



MICHELE CERQUEIRA DA SILVA ALVES

DESSECAÇÃO DE SEMENTES DE PITANGA
(Eugenia uniflora L.)

LAVRAS-MG
2018

MICHELE CERQUEIRA DA SILVA ALVES

DESSECAÇÃO DE SEMENTES DE PITANGA (*Eugenia uniflora* L.)

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, área de concentração em Silvicultura e Genética Florestal, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. José Marcio Rocha Faria
Orientador

**LAVRAS-MG
2018**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Alves, Michele Cerqueira da Silva.

Dessecação de sementes de pitanga (*Eugenia uniflora* L.) /
Michele Cerqueira da Silva Alves. - 2018.

74 p.

Orientador(a): José Marcio Rocha Faria.

.
Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2018.

Bibliografia.

1. Desidratação. 2. Sementes sensíveis. 3. NIRS. I. Rocha
Faria, José Marcio. . II. Título.

MICHELE CERQUEIRA DA SILVA ALVES

DESSECAÇÃO DE SEMENTES DE PITANGA (*Eugenia uniflora* L.)
SEED DESICCATION OF BRAZILIAN CHERRY (*Eugenia uniflora* L.)

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, área de concentração em Silvicultura e Genética Florestal, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 8 de março de 2018
Dr. José Marcio Rocha Faria - UFLA
Dra. Sttela Dellyzete Veiga Franco da Rosa - EMBRAPA
Dr. Paulo Ricardo Gherardi Hein - UFLA

Prof. Dr. José Marcio Rocha Faria
Orientador

LAVRAS-MG
2018

*Aos meus pais,
E a todas as mulheres negras que lutam diariamente contra este sistema
capitalista, opressor, racista e machista. Avante, companheiras! A universidade
também é um espaço nosso e vamos ocupá-la das mais diferentes formas.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, minha fonte inesgotável de fé e força. Que me protege e nunca me deixa desistir.

Aos meus pais, Nilza e França, pelo exemplo de luta, coragem, humildade. Muito obrigada por acreditarem em mim e sempre fazerem o impossível para realizar meus sonhos.

Aos meus irmãos Daniela, Cosme e Damiana pelo apoio, incentivo e amizade. Essa conquista também é de vocês!

Ao meu namorado Léo, pelo amor, carinho, incentivo e que apesar da distância sempre esteve ao meu lado dividindo as alegrias e os momentos de tristeza. Você faz parte desta vitória!

A toda minha família, em especial a minha vó Albertina, exemplo de mulher de fé e guerreira.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal pela oportunidade concedida para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. José Marcio, pela orientação, confiança, convivência e pelas suas contribuições à minha formação profissional.

Ao Prof. Dr. Paulo Hein, pela colaboração e ajuda na parte do NIR.

À técnica de laboratório Olívia Tonetti, pela ajuda e aprendizados diários.

Aos colegas do Laboratório de Sementes Florestais da UFLA pelas risadas diárias e convivência, em especial a Wilson pela ajuda.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

As companheiras de república Poli e Carol, pela convivência diária, risos e pelos diversos momentos compartilhados juntos. Vou sentir saudades!

Aos amigos de Irará-BA pelo incentivo e amizade.

Aos amigos que a Universidade Federal do Recôncavo da Bahia me deu, em especial a Jocy e Nai.

Aos amigos que a UFLA me presenteou e levarei para sempre comigo. Em especial, Lívia, Jéssica, Cadu, Pâmela, Douglas e Cilene.

Enfim... à todas e todos que de forma direta ou indireta estiveram presentes ao longo desta jornada. Sem vocês esta conquista não seria possível.

Gratidão e axé para todos!!!

RESUMO

Sementes de pitanga (*Eugenia uniflora* L.) são de difícil armazenamento por perderem a viabilidade quando submetidas à desidratação. A viabilidade das sementes é determinada, em geral, por meio de testes de germinação, que é um método destrutivo. O uso de técnicas analíticas rápidas e não destrutivas, como a espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) tem sido alvo de estudos para a estimativa de algumas propriedades de materiais biológicos. Assim, objetivou-se com este estudo avaliar os possíveis danos ocasionados nas sementes de pitanga quando submetidas à desidratação e explorar o uso da técnica NIR na determinação de sua viabilidade. As sementes foram submetidas a desidratação em sílica gel (secagem rápida) e em cloreto de sódio (secagem lenta) até atingirem diferentes graus de umidade. Os espectros NIR foram obtidos por meio da fibra ótica a partir de sementes individuais submetidas ou não a desidratação em sílica gel. A exploração dos dados NIR foi realizada por análise de componentes principais (PCA) e a viabilidade das sementes foi classificada por análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA). A secagem rápida reduziu o conteúdo de água inicial das sementes de 60,4% para 15,6% em 25 dias, ao passo que na secagem lenta foram necessários 79 dias para essa mesma redução do conteúdo de água. A germinação foi afetada pelo grau de umidade, mas não pela velocidade de secagem utilizada. Na PCA foi observado um agrupamento claro entre sementes com e sem secagem. Não foi possível a partir da PLS-DA validar um modelo para classificar a viabilidade das sementes. No teste de condutividade elétrica, o valor máximo da leitura foi de $27,9 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ obtido nas sementes recém-coletadas. Quando as sementes foram sujeitas à desidratação, os valores de condutividade elétrica decresceram, chegando a $15,0 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ para sementes em secagem rápida e $1,9 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ para as sementes em secagem lenta, ambas com 15% de umidade. Observou-se degradação de amido quando as sementes de pitanga atingiram grau de umidade abaixo de 28% e ao longo da desidratação não foi observada degradação do DNA. Os resultados deste trabalho demonstraram que a desidratação foi prejudicial para a viabilidade das sementes e que a presença do tegumento nas sementes após a desidratação pode ter influenciado tanto nas informações contidas nos espectros NIR, quanto nos resultados dos testes de condutividade elétrica e de germinação. Assim, são necessários estudos mais detalhados da relação da desidratação com a presença do tegumento nas sementes de pitanga.

Palavras-chave: Qualidade de semente. Sementes sensíveis. Desidratação. NIRS.

ABSTRACT

Brazilian cherry (*Eugenia uniflora* L.) seeds are sensitive to dehydration, difficulting their storage. The most usual procedure to determine seed viability is the germination test which is a destructive method. Fast and non-destructive analytical techniques, such as near-infrared spectroscopy (NIR), has been used in studies to estimate some properties of biological materials. Thus, the present study aimed to evaluate possible damages caused on Brazilian cherry seeds when subjected to dehydration and to explore the use of the NIR technique in the assessment of seed viability. Seeds were subjected to dehydration in silica gel (fast drying) and sodium chloride (slow drying) until reaching different moisture contents. The NIR spectra were obtained by optical fiber method using individualized seeds submitted or not to silica gel dehydration. The NIR data were analyzed by principal component analysis (PCA), and seed viability was determined by partial least squares discriminant analysis (PLS-DA). The initial moisture content of the seeds reduced from 60.4% to 15.6% in 25 days at fast drying, while in the slow drying process, it took 79 days. Viability was affected by moisture content but not by drying speed. PCA was able to clearly distinguish groups of seeds with and without drying. It was not possible to validate a model to classify the viability of the seeds using the PLS-DA. In the electrical conductivity test, the maximum value was $27.9 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ for newly collected seeds. When seeds were subjected to dehydration, the values decreased, reaching $15.0 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ for fast-dried seeds and $1.9 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ for slow-dried seeds, both with 15% moisture content. Starch degradation was observed when seeds reached moisture content below 28%, while DNA integrity was maintained throughout dehydration. The results of this study showed that the dehydration of the seeds was detrimental to their viability. Furthermore, the presence of the seed coat after dehydration may have influenced the information collected for generating NIR spectra, as well as the electrical conductivity and germination test results. Thus, it is necessary more detailed studies on the relationship between dehydration and the presence of seed coat in Brazilian cherry seeds.

Keywords: Seed quality. Sensitive seeds. Seed dehydration. NIRS.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

- Figura 1 Graus de umidade (% base úmida) individual de sementes de pitanga (*Eugenia uniflora* L.) obtidas durante a desidratação em sílica gel..... 43
- Figura 2 Curva de secagem de sementes de pitanga (*Eugenia uniflora* L.), submetidas a duas velocidades de secagem..... 44
- Figura 3 Porcentagem de sementes de pitanga (*Eugenia uniflora* L.) germinadas em diferentes níveis de desidratação, submetidas a duas velocidades de secagem. 45
- Figura 4 Porcentagem de plântulas normais, anormais e sementes mortas de pitanga (*Eugenia uniflora* L.) com diferentes teores de água obtidos por duas velocidades de secagem. Figura A: sementes submetidas à secagem rápida. Figura B: sementes de pitanga submetidas à secagem lenta. 47
- Figura 5 Condutividade elétrica ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$) de sementes de pitanga (*Eugenia uniflora* L.) submetidas a diferentes velocidades de secagem, e níveis de desidratação. 49
- Figura 6 Fotomicrografias de sementes de pitanga (*Eugenia uniflora* L.) com diferentes teores de água, obtidos por diferentes velocidades de secagem. 51
- Figura 7 Gel de agarose (1%) de DNA genômico extraído de sementes de pitanga (*Eugenia uniflora* L.) submetidas a diferentes velocidades de secagem e níveis de desidratação. 52

CAPÍTULO 3

- Figura 1 Média por grau de umidade dos espectros NIR em sementes de pitanga (*Eugenia uniflora* L.) com e sem secagem. 65
- Figura 2 Média por germinação dos espectros NIR em sementes de pitanga (*Eugenia uniflora* L.)..... 66
- Figura 3 Gráfico de dispersão bidimensional para PC1 e PC2 da análise de componentes principais (PCA) dos espectros no NIR a partir de sementes de pitanga (*Eugenia uniflora* L.) submetidas ou não a secagem. 67
- Figura 4 Gráfico de dispersão bidimensional para PC1 e PC2 da análise de componentes principais (PCA) dos espectros no NIR a partir da germinação de sementes de pitanga (*Eugenia uniflora* L.) submetidas ou não a secagem..... 68
- Figura 5 Plotagem de carregamento da PC1 e PC2 e espectros NIR de sementes de pitanga (*Eugenia uniflora* L.). 69

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1	Resumo de trabalhos relacionando à técnica NIRS e sementes ...	24
----------	--	----

CAPÍTULO 2

Tabela 1	Graus de umidade (% base úmida) alcançados durante a desidratação de sementes de pitanga (<i>Eugenia uniflora</i> L.).....	43
Tabela 2	Porcentagem de plântulas normais, anormais e sementes mortas de pitanga (<i>Eugenia uniflora</i> L.), com diferentes teores de água submetidos ou não a secagem.	48

CAPÍTULO 3

Tabela 1	Predição da viabilidade de sementes de pitanga (<i>Eugenia uniflora</i> L.) por análise PLS-DA com validação cruzada.	70
----------	---	----

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	15
1 INTRODUÇÃO GERAL	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1 Tolerância à dessecação em sementes	17
2.2 Taxa de secagem em sementes	18
2.3 Danos causados por secagem em sementes	19
2.4 Espectroscopia do infravermelho próximo – NIRS	20
2.5 Caracterização da espécie	27
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29
CAPÍTULO 2	35
DESSECAÇÃO EM SEMENTES DE PITANGA (<i>Eugenia uniflora</i> L.)	35
1 INTRODUÇÃO	35
2 MATERIAL E MÉTODOS	37
2.1 Coleta dos frutos e obtenção das sementes	37
2.2 Secagem das sementes	37
2.3 Determinação do conteúdo de água	38
2.4 Testes de germinação	39
2.5 Condutividade elétrica individual	39
2.6 Integridade do DNA	39
2.7 Análise histoquímica	41
2.8 Análises estatísticas	41
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
3.1 Secagem e germinação das sementes	42
3.2 Danos causados pela secagem	48
4 CONCLUSÕES	53

	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
	CAPÍTULO 3.....	56
	ESTIMATIVA DA VIABILIDADE DE SEMENTES DE PITANGA (<i>Eugenia uniflora</i> L.) POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO	57
1	INTRODUÇÃO	57
2	MATERIAL E MÉTODOS	59
2.1	Coleta e beneficiamento das sementes	59
2.2	Desidratação das sementes.....	60
2.3	Aquisição dos espectros no infravermelho próximo – NIR	60
2.4	Teste de germinação como método de referência	61
2.5	Análise multivariada dos dados.....	62
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
3.1	Espectros no NIR e interpretação de bandas de absorção.....	62
3.2	Análise de componentes principais (PCA)	66
3.3	Análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA)	69
4	CONCLUSÕES.....	71
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO GERAL

A tolerância à dessecação é a habilidade de certos organismos tolerarem a desidratação a níveis baixos de água e, quando reidratados, retomarem as suas atividades sem nenhum dano às suas estruturas e células. Tal característica foi fundamental para a evolução dos organismos vivos, principalmente das plantas, visto que a partir do estresse de dessecação imposto pelo ambiente foram necessárias adaptações que possibilitassem a sobrevivência ou tolerância ao estado desidratado.

Sendo assim, é provável que, à medida que as plantas evoluíram para ocupar diferentes habitats, a pressão por crescimento, alterações no sistema vascular, bem como a presença de estruturas de proteção contra a perda de água favoreceram para que muitas espécies confinassem a tolerância à dessecação nas sementes.

Para tolerar a dessecação, as células das sementes protegem-se contra as alterações potencialmente letais que podem surgir após serem submetidas à desidratação. Os efeitos da desidratação e os estresses que ela causa podem ser fatais para a sobrevivência das sementes.

A maioria das espécies de Angiospermas produz sementes ortodoxas, ou seja, sementes que toleram a dessecação e podem ser armazenadas por longos períodos sem perderem a viabilidade. Contudo, existe um número significativo de espécies que produzem sementes sensíveis à dessecação e por isso são dificilmente armazenáveis. Sementes com essas características são classificadas como recalcitrantes. Entre essas duas categorias existem ainda as sementes intermediárias, que são capazes de sobreviver moderadamente à dessecação,

porém, são danificadas quando armazenadas a baixas temperaturas por tempo prolongado.

A tolerância à dessecação pode ocorrer em graus variados em sementes de diferentes espécies e ocupam um gradiente que vai de tolerante à dessecação a sensível à dessecação. Dentre estas espécies que se comportam neste intervalo, entre sensível e tolerante, têm-se as sementes de *Eugenia uniflora* L. que são sensíveis à dessecação.

