



FABIANO FRANÇA DA SILVA

**VALIDAÇÃO DE ANÁLISE RADIOGRÁFICA PARA EXAME
DE SEMENTES INFESTADAS COM *Sitophilus zeamais*
(COLEOPTERA: CURCULIONIDAE) EM MILHO**

**LAVRAS - MG
2018**

FABIANO FRANÇA DA SILVA

**VALIDAÇÃO DE ANÁLISE RADIOGRÁFICA PARA EXAME DE SEMENTES
INFESTADAS COM *Sitophilus zeamais* (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE) EM
MILHO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

Prof^a. Dra Maria Laene Moreira de Carvalho

Orientadora

**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).

Silva, Fabiano França da.

Validação de análise radiográfica para exame de sementes infestadas com *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) em milho/ Fabiano França da Silva. - 2018.

51 p. : il.

Orientadora: Maria Laene Moreira de Carvalho.

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

Bibliografia.

1. Análise de Imagem. 2. Raios-X. 3. *Sitophilus zeamais*. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

FABIANO FRANÇA DA SILVA

**VALIDAÇÃO DE ANÁLISE RADIOGRÁFICA PARA EXAME DE SEMENTES
INFESTADAS COM *Sitophilus zeamais* (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE) EM
MILHO**

**VALIDATION OF RADIOGRAPHIC ANALYSIS FOR EXAMINATION OF CORN
SEEDS INFESTATION WITH *Sitophilus zeamais* (COLEOPTERA:
CURCULIONIDAE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 09 de julho de 2018.

Dra. Maria Laene Moreira de Carvalho	UFLA
Dr. Geraldo Andrade de Carvalho	UFLA
Dr. José Maurício Pereira	MAPA

Prof^ª. Dra. Maria Laene Moreira de Carvalho

Orientadora

**LAVRAS – MG
2018**

À minha família, por todo amparo, dedicação, incentivo, apoio e exemplos de honestidade e amor.

De modo especial à meu amado irmão Jessé França (in memoriam) e meu tio-avô João Ferreira (in memoriam), pelo apoio e confiança em tudo.

Aos amigos, professores e tantas outras pessoas que direta ou indiretamente me entusiasmaram e contribuíram para a realização deste.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Minha gratidão, primeiramente, a Deus, por estar comigo em todos os momentos, iluminando e guiando-me nas horas mais difíceis.

Aos meus pais Eraldo e Jozilene; aos meus irmãos Eliane, Reinaldo, Josimar, José, Henrique, Jessé (*in memoriam*) e João Victor; à Juliana e Sérgio, pelos anos de acolhida; aos sobrinhos e todos os familiares, agradeço, especialmente, por me apoiarem e incentivarem nesta jornada.

À professora Dra. Maria Laene Moreira de Carvalho, que me possibilitou aprendizagens únicas, agradeço pela paciência, dedicação, ensinamentos, confiança e orientação que me foram concedidas.

Aos amigos do Setor de Sementes e, também, do Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural da UFLA, obrigado pelos momentos de convivência, trabalhos e distrações.

Aos amigos de república: João Paulo, Rodrigo, José Matheus e Henrique; à República Pira Saia, aos amigos de Lavras, agradeço o acolhimento, a amizade, as boas conversas e momentos que se enraizaram desde o primeiro momento que cheguei em terra lavrense.

A Universidade Federal de Lavras (UFLA), ao Departamento de Agricultura (DAG) e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, pela oportunidade de realização do curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Pró-Reitoria de Assuntos Estudantis e Acadêmicos (PRAEC/UFLA), que me permitiram a concessão de bolsa e auxílios estudantis, nesta ordem.

