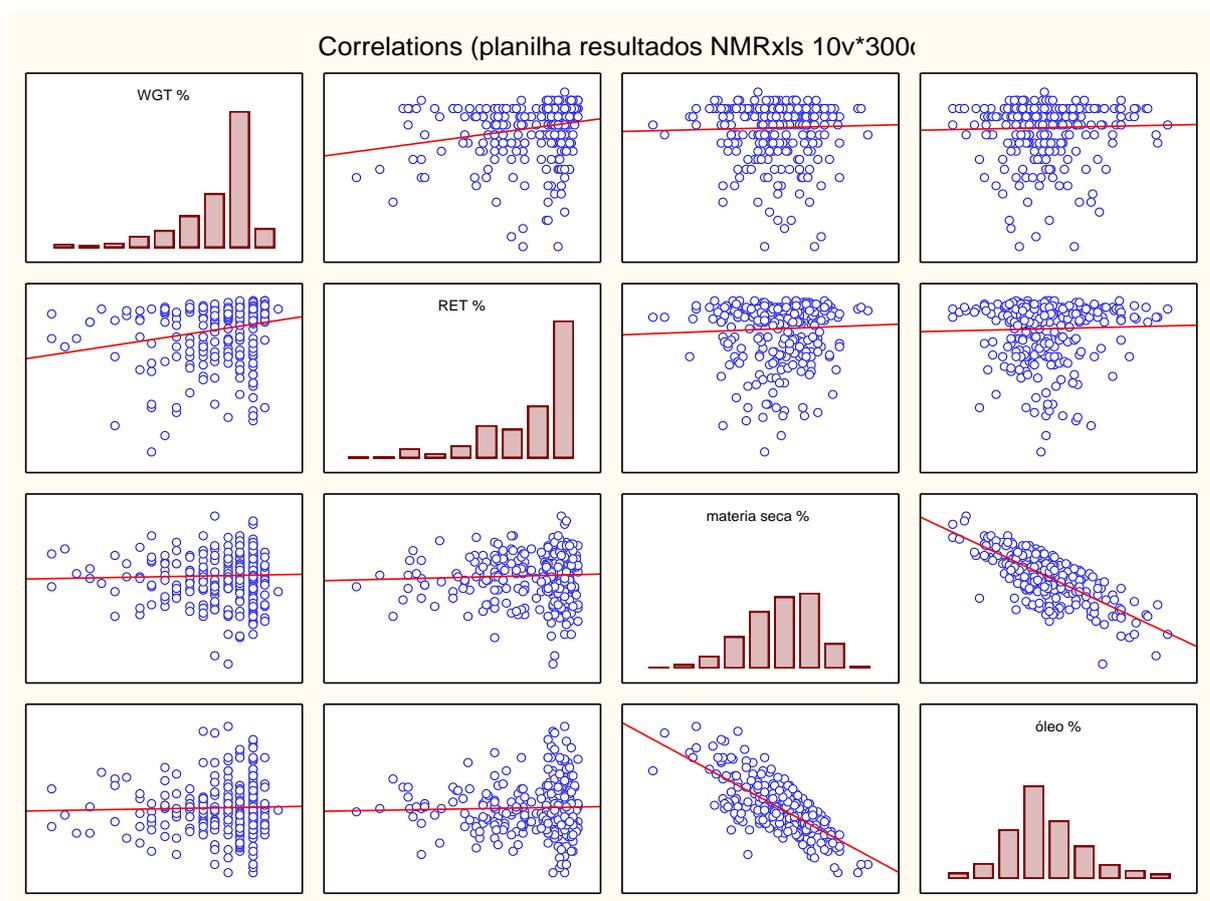


Figura 30. Diagrama de dispersão entre as variáveis analisadas: % de germinação (WGT%), % de vigor (RET%), % de matéria seca e % de óleo.

Fonte: O autor.

Entretanto pode-se observar que em alguns casos, ocorre uma aglomeração de pontos, fato este que sugere condições controladas em experimentação para que se possa tentar encontrar algum padrão de associação entre as variáveis fisiológicas e as variáveis químicas determinadas pelo equipamento.

Realizou-se o cálculo das estimativas do coeficiente de correlação linear de Pearson entre as variáveis analisadas. Os resultados são apresentados na tabela a seguir:

Tabela 7. Cálculo das estimativas do coeficiente de correlação linear de Pearson entre as variáveis analisadas: % de germinação (WGT%), % de vigor (RET%), % de matéria seca e % de óleo.