A *Eugenia uniflora* L. apresenta grande potencial econômico para a fruticultura brasileira. Por ser uma espécie propagada principalmente por sementes, e tendo em vista que é também sensível à dessecação, suas sementes perdem a viabilidade quando submetidas à desidratação. Assim, faz-se necessário o conhecimento dos danos ocasionados nas sementes diante da desidratação a fim de buscar estratégias para a conservação do potencial fisiológico da espécie.

Existem vários métodos para desidratar sementes e avaliar os possíveis danos causados pela remoção de água. O uso da microscopia para avaliar os possíveis danos causados por esse estresse, bem como o uso de técnicas analíticas rápidas como a espectroscopia no infravermelho próximo (NIRS), tem sido alvo de estudos para a estimativa de algumas propriedades de materiais biológicos. Contudo, ainda são escassos estudos relacionados à aplicação desta técnica em sementes florestais.

Assim, se objetivou com este estudo identificar possíveis danos causados nas sementes de pitanga (*Eugenia uniflora* L.) quando submetidas à desidratação e explorar o potencial da técnica NIR para estimar a viabilidade das sementes dessa espécie.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Tolerância à dessecação em sementes

O desenvolvimento da semente se inicia por um estágio de embriogênese em que a partir da fertilização o óvulo fecundado passa por uma série de processos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos (MARCOS-FILHO, 2005). Segundo Kermode et al. (1986), durante o processo de desenvolvimento podem ocorrer quatro fases nas sementes: a fase I envolve a divisão celular; a fase II compreende a expansão celular e a deposição de reservas; a fase III é determinada pela secagem e redução do metabolismo; e a fase IV é caracterizada por um estado quiescente ou dormente.

A perda de água durante a maturação das sementes é um processo normal durante a fase III do desenvolvimento de sementes de muitas espécies e é na fase IV que o grau de umidade da semente se estabiliza. Nesta fase, algumas espécies de sementes podem sobreviver na condição desidratada por alguns dias ou vários anos sem perder sua viabilidade. Entretanto, existe um grupo de sementes que ao final da maturação não é capaz de tolerar a perda de água e, portanto, não atinge a fase IV, tendo que manter um conteúdo relativamente alto de água para se continuar viável (BEWLEY; BLACK, 1994).

Segundo Alpert (2005), a tolerância à dessecação pode ser definida como a capacidade de certos organismos em lidar com a perda extrema de água abaixo de $0,1 \text{ g H}_2\text{O.g}^{-1}$ de massa seca e secar até o equilíbrio com o ar, e em seguida retomarem as suas funções normais quando reidratadas. Dentre as espécies de espermatófitos, essa característica é fato raro nos órgãos vegetativos, porém é comum nas sementes e em grãos de pólen (GAFF; OLIVER, 2013).

A tolerância à dessecação em sementes na maioria das espécies é adquirida progressivamente ao longo do desenvolvimento e ocorre em graus

variados, ocupando um intervalo que vai de tolerante à dessecação a sensibilidade à dessecação (FRANCHI et al., 2011). Sendo assim, de acordo com o nível de tolerância à dessecação e longevidade, as sementes são classificadas como ortodoxas, recalcitrantes e intermediárias.

As sementes ortodoxas suportam a desidratação a baixos níveis de umidade, geralmente em até 5%, e podem ser armazenadas por longos períodos de tempo a baixas temperaturas (subzero). Por outro lado, as sementes classificadas como recalcitrantes apresentam um comportamento oposto ao das ortodoxas, ou seja, são sensíveis à desidratação e perdem rapidamente a viabilidade quando submetidas a essas condições (ROBERTS, 1973). Já as sementes intermediárias toleram a desidratação em até 10% do seu conteúdo de água e podem ser armazenadas por períodos de curto a médio prazo (ELLIS; HONG; ROBERTS, 1990).

Liu et al. (2008) e Gaff e Oliver (2013), em seus estudos sobre a evolução da tolerância à dessecação em sementes de angiospermas, observaram que das espécies investigadas até então, 95% (6.703 espécies) produzem sementes ortodoxas; 4% (281 espécies) produzem sementes recalcitrantes e apenas 1% (72 espécies) produz sementes intermediárias.

2.2 Taxa de secagem em sementes

A taxa de secagem influencia na resposta à desidratação de sementes, principalmente daquelas sensíveis à desidratação. Os danos ocasionados pela remoção de água nessas sementes estão sujeitos a diversos fatores, sendo que a velocidade e a temperatura de secagem são determinantes, afetando amplamente as respostas das sementes a desidratação (REGO et al. 2013). A temperatura utilizada na secagem pode provocar alterações na membrana celular, desnaturar

proteínas, gerar modificações nas mitocôndrias e aumentar a lixiviação de material celular (CAVARIANI, 1996).

Com relação à velocidade de secagem, existem trabalhos divergentes na literatura, porém, as velocidades descritas como rápidas ou lentas podem pertencer a escalas temporais muito diferentes – o que pode estar relacionado com as condições em que as sementes estão expostas.

Os estudos evidenciam que quanto mais rápida a secagem, mais baixo é o conteúdo de água que as sementes podem tolerar antes que a viabilidade seja comprometida, ao passo que, quando a secagem é realizada lentamente, as sementes ficam expostas por mais tempo a conteúdos de água que possibilitam a ocorrência de reações deletérias, decorrentes do metabolismo desregulado. Contudo, independentemente da velocidade de secagem, as sementes sensíveis à dessecação quando submetidas à desidratação abaixo de certos limites não sobrevivem (PAMMENTER et al., 1998).

Embora a secagem rápida permita muitas vezes a desidratação de sementes sensíveis a teores de água mais baixos, isto não resulta em indução à tolerância à dessecação. É possível que neste tipo de secagem ocorra a paralisação da atividade bioquímica, bem como das reações degradativas que comumente resultam na perda da viabilidade (BERJAK et al., 1993).

De modo geral, a desidratação de sementes permite a redução de água para níveis adequados, garantindo, assim, o seu armazenamento. Portanto, é importante estabelecer a melhor velocidade de secagem para não comprometer a viabilidade das sementes.

2.3 Danos causados por secagem em sementes

Diferentemente do que ocorre nas sementes ortodoxas, as sementes sensíveis à desidratação apresentam elevado conteúdo de água no momento em

que são dispersadas da planta-mãe e também grande variação nas respostas com relação ao processo de desidratação a que estas são submetidas. Por exibirem elevado conteúdo de água, alguns danos relacionados à desidratação podem ser observados, como: 1) danos mecânicos relacionados à redução do volume celular, este geralmente verificado em sementes com células altamente vacuolizadas; 2) estresse oxidativo resultante do metabolismo desregulado, decorrente da secagem lenta; 3) e dano biofísico às estruturas macromoleculares, consequente da desidratação rápida (BERJAK; PAMMENTER, 2000, 2008; FARRANT, 2000).

Os altos níveis de estresse oxidativo durante a desidratação das sementes resultam em danos ao DNA, incluindo modificação da base e rupturas da cadeia (DANDOY et al., 1987), bem como na redução da integridade do DNA. Marcos-Filho (2005) relata ainda que os danos ao DNA comprometem a síntese do RNA e proteínas, o que pode causar um processo de transcrição defeituoso na mensagem genética. O dano ao genoma decorrente da exposição das sementes a secagem torna-se ainda mais intenso em sementes sensíveis à desidratação.

A avaliação dos danos causados pela remoção de água em sementes pode ser realizada utilizando-se de diferentes técnicas, das quais se destacam a microscopia e mais recentemente a espectroscopia do infravermelho próximo. A utilização de técnicas que sejam rápidas e precisas na identificação de danos causados durante o processo de secagem é de grande importância para a avaliação da qualidade da semente.

2.4 Espectroscopia do infravermelho próximo – NIRS

O termo espectroscopia se refere à interação de qualquer tipo de radiação eletromagnética com a matéria (PASQUINI, 2003). Descoberto pelo astrônomo Sir William Herschel em 1800 (SHEPPARD, 2002), o espectro do

infravermelho próximo – NIRS (*Near Infrared Spectroscopy*) está logo depois da região visível do espectro e se estende de 750 a 2500 nm ou de 12500 a 4000 cm^{-1} (PASQUINI, 2003).

O princípio de funcionamento desta técnica consiste em adquirir informação qualitativa e/ou quantitativa proveniente da interação das ondas eletromagnéticas do infravermelho próximo com as ligações moleculares da amostra. Assim, em qualquer molécula que apresente as ligações -CH, -OH, -NH, -SH e C=O é possível captar as interações usando a técnica NIRS (PASQUINI, 2003), pois as faixas de absorção mais proeminentes que ocorrem na região do infravermelho próximo apresentam combinações de vibrações fundamentais desses grupos funcionais (BOKOBZA, 2002; CIURCZAK, 2001). Portanto, os espectros obtidos de cada amostra permitem a identificação desses grupos funcionais, uma vez que cada molécula possui uma região de absorção conhecida como sua identidade estrutural (DÉLÉRIS; PETIBOIS, 2003).

A técnica NIRS pode ser aplicada tanto no modo de refletância e transmitância quanto na absorbância (WILLIAMS; SOBERING, 1992). Mas, segundo Agelet et al. (2012), para a análise agrícola os modos de transmitância e refletância são os mais utilizados. No modo de transmitância, a radiação incide sobre a amostra e uma parte desta é absorvida pelos compostos orgânicos, enquanto a outra parte restante atravessa a amostra e é medida por um sensor. Já a medida de refletância é baseada na detecção da radiação refletida de forma difusa que penetra a uma profundidade de poucos milímetros na amostra.

A tecnologia NIRS não é destrutiva, é de rápida execução, econômica, ambientalmente segura e possibilita a estimativa simultânea de vários traços em uma única medição, o que a torna ideal para avaliar a qualidade de sementes (SATO et al., 1995; SHENK; WESTERHAUS, 1993). No entanto, apesar de ser uma técnica de análise bastante avançada, sua eficácia depende dos métodos

analíticos tradicionais (também conhecidos como métodos de referência) para a calibração (SANTOS; SANTOS; KORNDÖRFER, 2012).

A calibração tem como objetivo produzir e ajustar um modelo que melhor represente ou relacione os dados espectrais com os dados de referência obtidos pelo método analítico convencional realizado em laboratório (PANTOJA, 2006). Para a construção das curvas de calibração, pode-se utilizar diferentes métodos, tais como: regressão linear múltipla (MLR); regressão de componente principal (PCR) e mínimos quadrados parciais (PLS).

Uma vez desenvolvido o modelo de calibração, ele deve ser devidamente validado. A validação do modelo pode ser processada de duas maneiras: validação cruzada e validação externa (MARTENS; NAES, 1996). Na validação cruzada as amostras são as mesmas usadas no teste de calibração e é recomendada quando se trabalha com poucas amostras. Já a validação externa utiliza-se de amostras diferentes do conjunto das amostras de calibração e é recomendada quando se tem um número maior de amostras (SOTELO, 2006). O uso de estatísticas de validação adequadas é extremamente importante para relatar o desempenho da calibração e definir seu uso futuro.

De acordo com Hein et al. (2009), uma vez calibrado e validado (testado) o modelo, qualquer material pode ter suas propriedades preditas rapidamente a partir da informação contida nos espectros medidos na espectroscopia NIR, sem a necessidade de medições padronizadas. Contudo, quando se trata de sementes e grãos, depois de algum tempo, a calibração poderá necessitar de novas atualizações, pois é provável que surjam novas fontes de variações, como a variabilidade devido ao campo, novas variedades e mudanças ambientais. Dessa forma, a precisão das calibrações no NIR será determinada pela qualidade dos dados do laboratório de referência (AGELET; HURBURGH-JR, 2014).

A primeira aplicação do NIRS como método analítico foi no início da década de 1960 por Karl Norris para determinar a umidade em sementes e grãos (HART; NORRIS; GOLUMBIC, 1962; NORRIS; HART, 1965). Desde então, essa técnica vem sendo largamente utilizada para os mais diversos estudos (TABELA 1) em sementes de diferentes espécies. Os trabalhos mostram que a partir da técnica NIR foi possível classificar corretamente a viabilidade das sementes, utilizando-se de diferentes análises e comprimento de onda.

Tabela 1 - Resumo de trabalhos relacionando à técnica NIRS e sementes

Referência	Utilização do NIR	Comprimento de onda	Análise/modelo	Viáveis		Não-viáveis		% sementes classificadas corretamente / R ²	
				Milho	Soja	Milho	Soja	Milho	Soja
Agelet et al. (2012)	Analisar os danos e viabilidade dos grãos de soja e milho.	-----	PLS-DA	44 (82)	37 (80)	80 (242)	142 (299)	61,7%	52,8%
			SIMCA	32 (82)	16 (80)	126 (242)	247 (299)	51,2 %	36,6%
			LS-SVM	43 (82)	35 (80)	124 (242)	133 (299)	48,5%	55,7%
			K-NN	42 (82)	44 (80)	119 (242)	120 (299)	50,3%	56,7%
Olesen et al. (2011)	Classificar sementes viáveis e não viáveis de <i>Spinacia oleracea</i> L.	1100 – 1388 nm	ECVA	-----	-----	Entre 98,3% e 91,1%			
		909 – 1428 nm				Entre 96,5% e 89,5%			
Shrestha, Deleuran e Gislum (2017)	Classificar sementes de <i>Solanum lycopersicum</i> L. viáveis e não viáveis de duas cultivares.	900 a 2250 nm	PLS-DA	263 (284)	13 (16)	86,9%			
		1160–1170, 1383–1397, 1647–1666, 1860–1884 e 1915–1940 nm	iPLS-DA			266 (284)	15 (16)	93,7 %	

Tabela 1 continua...

Jia et al. (2016)	Analisar a viabilidade dos grãos de milho danificados por geada.	9000 cm ⁻¹ a 4000 cm ⁻¹	OLDA			
			SVM	48 (55)	143 (145)	94,0%
			BPR	52 (55)	145 (145)	97,3%
			MD	48 (55)	133 (145)	90,0%
Song et al. (2015)	Investigar o efeito da irradiação de raios γ nas sementes de arroz irradiadas.	4000 a 8700 cm ⁻¹	PLS	-----	-----	R ² = 0,7148
Tigabu e Odén (2003)	Discriminar sementes viáveis e vazias de <i>Pinus patula</i> .	1100 a 2360 nm (modo de refletância) 850 a 1048 nm (modo de transmitância)	-----	-----	-----	92%
						100%
Shetty et al. (2012)	Discriminar os diferentes tamanhos de sementes de <i>Spinacia oleracea</i> L. para prever a capacidade de germinação e o comprimento da plântula.	395, 430, 450, 470, 505, 565, 590, 630, 645, 660, 700, 850, 870, 890, 910, 920, 940, 950 e 970 nm	PLS-DA	-----	-----	Pequena: 58,0% Média: 70,7% Grande: 27,0%

Tabela 1 continua...