Enfim, a todos que compartilharam comigo deste sonho, contribuindo e auxiliando direta ou indiretamente para que eu pudesse alcançá-lo, **MUITO OBRIGADO.**

RESUMO

O exame de sementes infestadas ou danificadas por insetos é uma das exigências estabelecidas pelo padrão brasileiro de sementes de milho para a liberação de lotes. A metodologia tradicional prescrita nas “Regras para Análise de Sementes” que consiste em embebição e corte individual das sementes, é extremamente morosa, leva à fadiga visual e coloca em risco a segurança do analista. A técnica de análise de imagem radiográfica apresenta potencial de utilização para detecção de sementes infestadas e pode ser uma alternativa viável em relação à metodologia tradicional. O objetivo desse trabalho foi validar a metodologia de análise radiográfica para o exame de infestação do gorgulho *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae) em sementes de milho. As análises radiográficas foram realizadas em dez laboratórios, credenciados junto ao MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) para esse tipo de análise, os quais receberam radiografias de sementes referentes a quatro amostras com diferentes níveis de infestação (0, 1, 3 e 5%). Os dados foram analisados conforme os procedimentos estatísticos definidos pela ISTA (International Seed Testing Association) e técnicas complementares, usadas para identificar a presença de valores discrepantes (método de Hampel) e *outliers* nas variâncias (teste de Levene para média), avaliar os efeitos de laboratórios e níveis (análise de variância) e verificar a repetibilidade, reprodutibilidade, exatidão e robustez (limites críticos de repetibilidade, reprodutibilidade, estatísticas k e h de Mandel). Concluiu-se que a metodologia proposta para o exame de infestação do gorgulho em sementes de milho, com a utilização da análise radiográfica, é validada, pois evidencia exatidão, robustez e precisão dentro dos limites críticos de repetibilidade e reprodutibilidade.

Palavras-chave: Análise de Imagem. Raios-X. Gorgulho-do-milho. Detecção. Danos.

ABSTRACT

The examination of seeds infested or damaged by insects is one of the requirements established by the Brazilian standards for corn seed in order to release batches. The traditional methodology prescribed in the "Rules for Seed Analysis", consisting of imbibition and individual cutting of seeds, is extremely time-consuming, leads to visual fatigue and jeopardizes the safety of the analyst. The technique of radiographic image analysis presents the potential for use in the detection of infested seeds and can be a viable alternative in relation to the traditional methodology. The objective of this work was to validate the methodology of radiographic analysis for the examination of infestations by the weevil *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) in corn seeds. Radiographic analyses were carried out in 10 laboratories, accredited with the MAPA (Ministry of Agriculture, Livestock and Supply) for this type of analysis, which received radiographs of seeds referring to four samples with different levels of infestation (0, 1, 3 and 5%). Data were analyzed according to ISTA (International Seed Testing Association) statistical procedures and complementary techniques, used to identify the presence of discrepant values (Hampel method) and outliers in the variances (Levene test for mean), to evaluate the effects of laboratories and levels (analysis of variance) and verify the repeatability, reproducibility, accuracy and robustness (critical limits of repeatability, reproducibility, Mandel h and k statistics). It was concluded that the methodology proposed for examination of weevil infestation in maize seeds, using radiographic analysis, is validated, since it shows exactness, robustness and precision within the critical limits of repeatability and reproducibility

Keywords: Image Analysis. X ray. Corn weevil. Detection. Damage

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Sumarização do Boxplot por agrupamento da infestação média de <i>Sitophilus zeamais</i> em sementes de milho observada pelos laboratórios via análise radiográfica	26
Figura 2 - Verificação das suposições de normalidade dos resíduos em função da análise radiográfica	29
Figura 3 - Gráficos dos valores de k e h para o exame de infestação de <i>Sitophilus zeamais</i> em sementes de milho realizado a partir de análise radiográfica	32
Tabela 1 - Identificação de valores discrepantes nos resultados do processo de validação de análise radiográfica para o exame de infestação de <i>Sitophilus zeamais</i> em sementes de milho, a partir das estatísticas de Hampel e Boxplot	25
Tabela 2 - Resultados do teste de Levene, a 1% de significância, para detecção de <i>outliers</i> nas variâncias para cada nível de infestação de <i>Sitophilus zeamais</i>	28
Tabela 3 - Resumo da análise de variância e teste de Shapiro-Wilk para a variável infestação de <i>Sitophilus zeamais</i> em sementes de milho, com interação confundida no resíduo	28
Tabela 4 - Amplitude (Lr_{jl}), limite crítico, desvio padrão de repetibilidade e resultados da determinação da condição de repetibilidade (Re) ou não (Nr) para os laboratórios em cada nível infestação de <i>Sitophilus zeamais</i>	30
Tabela 5 - Amplitude (Lr_{jk}), limite crítico, desvio padrão de reprodutibilidade e resultados da determinação da condição de reprodutibilidade (Re) ou não (Nr) para os níveis de infestação de <i>Sitophilus zeamais</i> em cada repetição.....	31