	WGT %	RET %	matéria seca %	óleo %
WGT %	-	0,2092	0,0299	0,0272
		valor-p=0,000	valor-p=0,611	valor-p=0,643
RET %	0,2092	-	0,0444	0,0291
	valor-p=0,000		valor-p=0,450	valor-p=0,621
matéria seca %	0,0299	0,0444	-	-0,7365
	valor-p=0,611	valor-p=0,450		valor-p=0,000
óleo %	0,0272	0,0291	-0,7365	-
	valor-p=0,643	valor-p=0,621	valor-p=0,000	

Fonte: O autor.

Como pode ser observado as estimativas de correlação entre variáveis fisiológicas, % de germinação (WGT%) e % de vigor (RET%) e as variáveis obtidas no equipamento, % de matéria seca e % de óleo, foram todas de baixa magnitude e não significativas.

Em relação ao milho, a metabolômica baseada em NMR foi empregada para estudar amostras geneticamente modificadas e monitorar a influência exercido por condições de estresse, como excesso de sais ou deficiência de nitrogênio (BARROS et al., 2010; GAVAGHAN et al., 2011; KUSANO et al., 2011)

Como uma técnica complementar de NMR, a ressonância magnética permite aquisição de imagens morfológicas e anatômicas (Shenton et al., 2001), atualmente, a ressonância magnética é usada principalmente em mamíferos na área médica, diagnóstica e farmacêutica formulários. Na verdade, a ressonância magnética é um método analítico consolidado para a avaliação rápida não invasiva de mudanças nos

tecidos morfologia e ocorrência de doenças específicas, como câncer desenvolvimento (BOLLINEN et al., 2015)

Como as estimativas de correlação individuais entre as variáveis fisiológicas e as variáveis químicas obtidas no equipamento não apresentaram nenhum comportamento significativo, procurou-se correlacionar o grupo das variáveis fisiológicas (% de germinação e % de vigor) com o grupo das variáveis químicas (% de matéria seca e % de óleo) por meio das estimativas de correlação canônica (Tabela 8).

Tabela 8. Cálculo das estimativas de correlação canônica entre os grupos das variáveis analisadas: grupo fisiológico (% de germinação e % de vigor), grupo químico (% de matéria seca e % de óleo).

Par canônico	R canônico	Valor-p
Fisiológico	0,117247	0,406163
Químico	0,004362	0,940939

Fonte: O autor.

Verifica-se que as correlações canônicas foram de baixa magnitude e apresentaram-se não significativas, considerando um nível nominal de significância de 0,05.

Nesse sentido, Song et al., 2018, estudaram a técnica de ressonância magnética nuclear de baixo campo (LF-NMR) para detectar o vigor de sementes de arroz concluíram que o LF-NMR pode ser usado como método para distinguir rapidamente o vigor de sementes de arroz. Mazzei et al., 2018 ao aplicar ressonância magnética para avaliação de sementes de milho, concluíram que tal técnica é eficiente para essa finalidade. Borisjuk et al., 2012 ao elaborarem uma revisão sobre ressonância magnética demonstra várias utilizações positivas da técnica para avaliação da qualidade de sementes.

5 CONCLUSÕES

Por meio do equipamento Minispec foi possível obter resultados válidos para a determinação de matéria seca, teor de óleo e umidade. Foi observada uma relação

entre matéria seca e valores de germinação e vigor, porém não possibilitam, com uma sensibilidade suficiente, uma classificação dos lotes a partir de leituras de matéria seca no equipamento de ressonância magnética.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, D. E.; CREECH, R. G. Breeding special industrial and nutritional types. *In*: SPRAGUE, G. E.; DUDLE, J. W. (Ed.). **Corn and corn improvement**. 2. ed. Madison: ASA/CSSA/SSSA, 1977. p. 363-391. (Agronomy Monography, 18).
- BARROS, E. *et al.* Comparison of two GM maize varieties with a near isogenic non-GM variety using transcriptomics, proteomics and metabolomics. **Plant Biotechnol. J.**, v. 8, p. 436-451, 2010..
- BOLLINENI, V. R. *et al.* A literature review of the association between diffusion-weighted MRI derived apparent diffusion coefficient and tumour aggressiveness in pelvic cancer. **Cancer Treat. Rev.**, v. 41, p. 496-502, 2015.
- BORISJUK, L.; ROLLETSCHEK, H.; NEUBERGER, T. Surveying the plant's world by magnetic resonance imaging. **The Plant Journal**, v. 70, n. 1, p. 129-146, 2012.
- BORISJUK, L. *et al.* Low and high field magnetic resonance for in vivo analysis of seeds. **Materials**, v. 4, n. 8, p. 1426-1439, 2011.
- BOROMPICHAICHARTKUL, C. *et al.* Studies of physical state of water in maize from Northeast China (cv. Huangmo 417) during drying at subzero temperatures. **Drying Technol.**, v. 22, p. 295-305, 2004.
- COLNAGO, L. A. **Análise do teor de óleo em sementes por RMN**. Brasília: EMBRAPA, 1996. (Circular Técnica; 3/96)
- DOTY, F. D.; ENTZMINGER, G.; YANG, A. Y. Magnetism in high-resolution NMR probe design. II: HR MAS. **Concepts Magn. Reson.**, v. 10, n. 4, p. 239-260, 1998.
- DYER, D. J. **Analysis of oilseeds and coarse grains**. *In*: ROBERTS, C. A.; WORKMAN, J.; REEVES III, J. B. Near-Infrared spectroscopy in agriculture. Madison: IM Publishing, 2004. (Agronomy Monograph; 44).
- GAVAGHAN, C. L. *et al.* Application of NMR-based metabolomics to the investigation of salt stress in maize (*Zea mays*). **Phytochem. Anal.**, v. 22, p. 214-224, 2011.
- JANAS, S. *et al.* Modelling dehydration and quality degradation of maize during fluidized-bed drying. **J. Food Eng.**, v. 100, p. 527-534, 2010.
- KUSANO, M. *et al.* Metabolomic approaches toward understanding nitrogen metabolism in plants. **J. Exp. Bot.**, v. 62, p. 1439-1453, 2011.