Santos et al. (2014)	Discriminar sementes diferentes cultivares de mamona	de	1100-2500 nm	SIMCA PLS-DA	-----	-----	----- 100 %
Kandpal et al. (2016)	Prever a viabilidade e vigor (em períodos de germinação) em sementes de melão japonês.		948-2494 nm	PLS – DA VIP SR sMC	-----	-----	93,4% 93,6% 94,6% 88,1%
Shrestha et al. (2016)	Avaliar a viabilidade das e a variação nos lotes de sementes de <i>Solanum lycopersicum</i> L.	a	975 a 2500 nm	PLS-DA Training set Cross validation Test set	-----	-----	Amostras agrupadas 38 a 85% 30 a 82% 34 a 88%

Legenda: (valores entre parênteses nas colunas viáveis e não viáveis correspondem ao total de sementes usadas para a validação do modelo). Análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA); Modelagem independente suave de analogia de classe (SIMCA); K-vizinhos mais próximos (K-NN); Máquinas de vetores de suporte por mínimos quadrados (LS-SVM); Análise de variáveis canônicas ampliadas (ECVA); Análise discriminante por mínimos quadrados parciais por intervalo (iPLS-DA); Modelagem suave independente por analogia de classe (SIMCA); Análise discriminante linear ortogonal (OLDA); Máquina de vetores de suporte (SVM); Reconhecimento de padrões biomiméticos (BPR); Distância Mahalanobis (MD); Mínimos quadrados parciais (PLS); Erro quadrático médio da predição (RMSEP); Variável importante em projeção (VIP); Taxa de seletividade (SR); Correlação multivariada de significância (sMC).

Fonte: Da autora (2018).

2.5 Caracterização da espécie

Conhecida popularmente como pitangueira, *Eugenia uniflora* L. é uma frutífera nativa que tem ocorrência desde o Brasil central até o norte da Argentina e tem sido amplamente disseminada por outras regiões tropicais e subtropicais do mundo (WILLIAMS; CHEW; RAJARATNAM, 1987).

Eugenia uniflora L. é uma mirtácea e se apresenta como um arbusto ou árvore semidecídua, heliófita de 4 a 12 m de altura; com copa estreita e tronco liso de cor pardo claro; rebrota intensamente das raízes e produz, anualmente, grande quantidade de frutos com sementes viáveis com dispersão zoocórica. Floresce entre agosto e novembro com frutos maduros entre outubro e janeiro. Suas folhas são simples, cartáceas, de 3 a 7 cm de comprimento e possuem um aroma característico. As flores são de cor branca, solitárias ou em grupos de 2-3 nas axilas e nas extremidades dos ramos. Os frutos são globosos e sulcados, brilhantes e de cor amarela, vermelha ou preta, com polpa carnosa e agridoce, contendo de 1 a 2 sementes (LEGRAND; KLEIN, 1969; LORENZI, 2002; LORENZI; MATOS, 2002).

A pitanga é utilizada no paisagismo e cultivada em pomares domésticos, sendo sua madeira empregada na confecção de instrumentos agrícolas (LORENZI, 1998). Já seus frutos são utilizados para diferentes finalidades, como a produção de polpas, doces, geleias, licores e, principalmente, consumo *in natura*. A pitanga é recomendada também para reflorestamentos, principalmente para áreas degradadas, devido seu fruto ser atrativo e servir de alimento para a avifauna (SCALON et al., 2001). Além disso, é descrita e estudada por apresentar diversas propriedades medicinais (AURICCHIO et al., 2007). Tais características conferem à espécie importância econômica e ecológica, o que requer a aquisição de sementes com máxima qualidade fisiológica para a produção de mudas (AVILA et al., 2009).

De acordo com Delgado e Barbedo (2007), as sementes de pitanga são sensíveis à desidratação. Sementes com esta característica não passam pela fase de dessecação no processo de maturação, e são dispersas com elevado grau de umidade (BERJAK; PAMMENTER, 2000). As sementes de pitanga são consideradas de baixa longevidade, sendo sua semeadura recomendada imediatamente após a coleta (LORENZI, 2002). Segundo Longhi (1995), o poder germinativo de sementes de pitanga começa a decrescer entre 15 e 20 dias após colheita.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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, p. 160-165, 2012.

AGELET, L. E.; HURBURGH-JR, C. R. Limitations and current applications of near infrared spectroscopy for single seed analysis. **Talanta**, v. 121, p. 288-299, 2014.

ALPERT, P. The limits and frontiers of desiccation-tolerant life. **Integrative and Comparative Biology**, v. 45, p. 685-695, 2005.

AURICCHIO, M. T. et al. Atividades antimicrobiana e antioxidante e toxicidade de *Eugenia uniflora*. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 1, p. 76-8, 2007.

AVILA, A. L. de. et al. Maturação fisiológica e coleta de sementes de *Eugenia uniflora* L. (pitanga). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 19, n. 1, p. 61-68, 2009.

BERJAK P. et al. Current understanding of desiccation-sensitive (recalcitrant) seeds: Development, states of water and responses to dehydration and freezing. In: CÔME, D.; CORBINEAU, F. (Eds.). **Proceedings of the Fourth International Workshop on Seeds: Basic and applied aspects of seed biology**. Paris: ASFIS, 1993. p. 715-722.

BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W.: From Avicennia to Zizania: seed recalcitrance in perspective. **Annals of Botany**, v. 101, p. 213-228, 2008.

BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W. What ultrastructure has told us about recalcitrant seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, v. 12, n. (edição especial), p. 22-25, 2000.

BEWLEY, J.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. New York: Plenum Press, 1994.367 p.

BOKOBZA, L. Origin of near-infrared absorption bands. In: SIESLER, H. W et al. (Eds.). **Near Infrared Spectroscopy: principles, instruments, applications**. Weinheim: J. Wiley, 2002. p. 11-41.

CAVARIANI, C. **Secagem estacionária de sementes de milho com distribuição radial do fluxo de ar**. 1996. 85 p. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Esalq-USP, Piracicaba-SP, 1996.

CIURCZAK, E. W. Principles of near-infrared spectroscopy. In: BURNS, D. A.; CIURCZAK, E. W. (Eds.). **Handbook of Near-Infrared Analysis**. 2. ed. New York/Basel: Marcel Dekker, 2001. p. 7-18.

DANDOY, E. et al. Appearance and repair of apurinic/apurimidinic sites in DNA during early germination. **Mutation Research**, v. 181, p. 57-60, 1987.

DÉLÉRIS, G.; PETIBOIS, C. Applications of FT-IR spectrometry to plasma contents analysis and monitoring. **Vibrational Spectroscopy**, v. 32, p. 129-136, 2003.

DELGADO, L. F.; BARBEDO, C. J. Tolerância à dessecação de sementes de espécies de *Eugenia*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 2, p. 265-272, 2007.

ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERTS, E. H. An intermediate category of seed storage behaviour? **Journal of Experimental Botany**, v. 41, n. 230, p. 1167-1174, 1990.

FARRANT, J. M. A comparison of mechanisms of desiccation tolerance among three angiosperm resurrection plant species. **Plant Ecology**, v. 151, p. 29-39, 2000.

FRANCHI, G. G. et al. Pollen and seed desiccation tolerance in relation to degree of developmental arrest, dispersal, and survival. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 15, p. 5267-5281, 2011.

GAFF, D. F.; OLIVER, M. The evolution of desiccation tolerance in angiosperm plants: a rare yet common phenomenon. **Functional Plant Biology**, v. 40, p. 315-328, 2013.

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**, v. 39, p. 94-99, 1962.

HEIN, P. R. G. et al. Estimativa da resistência e da elasticidade à compressão paralela às fibras da madeira de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla* usando a espectroscopia no infravermelho próximo. **Scientia Forestalis**, v. 37, n. 82, p. 119-129, 2009.

JIA, S. et al. Feasibility of analyzing frost-damaged and non-viable maize kernels based on near infrared spectroscopy and chemometrics. **Journal of Cereal Science**, v. 69, p. 145-150, 2016.

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.

KERMODE, A. R. et al. The transition from seed development to germination: a key role for desiccation? **Hort Science**, v. 21, p. 1113-1118, 1986.

LEGRAND, C. D.; KLEIN, R. M. **Flora Ilustrada Catarinense**. I Parte: As Plantas. Fascículo: Mirtáceas. Planejada e editada por P. Raulino Reitz. Herbário Barbosa Rodrigues, Itajaí, 1969. 216 p.

LIU, K. **Seed information data base**. (Release 7.1, May 2008). Disponível em: <http://www.kew.org/data/sid>. Acesso em: 01 fev. 2017.

LONGHI, R. A. **Livro das árvores: árvores e arvoretas do Sul**. Porto Alegre: L & PM, 1995. 176 p.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 4 ed. Nova Odessa: Plantarum, 2002. 361 p.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 1998. 352 p.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil nativas e exóticas**. Nova Odessa: Plantarum, 2002. 512 p.

MARCOS-FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. v. 12. Piracicaba: Fealq, 2005. 495 p.

MARTENS, H.; NAES, T. **Multivariate calibration**. New York: J. Wiley, 1996. 155 p.

NORRIS, K. H.; HART, J. R. Direct spectrophotometric determination of moisture content of grain and seeds: humidity moisture. In: **Principles and methods of measuring moisture in liquids and solids**. New York: Reinhold Publishing Corporation, v. 4, p. 19-25, 1965.

OLESEN, M. H. et al. Classification of viable and non-viable spinach (*Spinacia oleracea* L.) seeds by single near infrared spectroscopy and extended canonical

variates analysis. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, v. 19, p. 171-180, 2011.

PAMMENTER, N. W. et al. Effects of differential drying rates on viability retention of recalcitrant seeds of *Ekebergia capensis*. **Seed Science Research**, v. 8, p. 463-471, 1998.

PANTOJA, P. A. **Aplicação da espectroscopia de infravermelho próximo na caracterização da carga de petróleo para o processo de destilação atmosférica**. 2006. 91p. Dissertação (Mestrado em Engenharia) – Universidade de São Paulo-SP, 2006.

PASQUINI, C. Review near infrared spectroscopy: fundamentals, practical aspects and analytical applications. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 14, n. 2, p. 198-219, 2003.

REGO, S. S. et al. Physiological behavior of *Blepharocalyx salicifolius* and *Casearia decandra* seeds on the tolerance to dehydration. **Journal of Seed Science**, v. 35, p. 1-3, 2013.

ROBERTS, E. H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 1, n. 4, p. 499-514, 1973.

SANTOS, G. A.; SANTOS, A. P, dos.; KORNDÖRFER, G. H. Sistema por infravermelho próximo (NIR) para análises de nitrogênio foliar. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 28, n. 1, p. 83-90, 2012.

SANTOS, M. B. H. et al. Non-destructive NIR spectrometric cultivar discrimination of castor seeds resulting from breeding programs. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 5, p. 969-974, 2014.

SATO, T. et al. Nondestructive determination of fatty acid composition of husked sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds by near-infrared spectroscopy. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 72, p. 1177-1183, 1995.

SCALON, S. de. P. Q. et al. Germinação e crescimento de mudas de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) sob condições de sombreamento. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal-SP, v. 23, n. 3, p. 652-655, 2001.

SHENK, J.; WESTERHAUS, M. **Analysis of agriculture and food products by near infrared reflectance spectroscopy**. Port Matilda: Penn State University and Infrasoft International, 1993. 116 p.

SHEPPARD, N. The historical development of experimental techniques in vibrational spectroscopy. In: CHALMERS J. M.; GRIFFITHS, P. R. (Eds.). **Handbook of vibrational spectroscopy**. Chichester: J. Wiley, 2002. chpt. 1, p. 1-43.

SHETTY, N. et al. Use of partial least squares discriminant analysis on visible-near infrared multispectral image data to examine germination ability and germ length in spinach seeds. **Journal of Chemometrics**, v. 26, p. 462-466, 2012.

SHRESTHA, S. et al. Single seed near-infrared hyperspectral imaging in determining tomato (*Solanum lycopersicum* L.) seed quality in association with multivariate data analysis. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 237, p. 1027-1034, 2016.

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.

SONG, L. et al. Effect of γ -irradiation on rice seed vigor assessed by near-infrared spectroscopy. **Journal of Stored Products Research**, v. 62, p. 46-51, 2015.

SOTELO, F. F. **Aplicação da espectroscopia de infravermelho próximo na caracterização de petróleo: simulação de uma unidade de destilação atmosférica**. 2006. 154p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade de São Paulo-SP, 2006.

TIGABU, M.; ODÉN, P. C. Discrimination of viable and empty seeds of *Pinus patula* Schiede & Deppe with near-infrared spectroscopy. **New Forests**, v. 25, p. 163-176, 2003.

WILLIAMS, C. N.; CHEW, W. Y.; RAJARATNAM, J. A. **Tree and field crops of the wetter regions of the tropics**. Harlow, England: Longman Scientific & Technical, 1987. 272 p.

WILLIAMS, P. C.; SOBERING, D. C. Objective prediction of functionality by near infrared technology. In: I. MURRAY, I.; COWE, I. A. (Eds.). **Making light work: advances in near infrared spectroscopy**. Weinheim, Germany: Ian Michael Publ., 1992. p. 217-222.

CAPÍTULO 2

DESSECAÇÃO EM SEMENTES DE PITANGA (*Eugenia uniflora* L.)

RESUMO

Para a obtenção de mudas de qualidade é importante a determinação da qualidade das sementes. Com este trabalho, objetivou-se avaliar possíveis danos por secagem em sementes de pitanga (*Eugenia uniflora* L.) quando secadas a diferentes níveis de umidade em sílica gel (secagem rápida) e em cloreto de sódio (secagem lenta). A secagem rápida reduziu o conteúdo de água inicial das sementes de pitanga de 60,4% para 15,6% em 25 dias, ao passo que, na secagem lenta foram necessários 79 dias para essa mesma redução do conteúdo de água. Independentemente da velocidade de secagem utilizada, foi o grau de umidade que comprometeu a germinação. O resultado do teste de condutividade elétrica atingiu o valor máximo de $27,9 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ nas sementes recém coletadas e após a desidratação até 15% de umidade, houve decréscimo do valor de condutividade para $15,0 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ em secagem rápida e $1,9 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ em secagem lenta. Verificou-se degradação de amido quando as sementes de pitanga atingiram grau de umidade abaixo de 28%. Não foi observada degradação do DNA durante o processo de desidratação.