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1	Importância econômica e qualidade na produção de sementes de milho	13
2.2	Gorgulho-do-milho: aspectos gerais e relação com a qualidade de sementes...	144
2.3	Técnica de Raios X na avaliação de sementes infestadas.....	15
2.4	Sistema de validação metodológica.....	16
2.5	Testes estatísticos no processo de validação de métodos.....	18
3	MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1	Procedimentos para obtenção dos diferentes níveis de infestação.....	20
3.2	Distribuição das radiografias e protocolos para os laboratórios	21
3.3	Análises estatísticas	21
3.3.1	Valores discrepantes.....	22
3.3.2	Identificação de outliers nas variâncias.....	22
3.3.3	Avaliação dos efeitos de laboratórios e níveis de infestação	23
3.3.4	Repetibilidade, reprodutibilidade e estatísticas h e k de Mandel	23
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4.1	Valores discrepantes (<i>outliers</i>)	25
4.2	Identificação de <i>outliers</i> nas variâncias	27
4.3	Avaliação dos efeitos de laboratórios e níveis de infestação.....	28
4.4	Repetibilidade, reprodutibilidade e estatísticas k e h de Mandel	30
5	CONCLUSÕES	35
	REFERÊNCIAS	36
	ANEXO A – Laboratórios executores credenciados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.....	42
	ANEXO B - Protocolo geral para validação de metodologia de análise radiográfica para o exame de infestação de gorgulho em sementes de milho	42
	ANEXO C - Ficha de avaliação.....	51
	ANEXO D - Questionário de avaliação	52

1 INTRODUÇÃO

A produção de sementes de milho, com montante de 23,7 milhões de sacas, é a segunda atividade em importância econômica do agronegócio brasileiro. De acordo com Carvalho et al. (2017) e Conab (2018), para suprir uma produção de cerca de 87,3 milhões toneladas de grãos na safra 2017/18, estima-se uma demanda aproximada de 18,7 milhões de sacas de sementes de milho, uma vez que a taxa de utilização de sementes é em torno de 90%.

Existem diversos fatores envolvidos na qualidade das sementes, dentre os quais citam-se os danos causados por insetos pragas, especialmente do gorgulho-do-milho, *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). Considerada uma praga primária interna, essa praga apresenta agressividade alimentar, com ciclo de vida curto e infestação que vai desde os campos de produção até o armazenamento (MATEUS et al., 2017). Inicialmente as fêmeas ovipositam no exterior das sementes e, posteriormente, ocorre o desenvolvimento das larvas até a fase adulta internamente às sementes, com perda de peso, germinação, vigor e padrão comercial (VILARINHO et al., 2016), além dos danos indiretos, pois o gorgulho propicia porta de entrada para o desenvolvimento de fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, envolvidos na produção de micotoxinas (AQUINO; POTENZA, 2013).

Em função dos prejuízos diretos e indiretos, há necessidade de detecção de danos causados por este inseto, o que normalmente é feito a partir do “exame de sementes infestadas”, exigido nos padrões de identidade e qualidade de sementes para a liberação dos lotes e possíveis reanálises, conforme disposto no Decreto nº 5.153, de 23 de julho de 2004, que regulamenta a Lei de sementes nº 10.711, de 5 de agosto de 2003 e Instrução Normativa nº 45, de 17 de setembro de 2013 (BRASIL, 2004; 2013b).