- MARCOS, FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. 2. ed. Londrina: ABRATES, 2015. 660p.
- MAZZEI, P.; COZZOLINO, V.; PICCOLO, A. High-Resolution Magic-Angle-Spinning NMR and Magnetic Resonance Imaging Spectroscopies Distinguish Metabolome and Structural Properties of Maize Seeds from Plants Treated with Different Fertilizers and Arbuscular mycorrhizal fungi. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 11, p. 2580-2588, 2018.
- MAZZEI, P.; PICCOLO, A. HRMAS NMR spectroscopy applications in agriculture. **Chem. Biol. Technol. Agric.**, v.4, p. 1-11, 2017.
- MAZZEI, P. et al. Intact food analysis by means of HRMAS-NMR spectroscopy. **Modern Magnetic Resonance**, p.1-16, 2017.
- RUAN, R.; LITCHFIELD, J. B.; ECKHOFF, S. V. Simultaneous and nondestructive measurements of transient moisture profiles and structural changes in corn kernels during steeping using microscopic nuclear magnetic resonance imaging. **Cereal Chem.**, v. 69, p. 600-606, 1996
- SCHMIDT, S. J. *et al.* Applications of magnetic resonance imaging in food science. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v. 36, p. 357-85, 1996.
- SHENTON, M. E. *et al.* A review of MRI findings in schizophrenia. **Schizophr. Res.**, v. 49, p. 1-52, 2001.
- SONG, P. *et al.* Detection of rice seed vigor by low-field nuclear magnetic resonance. **International Journal of Agricultural and Biological Engineering**, v. 11, n. 6, p. 195-200, 2018.
- SONG, X. F. *et al.* Experimento De Quimiometria para calibração multivariada na determinação de Paracetamol em comprimidos comerciais utilizando espectroscopia no infravermelho. **Química Nova**, p. 1057-1065, 2013.
- VAN AS, H.; SCHEENEN, T.; VERGELDT, F. J. MRI of intact plants. **Photosynth. Res.** v. 102, p. 213-222, 2009.
- VAN DER WEERD, L. *et al.* Nuclear magnetic resonance imaging of membrane permeability changes in plants during osmotic stress. **Plant, Cell Environ.**, v. 25, p. 1539-1549, 2002.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Espectros gerados por equipamento NIR XDS podem ser utilizados de forma rápida para tomadas de decisão quanto à qualidade fisiológica de amostras de semente de milho, possibilitando a antecipação de melhores controles durante o beneficiamento.

Mais intervalos de qualidade fisiológica podem ser gerados e novos modelos poderão ser desenvolvidos por meio dos espectros do NIR XDS, de modo a atender outros padrões de qualidade.

Por meio do equipamento Minispec foi possível obter resultados válidos para a determinação de matéria seca, teor de óleo e umidade, considerando uma assertividade maior que 60%.

Foi observada uma relação entre matéria seca e valores de germinação e vigor, porém não possibilitam, com uma sensibilidade suficiente, uma classificação dos lotes a partir de leituras de matéria seca no equipamento de ressonância magnética.

Faz-se necessário estudo de maior variação de matéria seca e resultados fisiológicos para possibilitar o possível encontro da correlação direta entre essas características, como por exemplo o teste com sementes maduras e imaturas.