Palavras-chave: Secagem. Sementes sensíveis. Taxa de secagem. Desidratação.

1 INTRODUÇÃO

A capacidade de sobreviver em estado seco, por longos períodos, ocorre em diversas plantas, animais e microrganismos. Especificamente no caso das sementes, o estado dessecado possibilita que estas sejam armazenadas e disseminadas amplamente (ALPERT, 2005). A desidratação é um procedimento necessário para a conservação das sementes ortodoxas, porém, a remoção de água em sementes sensíveis à desidratação pode causar danos ao metabolismo e levar a perda da viabilidade.

A velocidade de secagem em sementes sensíveis a desidratação pode estar relacionada à extensão da perda de água tolerada. Segundo Pammenter et al. (1998), os danos por secagem em sementes sensíveis podem ser reduzidos a partir da taxa de secagem utilizada na desidratação. De acordo com esses autores, quanto mais rápida for a desidratação, mais baixo será o teor de água que essas sementes poderão tolerar antes que a viabilidade seja comprometida; ao passo que a secagem realizada lentamente expõe as sementes por mais tempo a conteúdos de água que causam a ocorrência de reações deletérias, decorrentes do metabolismo desregulado.

Nos últimos anos, vários trabalhos têm relacionado a taxa de secagem em função das respostas das sementes durante o processo de dessecação. Coelho et al. (2015), avaliando o efeito da secagem em sementes de *Coffea arabica* L., verificaram que as sementes secas rapidamente toleraram teores finais de água mais baixos, porém, as sementes submetidas a secagem lenta apresentaram maior qualidade em teores de água mais elevados. Magistrali et al. (2013), estudando o efeito da secagem lenta em sementes de *Genipa americana* L., verificaram que tal método de desidratação propiciou aumento na capacidade de dessecação e tolerância ao armazenamento das sementes. Já Tanaka et al. (2016), avaliando o efeito da secagem em sementes de *Ocotea puberula* (Rich.), concluíram que o tipo de secagem não influencia a qualidade dessas sementes.

As sementes de pitanga (*Eugenia unifora* L.) são dispersas com alto teor de água, são sensíveis à dessecação (DELGADO; BARBEDO, 2007) e são consideradas de baixa longevidade, sendo sua semeadura recomendada imediatamente após a coleta (LORENZI, 2002). A desidratação de sementes sensíveis como a pitanga pode ocasionar alguns danos às estruturas das células, acúmulo de radicais livres (PAMMENTER; BERJAK, 2000), perda da integridade do DNA, entre outros.

Neste sentido, a fim de compreender melhor o comportamento das sementes em relação à desidratação, se objetivou com este estudo avaliar os possíveis danos às sementes de pitanga expostas a diferentes velocidades de secagem e níveis de desidratação por meio de testes fisiológicos, histoquímico, condutividade elétrica e integridade do DNA.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta dos frutos e obtenção das sementes

O experimento foi realizado no Laboratório de Sementes Florestais (LSF) e no Laboratório de Biotecnologia Florestal (LBF) do Departamento de Ciências Florestais (DCF) da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

Frutos maduros de pitanga (*Eugenia uniflora* L.) foram coletados em outubro de 2016 em matrizes localizadas em Lavras – MG. Após a coleta dos frutos, o beneficiamento das sementes foi realizado de acordo com Davide, Faria e Botelho (1995), compreendendo maceração dos frutos em peneira sob água corrente para separação dos resíduos de frutos. Posteriormente, as sementes foram postas sobre papel toalha em uma bancada de laboratório e mantidas por 2 horas para remoção da água superficial.

2.2 Secagem das sementes

As sementes foram submetidas à desidratação em duas velocidades: secagem rápida e secagem lenta. A desidratação foi realizada em laboratório com temperatura de 20° C, em “caixas” do tipo higrostat, medindo 65 cm de comprimento x 50 cm de largura x 35 cm de altura, confeccionadas em plástico rígido, escuro, com sistema de ventilação interna para provocar fluxo de ar entre as sementes e o material dessecante. Em cada velocidade de secagem, foram

utilizados 2 kg do material dessecante que ficou depositado no fundo da caixa, abaixo de uma tela de modo a evitar o contato direto com as sementes.

A secagem rápida foi em sílica gel (SiO_2), que foi substituída ao decorrer da desidratação quando observada a mudança da coloração que indica alteração em sua umidade. Já a secagem lenta foi realizada em solução de cloreto de sódio (NaCl), preparada a partir da dissolução do sal em água até se obter uma solução saturada. Os valores de umidade relativa (UR) obtidos em testes preliminares foram de 75,3% na caixa com solução saturada de NaCl e, para a sílica gel, 15%, ambos à temperatura de 20° C.

Em ambas as velocidades de secagem, as sementes foram pesadas em intervalos para verificar o peso-alvo correspondente ao conteúdo de água – este determinado com base na fórmula proposta por Hong e Ellis (1996).

$$PA = \frac{100 - UI}{100 - UA} * PI$$

Em que, *PA*: peso alvo; *UI*: umidade inicial; *UA*: umidade alvo; *PI*: peso inicial.

2.3 Determinação do conteúdo de água

O conteúdo de água da semente de pitanga foi determinado antes da desidratação (controle), e após cada nível de desidratação alcançado nas duas velocidades de secagem. Em cada um dos tratamentos foram utilizadas quatro repetições de cinco sementes cortadas ao meio, colocadas em estufa a 105°C por 24 horas sob circulação forçada de ar, conforme estabelecido nas Regras para Análise de Sementes – RAS (BRASIL, 2009). O conteúdo de água foi expresso em percentual com base no peso úmido.

2.4 Testes de germinação

O teste de germinação foi realizado com sementes sem desidratação (controle) e, após cada nível de desidratação, alcançado nas duas velocidades de secagem. Os testes foram conduzidos em gerbox, entre areia esterilizada, em germinador do tipo *Mangelsdorf* a uma temperatura de 25° C sob luz constante. Em cada tratamento foram utilizadas cinco repetições de 20 sementes.

Visando a desinfestação superficial de microrganismos nas sementes, as mesmas foram previamente lavadas em solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a 2% por 1 minuto, com posterior enxague em água corrente. As avaliações das sementes foram realizadas diariamente, sendo contabilizadas ao final do teste as plântulas normais, anormais e sementes mortas.

2.5 Condutividade elétrica individual

Foram utilizadas 30 sementes de cada tratamento, pesadas individualmente em balança analítica com precisão de 0,001 g, colocadas para embeber, também individualmente, em copos plásticos (50mL) contendo 25mL de água deionizada, durante 24 h, a 25°C em câmara de germinação. Após o período de embebição, a condutividade elétrica da água deionizada e da solução foi determinada por meio de leitura em condutímetro DIGIMED, modelo CD 21. O valor de cada leitura de condutividade foi dividido pela respectiva massa da amostra e os resultados finais de condutividade elétrica foram expressos em $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ de sementes.

2.6 Integridade do DNA

Para avaliar o efeito da desidratação na integridade do DNA, 10 sementes de cada tratamento foram utilizadas para a extração do DNA. Para a

extração do DNA utilizou-se o Protocolo CTAB 2x (Ferreira e Grattapaglia, 1998), cujo tampão de extração é constituído por CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) 2%; NaCl 1,4 M; EDTA (ácido etilnodiaminotetracético) 20 mM; Tris- HCl (trishidroximetilaminometano) 100 mM pH 8,0; PVP (polivinilpirrolidona) 1% e 2- mercaptoetanol 0,2%.

As 10 sementes de pitanga de cada tratamento foram maceradas em nitrogênio líquido até se obter um pó fino. Em seguida, quatro repetições técnicas de cada tratamento foram colocadas em microtubos de 2 ml, previamente identificados, aos quais foram adicionados 700 µL de tampão de extração CTAB 2x. Depois, as amostras foram incubadas em banho-maria a 65°C por um período de 30 a 60 minutos, agitando os microtubos a cada 10 minutos. Posteriormente, foram adicionados 600 µL de CIA (clorofórmio-álcool isoamílico) na proporção de 24:1 (v/v) em cada amostra para a desproteíntização; os microtubos foram agitados por suaves inversões durante 5 minutos e centrifugados por 10 minutos a 12.000 rpm em microcentrífuga em temperatura ambiente. Logo após, o sobrenadante contendo o DNA foi transferido para novos microtubos, aos quais se adicionou 450 µL de isopropanol gelado.

As amostras nos microtubos foram mantidas no freezer por 24 h para a precipitação do ácido nucléico. Logo após, as amostras foram centrifugadas a temperatura de 4° C por 10 minutos a 12.000 rpm para a obtenção do pellet de DNA.

Posteriormente, o pellet obtido foi lavado duas vezes em 1mL de álcool etílico a 70% durante 5 minutos e uma vez em 1 mL de álcool etílico a 95% (ou absoluto) por 3 minutos para a retirada dos sais. Em seguida, foi adicionado 50 µL de TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM) aos microtubos com o pellet para solubilização do DNA.

Um volume de 5 μ L de cada amostra de DNA extraído foi utilizado para a análise da integridade por meio da eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com gel red. O gel foi visualizado sob luz ultravioleta e fotografado no Fotodocumentador DIGI-DOC ITTM para a visualização das bandas.

2.7 Análise histoquímica

As sementes de pitanga de cada velocidade de secagem e de cada nível de desidratação também foram submetidas à análise histoquímica. Dez sementes obtidas em cada tratamento foram fixadas previamente em FAA 70% (formaldeído + ácido acético glacial + álcool etílico 70%) na proporção de 5:5:90 (v/v) por 72 h e transferidas em seguida para álcool 70% em temperatura ambiente até a confecção das lâminas histológicas.

Posteriormente, as sementes foram seccionadas em cubos de aproximadamente 0,5 cm² e os cortes obtidos do lado oposto ao hilo, já que em sementes de pitanga o embrião não é visualizado com facilidade. Os cortes foram obtidos à mão livre com auxílio de lâmina de barbear, e, posteriormente, foram corados com reagente de Lugol para evidenciar reservas de amido, segundo a metodologia proposta por Johansen (1940). Para a obtenção das fotomicrografias, foi utilizado o microscópio biológico binocular Nikon Eclipse E100.

2.8 Análises estatísticas

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial duplo composto por duas velocidades de secagem e quatro graus de umidade, tendo sido realizado um quinto grau de umidade para as sementes submetidas à secagem rápida. Os dados foram submetidos ao teste de Tukey a 5% de probabilidade. Dados não normais foram analisados pelo método

GLM (Modelos Lineares Generalizados) através da distribuição binomial e, quando constatada diferença entre os tratamentos pelo teste Chisq, procedeu-se o teste LSD a 5% de probabilidade. Todas as análises foram feitas pelo *software* RStudio versão 1.1.383, sendo os gráficos elaborados por meio do programa Microsoft Office Excel.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Secagem e germinação das sementes

Na Tabela 1 são apresentados os valores de umidade alvo e a umidade obtida para cada velocidade de secagem. As sementes de pitanga apresentaram uma desidratação desuniforme. Em virtude desta irregularidade no processo de desidratação, foi difícil a obtenção das umidades-alvo desejadas.

Para verificar esta desuniformidade durante a desidratação, em novembro de 2017 foram coletadas sementes de pitanga e realizado o teste de umidade individualmente para cada semente quando estas atingissem o grau de umidade-alvo desejada, quando submetidas à desidratação em sílica gel nas mesmas condições dos primeiros testes. Na Figura 1, nota-se que as sementes de pitanga não apresentam desidratação uniforme, ainda que coletadas no mesmo período, com as mesmas características de maturação e sendo expostas às mesmas condições de desidratação.

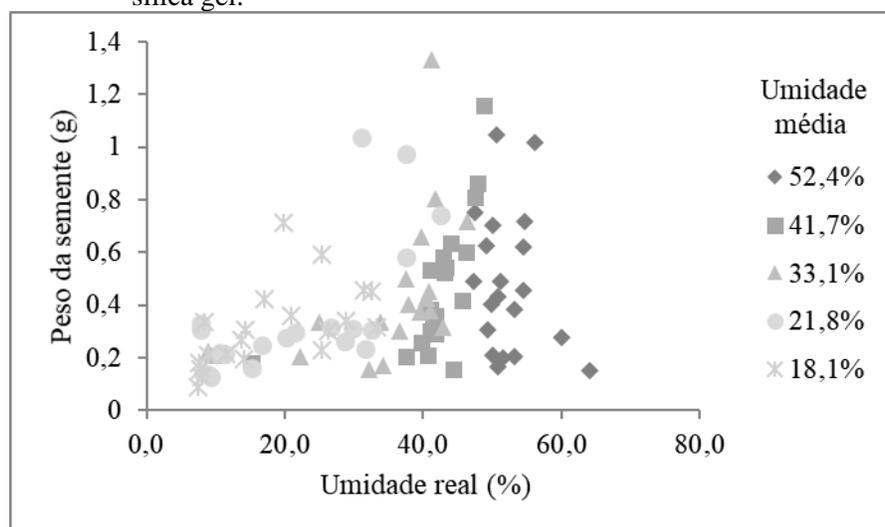
Tabela 1- Graus de umidade (% base úmida) alcançados durante a desidratação de sementes de pitanga (*Eugenia uniflora* L.).

Velocidade de secagem	Umidade inicial (%)	Umidade alvo (%)				
		50	40	30	20	10
Lenta	60,4	51,7	40,9	*	15,4	*
Rápida	60,4	48,9	36,7	27,6	15,6	*

*Umidade não alcançada.

Fonte: Da autora (2018).

Figura 1- Graus de umidade (% base úmida) individual de sementes de pitanga (*Eugenia uniflora* L.) obtidas durante a desidratação em sílica gel.



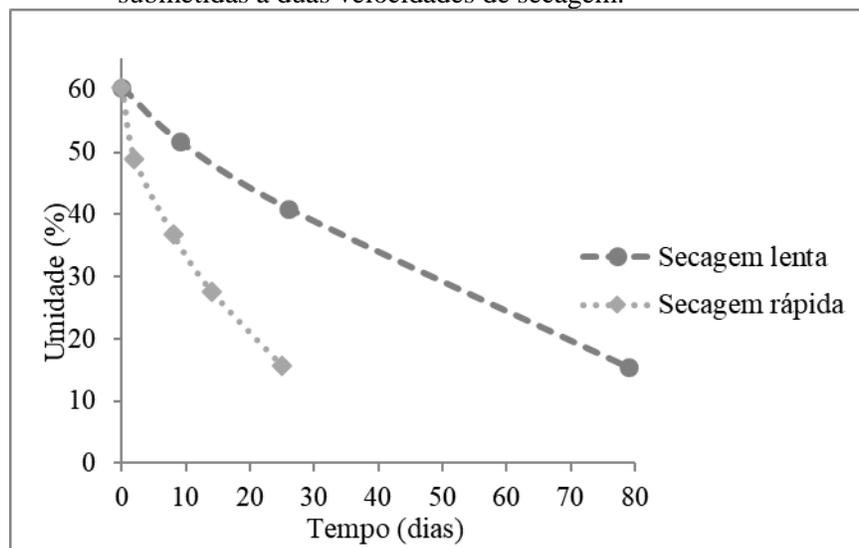
Fonte: Da autora (2018).

O conteúdo de água inicial das sementes de pitanga foi de 60,4%, valor próximo ao encontrado por Delgado e Barbedo (2007). A velocidade de secagem rápida permitiu a redução no conteúdo de água nas sementes de pitanga para 15,6% após 25 dias de secagem, enquanto que na secagem lenta foram necessários 79 dias para essa mesma redução (FIGURA 2).

Registrou-se porcentagem de germinação de 97%, 80% e 52% para sementes em secagem rápida com 48,9%, 36,7%, e 27,6% de umidade respectivamente, enquanto que na secagem lenta a porcentagem de germinação observada foi de 97% e 89% para 51,7% e 40,9% de umidade. Quando as sementes atingiram 15% de umidade, a germinação foi praticamente nula para as duas velocidades de secagem (FIGURA 3). O grau de umidade letal, ou seja, o que causa a perda total da capacidade germinativa das sementes, por sua vez, foi semelhante ao observado por Delgado e Barbedo (2007) quando avaliaram a tolerância à dessecação de sementes de seis espécies de *Eugenia*, incluindo a pitanga.

Diante dos resultados obtidos, verifica-se que o que afetou a germinabilidade das sementes de pitanga foi a umidade e não a velocidade de secagem.

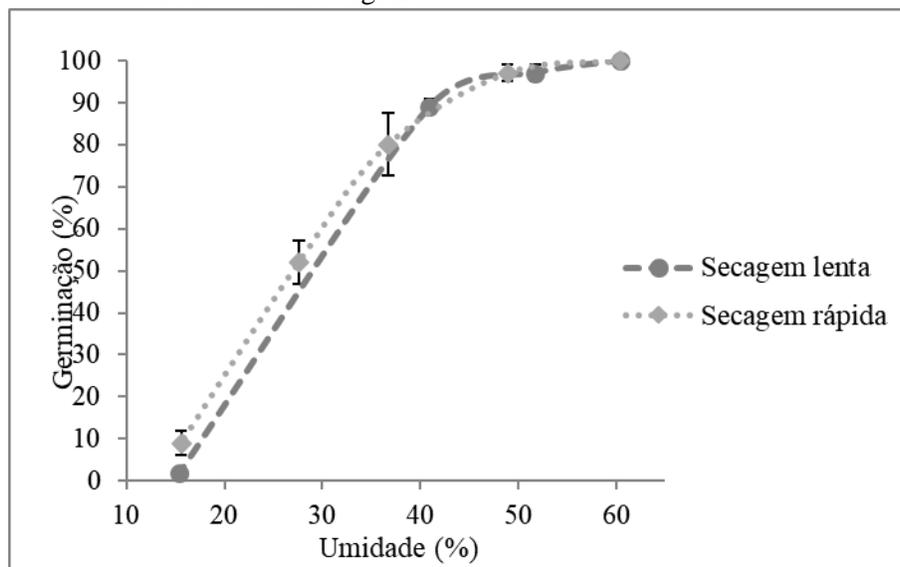
Figura 2 - Curva de secagem de sementes de pitanga (*Eugenia uniflora* L.), submetidas a duas velocidades de secagem.



Fonte: Da autora (2018).

A capacidade germinativa foi afetada negativamente à medida em que as sementes de pitanga foram secadas, principalmente nas sementes expostas a secagem lenta quando foi observada elevada percentagem de plântulas anormais (FIGURA 4 e TABELA 2). José et al. (2011), estudando o efeito da taxa de secagem em sementes de *Magnolia ovata* (A. St.-Hil.), constataram que a taxa de secagem afetou a germinação e o vigor das sementes, sendo a secagem lenta a que melhor manteve a alta viabilidade das sementes. A secagem lenta também foi relatada como a que melhor proporcionou a capacidade de tolerar a dessecação das sementes de *Genipa americana* L. (MAGISTRALI et al., 2013). Já as sementes de *Coffea arabica* L. (COELHO et al., 2015), toleraram teores finais de água mais baixos quando expostas a secagem rápida, porém, a qualidade das sementes desidratadas até teores mais elevados de água é menor do que a de sementes submetidas a secagem lenta.

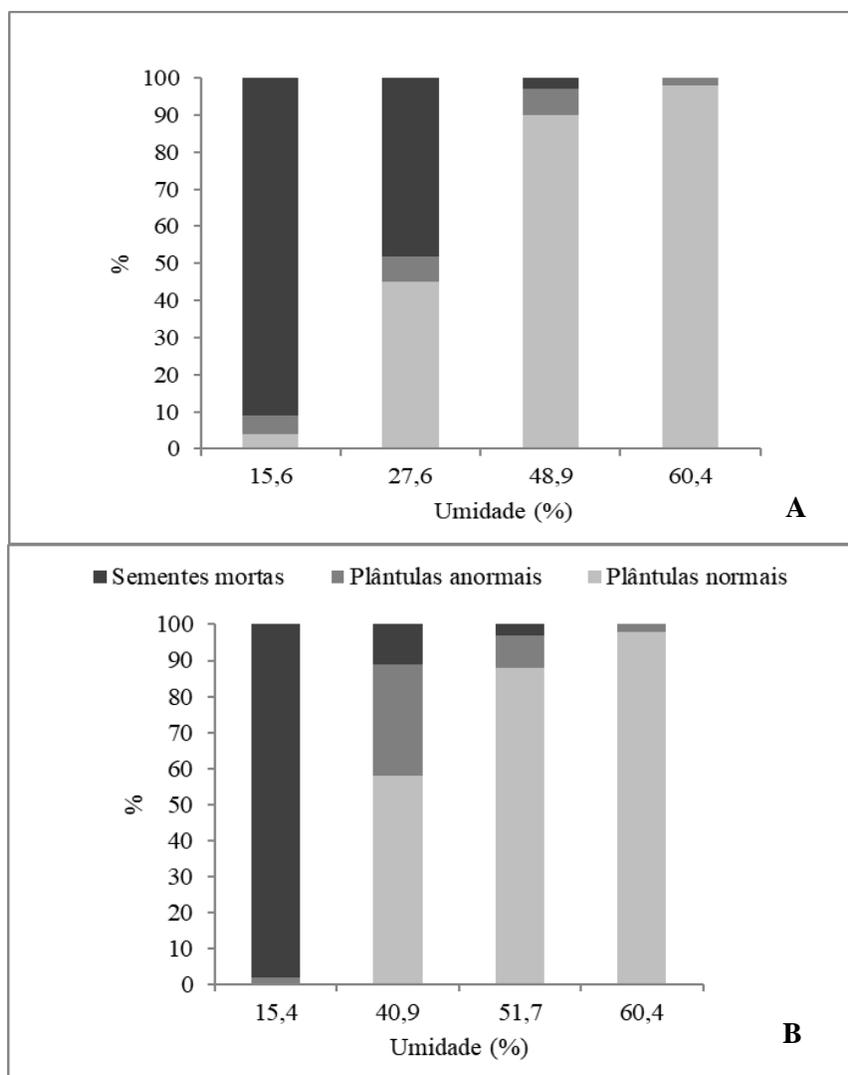
Figura 3 - Percentagem de sementes de pitanga (*Eugenia uniflora* L.) germinadas em diferentes níveis de desidratação, submetidas a duas velocidades de secagem.



Fonte: Da autora (2018).

Neste estudo, embora a velocidade de secagem não tenha influenciado a porcentagem de germinação, verifica-se que a secagem rápida propiciou maior porcentagem de plântulas normais (FIGURA 4). De acordo com Pammenter et al. (1998), a secagem rápida é um efetivo redutor de danos por perda de viabilidade, o que torna importante correlacionar os níveis críticos de água das sementes em que a viabilidade é comprometida ou perdida com a secagem. Ressalta-se ainda que mesmo a semente sensível à desidratação sendo submetida a secagem rápida, não adquirirá tolerância à dessecação e quando atingir teor de água letal para a retenção de sua viabilidade, não sobreviverá.

Figura 4 - Porcentagem de plântulas normais, anormais e sementes mortas de pitanga (*Eugenia uniflora* L.) com diferentes teores de água obtidos por duas velocidades de secagem. Figura A: sementes submetidas à secagem rápida. Figura B: sementes de pitanga submetidas à secagem lenta.



Fonte: Da autora (2018).

Tabela 2 - Porcentagem de plântulas normais, anormais e sementes mortas de pitanga (*Eugenia uniflora* L.), com diferentes teores de água submetidos ou não a secagem.

Umidade alvo (%)	60	50	40	30	20
Plântulas normais					
Secagem rápida	98 a	90 Ab	73 Ac	45 d	4Ae
Secagem lenta	98 a	88 Ab	58 Ac	*	0Ad
Plântulas anormais					
Secagem rápida	2a	7Aa	7Aa	7a	5Aa
Secagem lenta	2a	9Aa	31 Bb	*	2Aa
Sementes mortas					
Secagem rápida	0d	3Ad	20 Ac	48 b	91 Aa
Secagem lenta	0c	3Ac	11 Ab	*	98 Aa

Letras maiúsculas comparam médias entre as velocidades de secagem para grau de umidade próximo, e letras minúsculas comparam médias entre graus de umidade para uma mesma velocidade de secagem. * Não houve umidade próxima para a comparação.

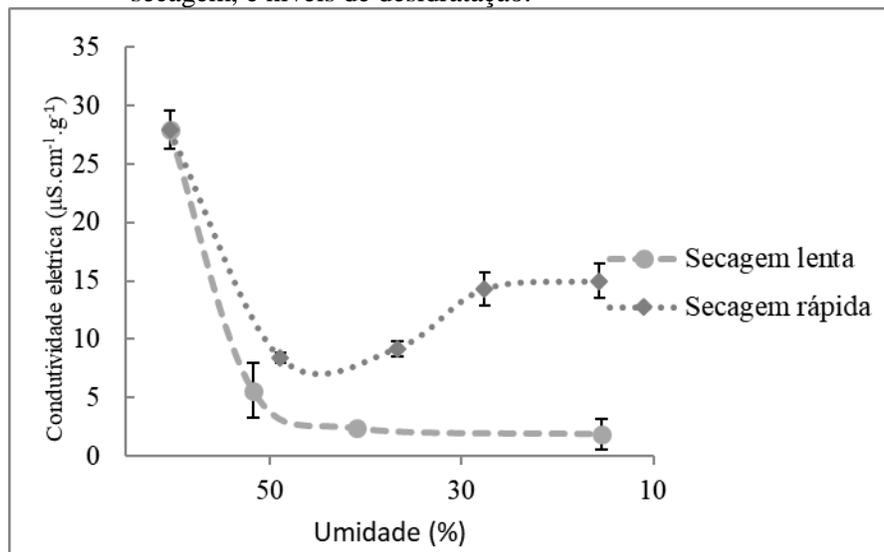
Fonte: Da autora (2018).

3.2 Danos causados pela secagem

O valor da condutividade elétrica das sementes de pitanga com 60,4% U foi de 27,9 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ e decresceu com a desidratação, sugerindo a existência de diferenças na permeabilidade das sementes ao longo do processo de desidratação (FIGURA 5). O maior aumento nos valores de condutividade elétrica foi observado em sementes secadas rapidamente à medida que reduzia o conteúdo de água, porém, estes aumentos não superaram o valor inicial de condutividade elétrica antes da desidratação.

As sementes submetidas à secagem lenta apresentaram os menores valores de condutividade. Este comportamento provavelmente ocorreu porque houve ligeira estruturação das membranas à medida que diminuía o conteúdo de água, tendo como consequência menor liberação de exsudatos (FIGURA 5).

Figura 5 - Condutividade elétrica ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$) de sementes de pitanga (*Eugenia uniflora* L.) submetidas a diferentes velocidades de secagem, e níveis de desidratação.



Fonte: Da autora (2018).

Silva et al. (2017) em seus estudos também observaram uma redução na condutividade elétrica em resposta à dessecação de aquênios de *Anacardium othonianum* Rizz.

Os danos causados por secagem ao sistema de membranas celulares podem ser estimados pela medição da condutividade elétrica, porém, neste estudo não foi possível correlacionar os valores obtidos no teste de condutividade elétrica com os tratamentos de desidratação aplicados. Para entender melhor este comportamento das sementes submetidas a desidratação no teste de condutividade elétrica, em 2017 foram coletadas sementes de pitanga, e estas foram submetidas à desidratação em sílica gel nas mesmas condições dos primeiros testes. Sementes recém-coletadas (52,4% U) apresentavam valores de condutividade de $19,3 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$, enquanto que as sementes secas (33,1% U e

18,1% U) exibiam valores de condutividade de $12,5 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ e $10,8 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ respectivamente, para sementes com tegumento, e $77,3 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ e $190,1 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ para sementes sem tegumento.

Sendo assim, diante dos resultados obtidos, sugere-se que a presença do tegumento influenciou nos resultados de condutividade elétrica das sementes de pitanga submetidas à desidratação. Além disso, foi observado que à medida que as sementes tinham o seu conteúdo de água reduzido, o tegumento apresentava-se mais enrijecido, provavelmente impedindo a completa submersão da semente durante o período de embebição. Silva et al. (2014), avaliando a influência do pericarpo no teste de condutividade elétrica em sementes de *Crambe abyssinica* Hochst submetidas a diferentes métodos de secagem, verificaram que a retirada do pericarpo antes do teste aumenta a confiabilidade da análise.

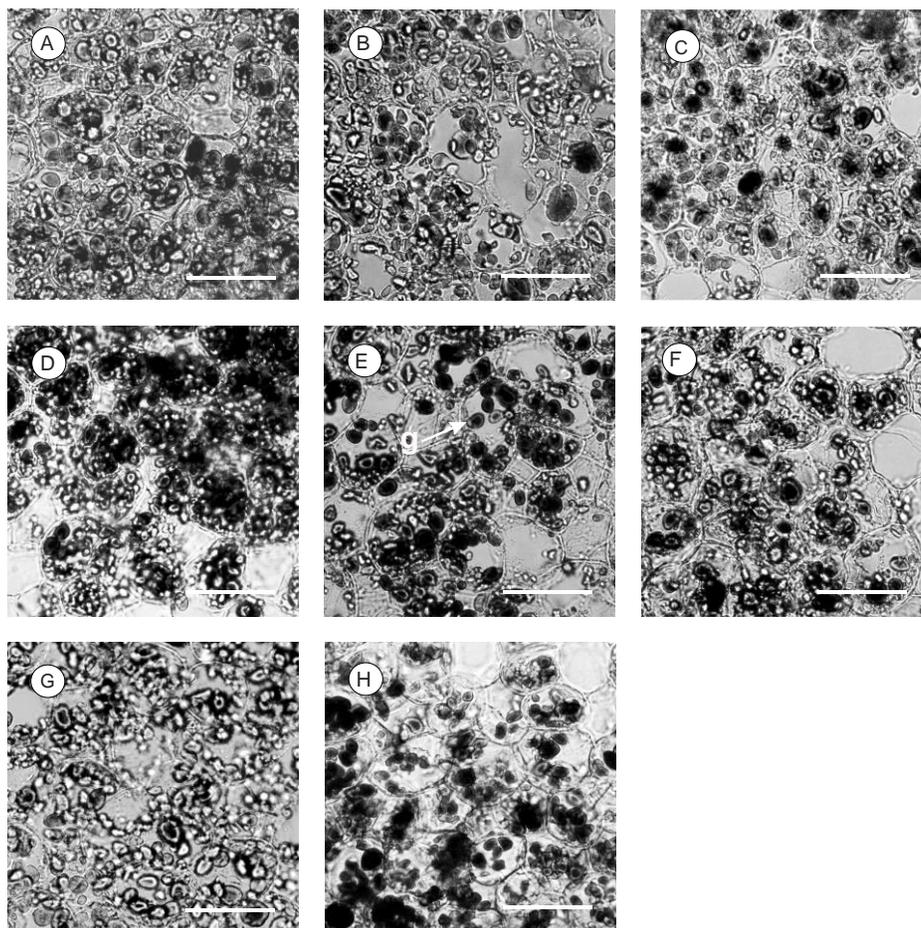
Com relação ao teste histoquímico, a partir das fotomicrografias, observou-se que aparentemente houve uma redução na quantidade de amido quando as sementes de pitanga atingiram umidade a partir de 27,6% (FIGURA 6). De modo geral, verifica-se grande quantidade de amido nas células das sementes de pitanga. Segundo Mello et al. (2010), tais sementes apresentam alta quantidade de amido, o que representa 64% de sua matéria seca.

Estudando a composição de carboidratos de sementes de *Inga vera* Willd. submetidas a desidratação e ao armazenamento, Mello et al. (2011) verificaram que a quantidade de amido alterou pouco com a dessecação das sementes, porém, quando as sementes estavam mortas, houve uma diminuição drástica na quantidade de amido.

A sensibilidade à dessecação está associada à ineficiência ou ausência de alguns mecanismos e/ou processos que estão presentes em tecidos tolerantes à dessecação, como nas sementes ortodoxas. A redução de água em sementes

sensíveis à desidratação pode causar danos ao sistema de membranas e a integridade do DNA.

Figura 6 - Fotomicrografias de sementes de pitanga (*Eugenia uniflora* L.) com diferentes teores de água, obtidos por diferentes velocidades de secagem.

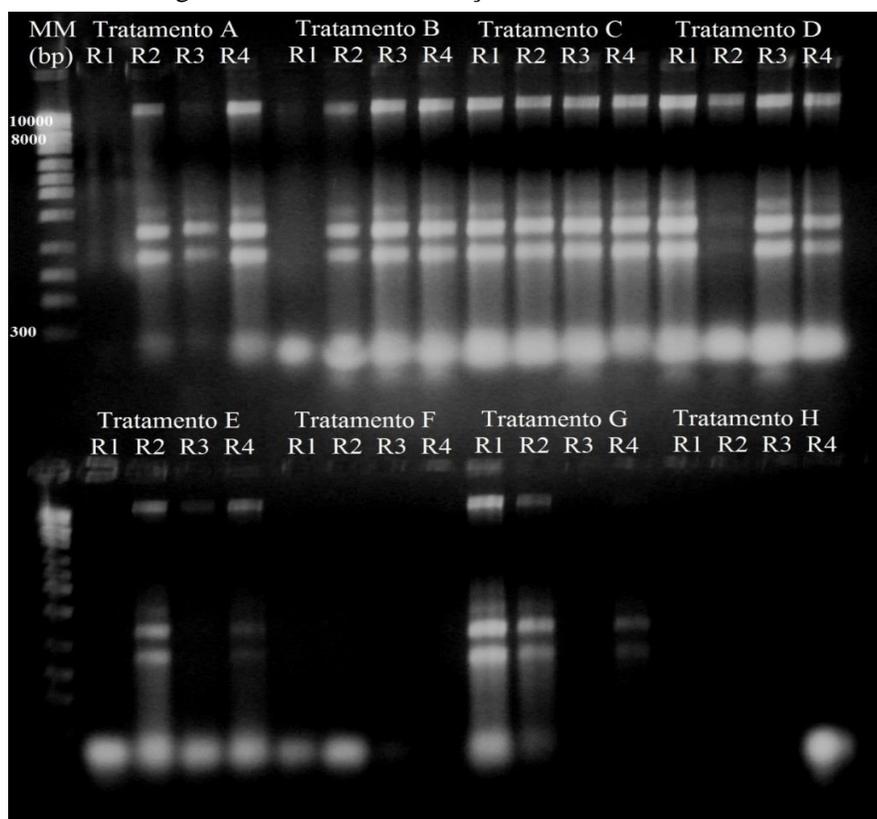


LEGENDA: (A): SF – 60,4% U; (B) SSR – 48,9% U; (C) SSR – 36,7%; (D): SSL – 51,7% U; (E) SSR – 27,6% U; (F) SSR – 15,6% U; (G) SSL – 40,9% U; (H) SSL – 15,4% U. SF: sementes frescas sem secagem; SSR: sementes em secagem rápida; SSL: sementes em secagem lenta. As barras nas imagens equivalem a 50 µm. Seta indica grão de amido.

Fonte: Da autora (2018).

Neste estudo, a análise da integridade do DNA em sementes de pitanga expostas a desidratação evidencia que aparentemente não houve degradação do DNA. Este resultado pode ser observado no gel de agarose, onde o DNA se apresenta íntegro, sem fragmentações ou arraste vertical característico da degradação do DNA (FIGURA 7).

Figura 7 - Gel de agarose (1%) de DNA genômico extraído de sementes de pitanga (*Eugenia uniflora* L.) submetidas a diferentes velocidades de secagem e níveis de desidratação.



LEGENDA: (A): SF – 60,4% U; (B) SSR – 48,9% U; (C) SSR – 36,7%; (D): SSL – 51,7% U; (E) SSR – 27,6% U; (F) SSR – 15,6% U; (G) SSL – 40,9% U; (H) SSL – 15,4% U. SF: sementes frescas sem secagem; SSR: sementes em secagem rápida; SSL: sementes em secagem lenta. MM: marcador molecular; bp: pares de base. R: repetição

Fonte: Da autora (2018).

Masetto et al. (2008), avaliando a tolerância à dessecação e integridade do DNA em sementes de *Eugenia pleurantha* (O. Berg) expostas a secagem, verificaram degradação do DNA nas sementes onde a germinabilidade já havia sido totalmente perdida. Porém, no presente estudo, no grau de umidade em que as sementes já se encontravam mortas não foi visualizada banda de DNA no gel. Assim, foi realizada nova extração, utilizando desta vez o kit de Wizard Genomic DNA Purification. Porém, também não foram visualizadas as bandas de DNA nas amostras onde o conteúdo de água era letal para a sobrevivência das sementes. Segundo Osborne (2000), a água disponível na semente após a desidratação pode determinar a manutenção da integridade proteica, a conformação do DNA, a ativação das endonucleases e a integridade genômica. Os resultados obtidos sugerem a necessidade de estudos mais detalhados da relação entre secagem e integridade do DNA em sementes de pitanga.

4 CONCLUSÕES

- ✓O grau de umidade, e não a velocidade de secagem, que influencia a germinação de sementes de pitanga;
- ✓O grau de umidade de 15% é letal para sementes de pitanga;
- ✓O teste de condutividade elétrica não permitiu avaliar os danos estruturais à membrana celular, visto que a presença do tegumento após a desidratação influenciou na embebição da semente durante o tempo estabelecido para o teste;
- ✓Houve degradação do amido quando as sementes atingiram grau de umidade abaixo de 28%;
- ✓Não houve degradação do DNA em sementes de pitanga submetidas à desidratação, e quando as sementes já se encontravam mortas (com 15% de

água) não foi possível a extração do DNA a partir dos protocolos utilizados neste estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALPERT, P. The limits and frontiers of desiccation-tolerant life. **Integrative and Comparative Biology**, v. 45, p. 685-695, 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Mapa/ACS, 2009. 398 p.

COELHO, S. V. B. et al. Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de café secas em sílica gel e soluções salinas saturadas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.50, n.6, p.483-491, 2015.

DAVIDE, A. C.; FARIA, J. M. R.; BOTELHO, S. A. **Propagação de espécies florestais**. Belo Horizonte: CEMIG/UFLA/FAEPE, 1995. 41 p.

DELGADO, L. F.; BARBEDO, C. J. Tolerância à dessecação de sementes de espécies de *Eugenia*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 2, p. 265-272, 2007.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1998. 220 p.

HONG, T. D.; ELLIS, R. H. A protocol to determine seed storage behaviour. **International Plant Genetic Resources Institute**. Rome: Technical Bulletin 1, 1996. 55 p.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill Book, 1940. 523 p.

JOSÉ, A. C. et al. Effects of drying rates and storage time on *Magnolia ovata* Spreng. seed viability. **Seed Science and Technology**, v. 39, p. 425-434, 2011.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 4 ed. Nova Odessa: Plantarum, 2002. 361 p.

MAGISTRALI, P. R. et al. Physiological behavior of *Genipa Americana* L. seeds regarding the capacity for desiccation and storage tolerance. **Journal of Seed Science**, v.35, n.4, p. 495-500, 2013.

MASETTO, T. E. et al. Desiccation tolerance and DNA integrity in *Eeugenia pleurantha* O. Berg. (Myrtaceae) seeds. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 30, n. 1, p. 175-180, 2008.

MELLO, J. I. de O. et al. Changes in carbohydrate composition in seeds of three tropical tree species submitted to drying and storage at freezing temperature. **Seed Science and Technology**, v. 39, p. 465-480, 2011.

MELLO, J. I. de O. et al. Reserve carbohydrates and lipids from the seeds of four tropical tree species with different sensitivity to desiccation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 4, p. 889-899, 2010.

OSBORNE, D. J. et al. Hazards of a germinating seed: available water and the maintenance of genomic integrity. **Israel Journal of Plant Sciences**, v. 48, p. 173-179, 2000.

PAMMENTER, N. W. et al. Effects of differential drying rates on viability retention of recalcitrant seeds of *Ekebergia capensis*. **Seed Science Research**, v. 8, p. 463-471, 1998.

PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. Aspects of recalcitrant seed physiology **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, p. 56-68, 2000.

SILVA, L. A. da. et al. Radiographic image analysis of *Anacardium othonianum* Rizz (anacardiaceae) achenes subjected to desiccation. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 39, n. 2, p. 235-244, 2017.

SILVA, M. A. P. da. et al. Influência do pericarpo no teste de condutividade elétrica em sementes de crambe (*Crambe abyssinica* Hochst) submetidas a métodos de secagem. **Revista Energia da Agricultura**, v. 29, n.4, p. 301-305, 2014.

TANAKA, D. V. et al. Slow and fast drying in seeds of *Ocotea puberula* (Rich.) Ness. **Revista Árvore**, v. 40, n. 6, p. 1059-1065, 2016.

CAPÍTULO 3

ESTIMATIVA DA VIABILIDADE DE SEMENTES DE PITANGA (*Eugenia uniflora* L.) POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO

RESUMO

A produção florestal requer o fornecimento contínuo de sementes de alta qualidade para a produção de mudas via propagação sexuada. Para avaliar a viabilidade das sementes, existem vários testes, porém, muitos são baseados em métodos destrutivos e muitas vezes demorados. A espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) é um método não destrutivo, rápido e que vem sendo empregado para estimar parâmetros de qualidade de sementes, como umidade, teor de carboidratos, lipídios e proteínas. O objetivo, no presente estudo, foi investigar o potencial do uso da espectroscopia NIR na classificação da viabilidade de sementes de pitanga (*Eugenia uniflora* L.). Os espectros NIR foram obtidos por meio da fibra óptica a partir de 500 sementes individuais de pitanga submetidas ou não a secagem. Posteriormente, as sementes foram submetidas ao teste de germinação. A exploração de dados foi realizada por análise de componentes principais (PCA), e a viabilidade das sementes foi classificada por meio da análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA). A desidratação de sementes sensíveis à dessecação resulta em reações degradativas e alterações bioquímicas que contribuem para reduzir a viabilidade das sementes. Essas mudanças bioquímicas podem ser o motivo de um agrupamento claro entre sementes com e sem secagem que foi observado na PCA. A partir do modelo PLS-DA não foi possível validar um modelo para classificar corretamente a viabilidade de sementes de pitanga.

Palavras-chave: NIRS. Qualidade de semente. Danos por secagem. PLS-DA. Componentes principais.

1 INTRODUÇÃO

A viabilidade de sementes pode ser determinada por meio de vários testes, contudo, o teste de germinação ainda é tido como o método oficial. De acordo com a Associação de Analistas Oficiais de Sementes (AOSA, 2010), a

germinação é a capacidade estimada de sementes para produzir plantas normais com vigor sob condições controladas favoráveis, e é expressa pela porcentagem de sementes germinadas sobre os totais de sementes testadas. O teste de germinação também possibilita detectar plântulas anormais, sementes mortas e dormentes.

Os testes de viabilidade atuais são baseados em métodos destrutivos e muitas vezes demorados. Com o avanço da tecnologia, os testes não destrutivos para a determinação da qualidade de sementes têm surgido com o objetivo de acelerar os procedimentos e tornar os resultados mais uniformes entre laboratórios diferentes e dentro deles (DELL'AQUILA, 2009). A técnica da espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) vem sendo amplamente utilizada para estimar o conteúdo de água, carboidratos, proteínas e lipídios (JR. WORKMAN; WEYER, 2012), já que se trata de uma técnica rápida e não destrutiva.

Estudos recentes mostram a correlação positiva dos espectros NIR para a predição da viabilidade das sementes em diferentes espécies, como espinafre (OLESEN et al., 2011), soja e milho (AGELET et al., 2012), milho (JIA et al., 2016; AMBROSE et al. 2016), tomate (SHRESTHA; DELEURAN; GISLUM, 2017; SHRESTHA et al., 2016), arroz (SONG et al., 2015), *Pinus patula* (TIGABU; ODÉN, 2003), mamona (SANTOS et al., 2014) e melão japonês (KANDPAL et al., 2016).

A classificação da viabilidade de sementes a partir da espectroscopia NIR pode ser baseada em diferentes tipos de análises e modelos como a análise de variáveis canônicas ampliadas (ECVA); modelagem suave independente por analogia de classe (SIMCA); mínimos quadrados parciais (PLS); análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA); análise

discriminante linear ortogonal (OLDA); e máquinas de vetores de suporte por mínimos quadrados (LS-SVM).

A análise PLS-DA é uma ferramenta de classificação baseada no modelo PLS (BARKER; RAYENS, 2003), no qual a variável dependente é selecionada para representar a associação da classe (WESTERHUIS et al., 2008), utilizando de informações espectrais ou perfil químico para discriminar as amostras (BRERETON; LLOYD, 2014). Shetty et al. (2012) utilizaram o modelo PLS-DA em diferentes comprimentos de onda para discriminar os diferentes tamanhos de sementes de espinafre para prever a capacidade de germinação e o comprimento da plântula. Já Kandpal et al. (2016) usaram o modelo PLS-DA para prever a viabilidade e vigor em sementes de melão japonês.

A predição da viabilidade de sementes de pitanga (*Eugenia uniflora* L.) a partir da técnica NIR nunca foi empregada antes em estudos desta natureza. As sementes de pitanga apresentam baixa longevidade, sendo sua semeadura recomendada imediatamente após a coleta (LORENZI, 2002). Desse modo, em virtude da baixa longevidade das sementes de pitanga e na crescente demanda por mudas de qualidade, faz-se necessária a utilização de técnicas analíticas rápidas de predição da viabilidade de sementes.

Assim, diante do exposto, objetivou-se empregar a espectroscopia NIR para desenvolver modelo de classificação que seja capaz de prever a viabilidade de sementes de pitanga.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta e beneficiamento das sementes

Frutos maduros de pitanga (*Eugenia uniflora* L.) foram coletados em outubro de 2016 em matrizes localizadas em Lavras – MG. Após a coleta dos frutos, o beneficiamento das sementes foi realizado de acordo com Davide, Faria

e Botelho (1995), compreendendo maceração dos frutos em peneira sob água corrente para separação dos resíduos de frutos. Posteriormente, as sementes foram postas sobre papel toalha em uma bancada de laboratório e mantidas por 2 horas para remoção da água superficial.

2.2 Desidratação das sementes

Um total de 500 sementes de pitanga foram analisadas por espectroscopia no infravermelho próximo – NIR, seguida de teste de germinação.

Para a avaliação da viabilidade das sementes, tempos de secagem foram estabelecidos: sementes sem secagem (60,4% U); sementes secadas em sílica gel por 2 dias (48,9% U); sementes secadas em sílica gel por 8 dias (36,7% U); sementes secadas em sílica gel por 14 dias (27,6%); sementes secadas em sílica gel por 25 dias (15,6%). Para cada período de secagem, o grau de umidade (base úmida) das sementes foi determinado conforme estabelecido nas Regras para Análise de Sementes – RAS (BRASIL, 2009).

2.3 Aquisição dos espectros no infravermelho próximo – NIR

Os espectros das sementes foram obtidos antes dos testes fisiológicos para cada tratamento. Para a geração de curvas espectrais, foram utilizadas 100 sementes de cada tratamento, analisadas individualmente a partir da fibra óptica do aparelho. As leituras foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Biomateriais DCF/UFLA, em sala climatizada (20°C e 60% UR).

O aparelho utilizado para a obtenção dos espectros do infravermelho próximo das sementes foi o espectrômetro FT-NIR, modelo MPA (Bruker), equipado com uma esfera de integração e uma fibra ótica. A aquisição dos espectros foi realizada na gama de 12.500 a 3.500 cm^{-1} (800 a 2857 nm) com

resolução espectral de 8 cm^{-1} e 16 *scans* por leitura (cada espectro é uma média de 16 varreduras) em modo de reflexão difusa. Uma base com superfície banhada a ouro é adotada como referência para calibrar a absorção da luz do infravermelho próximo. O espectrômetro é conectado a um computador que armazena os dados dos espectros coletados por meio do programa *OPUS*, versão 7.0.

Para a calibração, foram utilizados os dados obtidos pelo método analítico convencional (teste de germinação) e a curva espectral de cada uma das sementes analisadas pelo aparelho. Esses dados foram analisados por um software para predizer os valores das mesmas e, com base nos resultados das duas análises, foram feitas as correlações que indicassem a confiabilidade, ou não, do aparelho para a análise de viabilidade de sementes de pitanga após serem submetidas à secagem ou não.

2.4 Teste de germinação como método de referência

A avaliação da qualidade fisiológica para a aferição do potencial de predição do NIR foi realizada por meio do teste de germinação. As sementes individualmente identificadas de cada tratamento foram previamente lavadas em solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a 2% por 1 minuto, enxaguadas em água e semeadas em gerbox, entre areia esterilizada, em germinador do tipo *Mangelsdorf* a uma temperatura de 25°C sob luz constante.

Ao final do teste de germinação, foram contabilizadas: plântulas normais (plântulas que mostram potencial para continuar seu desenvolvimento e dar origem a plantas normais sob condições favoráveis de campo); plântulas anormais (são aquelas que mesmo crescendo em condições favoráveis não mostram capacidade para continuar seu desenvolvimento e dar origem a plantas normais); e sementes mortas (deterioradas).

2.5 Análise multivariada dos dados

A análise multivariada dos dados foi realizada usando o software *Chemoface*® (versão 1.61) (NUNES et al., 2012). A análise de componentes principais (PCA) foi feita em dados brutos para obter uma perspectiva geral dos dados e para a detecção de *outliers*.

Na calibração, os modelos foram ajustados pelo método dos mínimos quadrados parciais (PLS), que relacionou os dados espectrais obtidos no NIR com os dados obtidos pelo método de referência realizado em laboratório. O número de componentes principais foi oito e o número de variáveis latentes foi definido pelo programa baseado na maximização do coeficiente de determinação e minimização do erro padrão da validação. A calibração dos modelos foi validada pelo método da validação cruzada. Tratamentos matemáticos também foram aplicados a fim de melhorar os modelos.

A análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) foi feita para a predição da viabilidade das sementes. A partir desta abordagem, a germinação foi considerada como uma variável categórica. Assim, neste estudo, as sementes foram agrupadas em três diferentes categorias, sendo que a categoria 1 representava as sementes que produziram plântulas normais; a categoria 2 representava as sementes que produziram plântulas anormais e a categoria 0 representava sementes mortas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Espectros no NIR e interpretação de bandas de absorção

A aquisição dos espectros das sementes de pitanga foi realizada na gama de 12500 a 3500 cm^{-1} (800 a 2857 nm). Contudo, para otimizar os espectros médios baseados na absorbância, a região de comprimento de onda mais curto

12500 a 9000 cm^{-1} (800 a 1111 nm) foi excluída porque apresentava ruídos (FIGURA 1). Olesen et al. (2011), classificando sementes de *Spinacia oleracea* L. por NIR, também descartaram comprimentos de onda de 12004 a 9099 cm^{-1} (833 a 1099 nm) e 7199 a 5998 cm^{-1} (1389 a 1667 nm) que apresentavam ruídos e classificava um número maior de sementes de maneira incorreta.

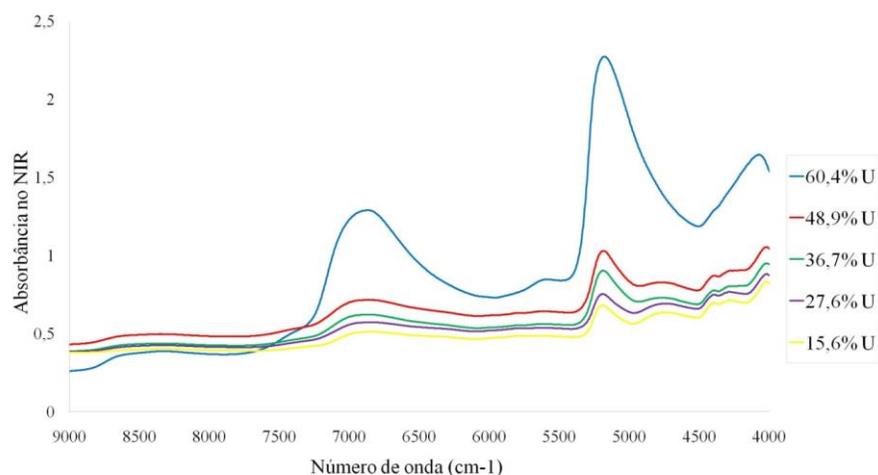
A seleção de comprimento de onda também foi importante para a classificação de sementes viáveis e não viáveis de *Raphanus sativus* L., com o comprimento entre 9090 a 4545 cm^{-1} (1100 nm e 2200 nm) resultando em menor número de sementes mal classificadas daquela espécie (MIN; KANG, 2008). Já sementes viáveis e vazias de *Pinus patula* Schide & Deppe foram perfeitamente classificadas com base nos espectros de refletância NIR quando houve a seleção de bandas em duas regiões, 9090 a 7692 cm^{-1} (1100-1300 nm) e 6250 a 5405 cm^{-1} (1600-1850 nm) (TIGABU; ODÉN, 2003). Assim, infere-se que o comprimento de onda estabelecido no modelo pode resultar em classificações deturpadas, tornando-se necessário, muitas vezes, fazer a correta seleção do comprimento de onda.

Os espectros NIR das sementes de pitanga apresentaram variação na absorvância ao longo do comprimento de onda com diferenças visíveis de absorvância entre as sementes sem e com secagem (FIGURA 1). Os maiores picos de absorvância observados foram em 6877 cm^{-1} (1454 nm) e 5168 cm^{-1} (1935nm), com diferenças visíveis nos picos entre as sementes que não passaram pelo processo de secagem. O comprimento de onda de 5168 cm^{-1} está relacionado com a característica da umidade (BURNS; CIURCZAK, 2008), o que condiz com os resultados obtidos neste estudo, onde as sementes que não passaram pelo processo de secagem apresentaram elevada absorvância neste comprimento de onda.

No presente estudo, as sementes com e sem secagem indicavam informações químicas similares com variação na absorbância (FIGURA 1). Dowell e Maghirang (2002) relataram que a espectroscopia NIR em semente única pode detectar o componente químico desde que ele esteja presente em quantidades suficientes (acima de 0,1% da concentração total presente na semente) para afetar significativamente a absorção do infravermelho próximo.

O comprimento de onda de 6877 cm^{-1} está relacionado com a vibração de ligação de alongamento O-H do primeiro som que corresponde à estrutura do amido e água; e com a vibração de ligação de alongamento C=O do terceiro som. Já o comprimento de onda de 5168 cm^{-1} está correlacionado com a ligação de vibração de curvatura O-H, que por sua vez relaciona-se à estrutura da água (BURNS; CIURCZAK, 2008). McGoverin et al. (2011), em seus estudos sobre a caracterização de sementes de trigo, cevada e sorgo, também relataram alongamento de O-H na região espectral de 5208 a 5154 cm^{-1} (1920 a 1940 nm) que se relaciona com a vibração à base de água, sendo portando principal contribuidor para a separação de sementes viáveis e não viáveis (FIGURA 1).

Figura 1 - Média por grau de umidade dos espectros NIR em sementes de pitanga (*Eugenia uniflora* L.) com e sem secagem.



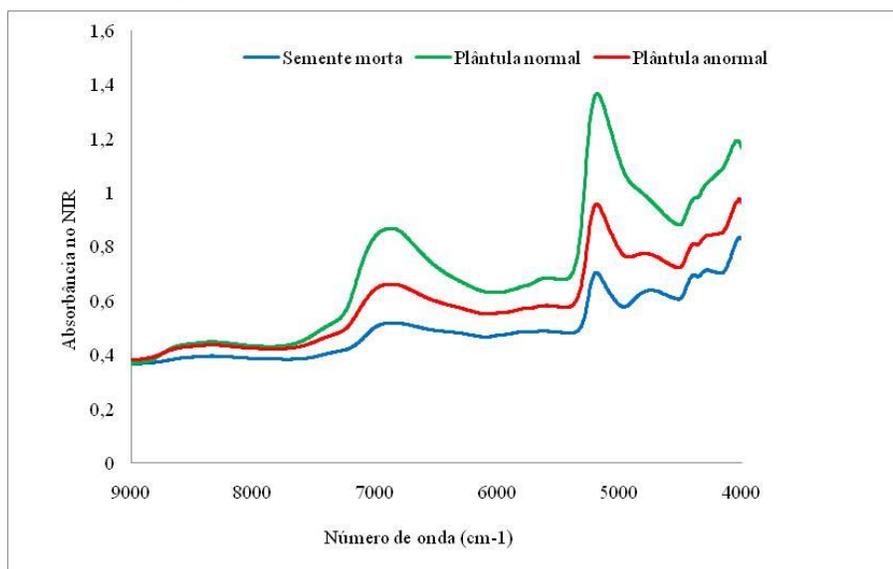
Fonte: Da autora (2018).

Na Figura 2, observa-se que no espectro de sementes mortas não se destaca o comprimento de onda de 6877 cm^{-1} , o qual está relacionado à estrutura do amido e água. Uma provável explicação seria a possível degradação do amido na semente ao longo do processo de secagem, o que contribuiu para produção de sementes mortas, uma vez que as sementes que não passaram pelo processo de secagem obtiveram 100% de germinação. No comprimento de onda de 4744 cm^{-1} (2108 nm), que está relacionado com o grupo funcional CHO dos carboidratos – glicose (JR. WORKMAN; WEYER, 2012), observa-se que, no espectro das plântulas normais, não fica evidente o pico.

Neste estudo, as sementes que passaram pelo processo de secagem produziram plântulas anormais e sementes mortas. Logo, sugere-se que o pico presente no comprimento de onda de 4744 cm^{-1} nos espectros destas sementes (FIGURA 2) possa estar relacionado com a substituição da água pelos açúcares já existentes, como foi evidenciado nos estudos de Leprince, Hendry e McKersie

(1993), em que foi observado em sementes secas o acúmulo de açúcares, e que, de acordo com estes autores, há evidências de que os açúcares apresentam importante papel na tolerância à dessecação em sementes.

Figura 2 - Média por germinação dos espectros NIR em sementes de pitanga (*Eugenia uniflora* L.).



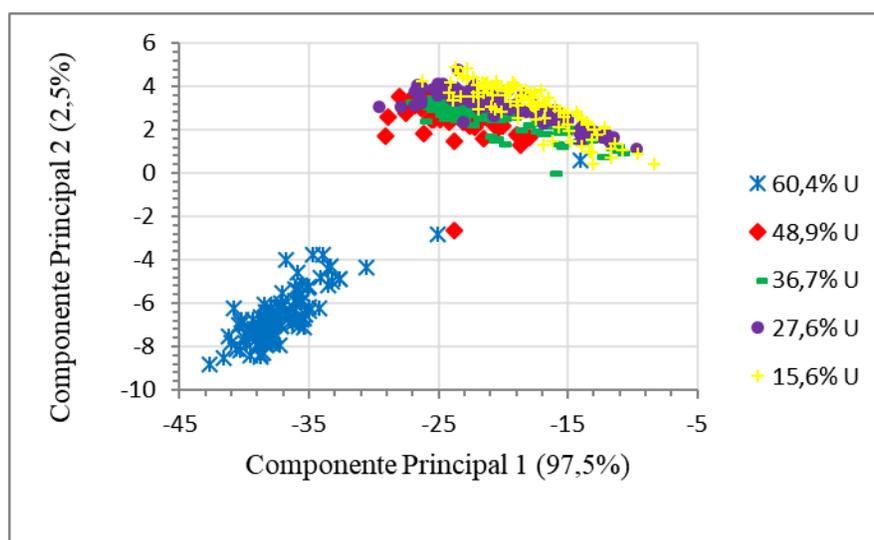
Fonte: Da autora (2018).

3.2 Análise de componentes principais (PCA)

A análise de componentes principais foi realizada para uma prévia avaliação do comportamento dos espectros e possível separação dos graus de umidade (FIGURA 3) e da germinação (FIGURA 4). Tanto na Figura 3 quanto na figura 4 observam-se os *scores* da PCA das 500 sementes de pitanga submetidas ou não à secagem. Em geral, a variabilidade espectral explicada nas PCAs foi de 100%, em que o primeiro e o segundo componentes principais descreveram 97,5% (PC1) e 2,5% (PC2) da variabilidade dos dados.

Na Figura 3, observa-se que houve uma tendência de separação entre as sementes que não passaram pelo processo de secagem daquelas sementes que foram submetidas à secagem. As sementes que sofreram secagem mostraram um padrão de agrupamento que era visível, e apresentavam grau de umidade de 48,9%, 36,7%, 27,6% e 15,6%, enquanto que as sementes sem secagem apresentavam grau de umidade de 60,4%. Esta separação indica que há diferenças espectrais entre os tratamentos com e sem secagem. Embora sutis, são sistemáticas e podem ser usadas para fins de discriminação.

Figura 3 - Gráfico de dispersão bidimensional para PC1 e PC2 da análise de componentes principais (PCA) dos espectros no NIR a partir de sementes de pitanga (*Eugenia uniflora* L.) submetidas ou não a secagem.

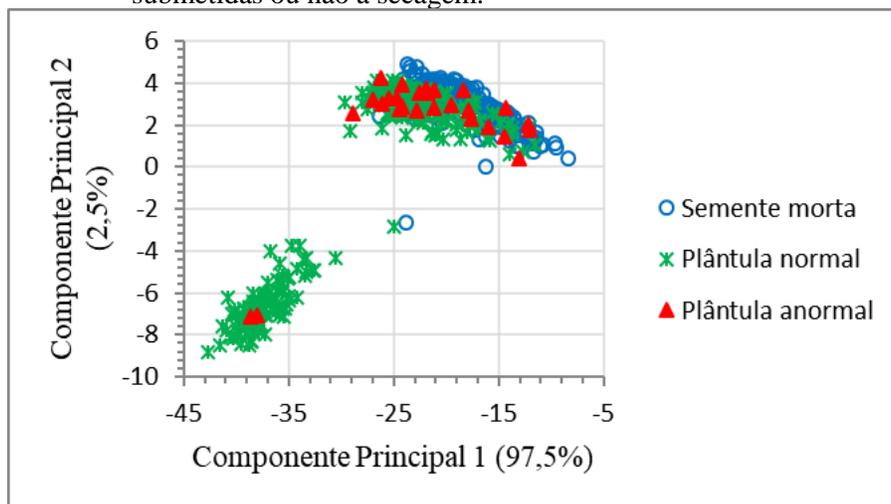


Fonte: Da autora (2018).

A PCA da germinação (FIGURA 4) não apresentou boa separação entre sementes que produziram plântulas normais, anormais e sementes mortas.

Entretanto, embora existam sobreposições entre as classificações, observa-se uma tendência de distribuição das sementes classificadas como mortas.

Figura 4 - Gráfico de dispersão bidimensional para PC1 e PC2 da análise de componentes principais (PCA) dos espectros no NIR a partir da germinação de sementes de pitanga (*Eugenia uniflora* L.) submetidas ou não a secagem.

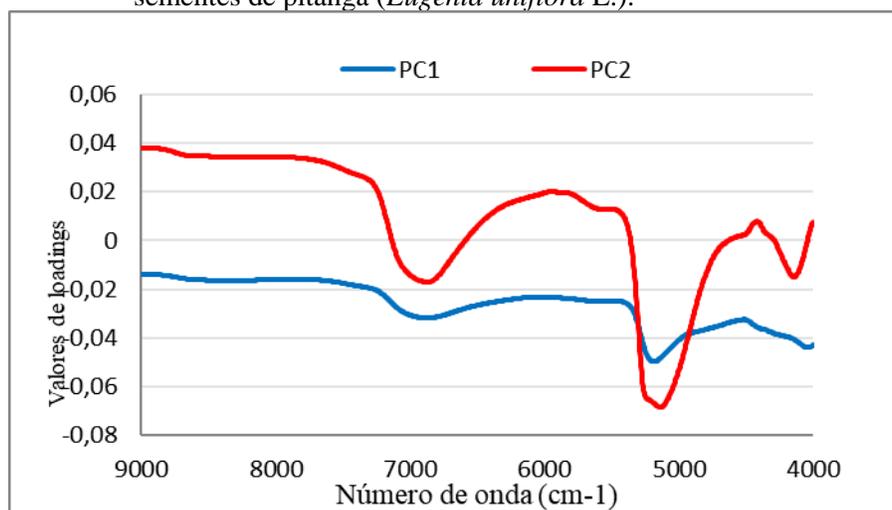


Fonte: Da autora (2018).

A Figura 5 mostra as cargas dos componentes principais, que representam os pesos de correlação das variáveis, ou seja, as cargas PC1 e PC2 mostraram variações em algumas regiões espectrais que foram importantes para a classificação da viabilidade das sementes de pitanga. O pico em aproximadamente 5157 cm^{-1} (1939 nm) corresponde ao maior peso, indicando que essa variável teve a maior influência nos dados na direção da PC1. Ressalta-se ainda que tal comprimento de onda está relacionado com a molécula de água (BURNS; CIURCZAK, 2008). Por outro lado, o pico em aproximadamente 5103 cm^{-1} (1960 nm) no gráfico de carga do PC2 demonstrou que a variável é responsável pela maior variação no conjunto de dados da PC2, cujo comprimento de onda está relacionado com o amido (BURNS; CIURCZAK,

2008). De acordo com Ambrose et al. (2016), a presença de picos em comprimentos de onda constitui a base para análises na construção de modelos de classificação empregando a PLS-DA.

Figura 5 - Plotagem de carregamento da PC1 e PC2 e espectros NIR de sementes de pitanga (*Eugenia uniflora* L.).



Fonte: Da autora (2018).

3.3 Análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA)

Foi realizada a classificação através da PLS-DA, com o objetivo de gerar modelos capazes de prever a viabilidade de sementes de pitanga após serem submetidas ou não a secagem, porém não foi possível validar um modelo que calibrasse corretamente a viabilidade de sementes de pitanga (TABELA 1) mesmo utilizando pré-tratamentos. O erro de classificação do modelo após a validação foi alto (72,6%), demonstrando que o modelo de classificação utilizado não conseguiu classificar corretamente as sementes que sofreram secagem. Entretanto, observa-se que a calibração foi boa e obteve 87,8% de

classificação correta, ou seja, os dados espectrais e os dados obtidos pelo método de referência apresentaram alta relação.

Tabela 1 - Predição da viabilidade de sementes de pitanga (*Eugenia uniflora* L.) por análise PLS-DA com validação cruzada.

Viabilidade							
U (%)	Calibração			Validação			% Classificação correta
	SM	PN	PA	SM	PN	PA	
60,4	-	98 (98)	0 (2)	-	98 (98)	0 (0)	98%
49,5	1 (3)	91 (91)	0 (6)	0 (3)	0 (91)	0 (6)	6%
36,9	12 (20)	70 (73)	0 (7)	0 (20)	5 (73)	7 (7)	12%
24,6	41 (49)	35 (44)	0 (7)	0 (49)	12 (44)	5 (7)	17%
16,3	91 (91)	0 (4)	0 (5)	0 (91)	4 (4)	0 (5)	4%
Classificação geral							27,4%

Valores entre parênteses são os percentuais obtidos a partir do teste de germinação em laboratório. LEGENDA: U – umidade; SM – sementes mortas; PN – plântulas normais; PA – plântulas anormais.

Fonte: Da autora (2018).

As elevadas taxas de classificação incorreta na validação mostraram que as discriminações foram mais aleatórias e nenhuma diferença foi detectada pelo NIR, principalmente das sementes que passaram pelo processo de secagem. Diferentemente dos resultados obtidos neste estudo, Kandpal et al. (2016), quando utilizaram a análise de PLS-DA para prever a viabilidade e vigor de sementes de melão japonês, alcançaram alta precisão de classificação (93,4%) para o conjunto de validação. Já Shrestha, Deleuran e Gislum (2017), usando o modelo PLS-DA para a classificação de sementes de tomate viáveis e não viáveis, previram amostras com taxa de classificação correta de 86,9%.

4 CONCLUSÕES

- ✓ A exploração dos espectros NIR, seguida de análise de PCA, indica que as medidas espectrais podem ser utilizadas para discriminar sementes de pitanga com e sem secagem;
- ✓ Os espectros mostraram diferenças entre os tratamentos, sugerindo que comprimentos de onda que possuem informações químicas da água e carboidratos têm influência na classificação da viabilidade;
- ✓ Empregando o modelo PLS-DA para discriminar a viabilidade de sementes de pitanga com e sem secagem, foi possível obter taxa de classificação correta da calibração de 87,8%, porém, não foi possível validar o modelo obtido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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, p. 160-165, 2012.

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

Association of Official Seed Analysts (AOSA). **Rules for testing seeds: principles and procedures**. 1 v. Ithaca, NY, 2014.

BARKER, M.; RAYENS, W. Partial least squares for discrimination. **Journal of Chemometrics**, v. 17, p. 166-173, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Mapa/ACS, 2009.398 p.

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

BURNS, D. A.; CIURCZAK, E. W. Handbook of near-infrared analysis. 3 ed. CRC Press, 2008. 834 p.

DAVIDE, A. C.; FARIA, J. M. R.; BOTELHO, S. A. **Propagação de espécies florestais**. Belo Horizonte: CEMIG/UFLA/FAEPE, 1995. 41 p.

DELL'AQUILA, A. Digital imaging information technology applied to seed germination testing. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, France, v. 29, p. 213-221, 2009.

DOWELL, F.; MAGHIRANG, E. Accuracy and feasibility of measuring characteristics of single kernels using near-infrared spectroscopy. **ICC Conference "Novel raw materials, technologies, and products – New Challenge for Quality Control"** Budapest, Hungar, p. 1-6, 2002.

JIA, S. et al. Feasibility of analyzing frost-damaged and non-viable maize kernels based on near infrared spectroscopy and chemometrics. **Journal of Cereal Science**, v. 69, p. 145-150, 2016.

JR. WORKMAN, J.; WEYER, L. **Practical guide and spectral atlas for interpretive near-infrared spectroscopy**, 2 ed. CRC Press, 2012.326 p.

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.

LEPRINCE, O.; HENDRY, G.A. F.; MCKERSIE, B. D. The mechanisms of desiccation tolerance in developing seeds. **Seed Science Research**, v. 3, p. 231-246, 1993.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 4 ed. Nova Odessa: Plantarum, 2002. 361 p.

MCGOVERIN, C. M. et al. Characterisation of non-viable whole barley, wheat and sorghum grains using near-infrared hyperspectral data and chemometrics. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 401, p. 2283-2289, 2011.

MIN, T. G.; KANG, W. S. Nondestructive classification of viable and nonviable radish (*Raphanus sativus* L.) seed using single seed near infrared spectroscopy. **Horticulture, Environment and Biotechnology**, v. 49, n. 1, p. 42-46, 2008.

NUNES, C. A. et al. Chemoface: a novel free user-friendly interface for chemometrics. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 11, p. 2003-2010, 2012.

OLESEN, M. H. et al. Classification of viable and non-viable spinach (*Spinacia oleracea* L.) seeds by single near infrared spectroscopy and extended canonical variates analysis. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, v. 19, p. 171-180, 2011.

SANTOS, M. B. H. et al. Non-destructive NIR spectrometric cultivar discrimination of castor seeds resulting from breeding programs. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 5, p. 969-974, 2014.

SHETTY, N. et al. Use of partial least squares discriminant analysis on visible-near infrared multispectral image data to examine germination ability and germ length in spinach seeds. **Journal of Chemometrics**, v. 26, p. 462-466, 2012.

SHRESTHA, S. et al. Single seed near-infrared hyperspectral imaging in determining tomato (*Solanum lycopersicum* L.) seed quality in association with multivariate data analysis. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 237, p. 1027-1034, 2016.

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.

SONG, L. et al. Effect of γ -irradiation on rice seed vigor assessed by near-infrared spectroscopy. **Journal of Stored Products Research**, v. 62, p. 46-51, 2015.

TIGABU, M.; ODÉN, P. C. Discrimination of viable and empty seeds of *Pinus patula* Schiede & Deppe with near-infrared spectroscopy. **New Forests**, v. 25, p. 163-176, 2003.

WESTERHUIS, J. A. et al. Assessment of PLS-DA cross validation. **Metabolomics**, v. 4, p. 81-89, 2008.