O “exame de sementes infestadas” por ser realizado com o auxílio de objetos perfurocortantes e basear-se na inspeção individual das sementes para detectar sinais ou danos de infestação por insetos nas estruturas internas da semente, é considerado extremamente moroso e pode levar à fadiga visual do analista. Perante a segurança no trabalho e a qualidade das análises, as empresas produtoras de sementes buscam praticidade na avaliação e a redução do risco inerente à detecção que envolve o corte.

Há necessidade do desenvolvimento de métodos mais precisos e seguros para a observação da infestação. Dentre as técnicas alternativas ao exame de sementes infestadas, a análise de imagens radiográficas tem se destacado na avaliação de danos em lotes de sementes de diversas espécies, a exemplo de abóbora, feijão, milho, mamona e sementes florestais

(CARVALHO et al.,1999; CARVALHO; NOVEMBRE, 2012). A partir das radiografias é possível determinar quais fatores estão relacionados com a perda do potencial fisiológico de sementes, seja em virtude de danos por insetos e fungos e, aspectos morfológicos como sementes cheias e vazias. Desta forma, o objetivo com este trabalho foi validar a metodologia de análise radiográfica para o exame de infestação de *S. zeamais* em sementes de milho.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Importância econômica e qualidade na produção de sementes de milho

O milho é considerado dentro da cadeia do agronegócio brasileiro, como uma das principais atividades responsáveis por gerar riqueza e, conseqüentemente, colocar o país em destaque no cenário comercial interno e externo (CUSTÓDIO et al., 2016). A indústria de sementes de milho gera recursos de aproximadamente R\$ 7,2 bilhões, sendo que cerca de US\$ 84,76 milhões são obtidos da exportação para o Paraguai e Estados Unidos (CARVALHO et al., 2017).

A expansão da produção de sementes de milho é um reflexo da combinação dos investimentos em tecnologia, pesquisa e desenvolvimento, por parte de empresas produtoras (BELLUZZO; FRISCHTAK, 2014), preocupadas não apenas com a produtividade, mas especialmente, com a qualidade das sementes produzidas. Na etapa de armazenamento, as sementes devem receber adequado acondicionamento para garantir a qualidade sanitária, atributo de especial interesse da indústria, uma vez que a ocorrência de insetos-praga contribui para elevar a umidade e temperatura da massa de sementes, possibilitando o desenvolvimento de fungos durante o armazenamento (ANTONELLO et al., 2009; LIMA et al., 2014).

Com ênfase na melhoria da qualidade dos produtos comercializados, toda a cadeia produtiva de sementes deve prezar pela manutenção das condições adequadas e o monitoramento intensivo do armazenamento das sementes por longos períodos, o que inclui a inspeção externa e interna da infestação por insetos nas sementes armazenadas (SILVA et al., 2012).

A fim de garantir a qualidade sanitária da semente comercial, a produção deve seguir os padrões mínimos de qualidade descritos na Instrução Normativa nº 45/2013 (BRASIL, 2013b) que, além de determinar o teste de sementes infestadas, estabelece os limites máximos aceitáveis de infestação, sendo de 3% (para sementes básicas, C1 e C2) e 5% de infestação (para sementes S1 e S2), com riscos de condenação do lote quando os resultados forem superiores aos estabelecidos.

2.2 Gorgulho-do-milho: aspectos gerais e relação com a qualidade de sementes

O besouro adulto do *Sitophilus zeamais* apresenta 3 mm de comprimento e tem manchas avermelhadas nos élitros, densamente estriados. O aparelho bucal é do tipo mastigador, com mandíbulas fortes que supera a rigidez das sementes. A fêmea deposita seus ovos na região embrionária da semente e as larvas emergem após o 4º dia, onde se alimentam do seu conteúdo interno. Dentro das sementes, passam por quatro instares larvais até formarem as pupas de cor branca e, ao atingirem a fase adulta, atravessam os tecidos via orifício de saída e iniciam novo ciclo biológico (LORINI et al., 2015; VILARINHO et al., 2016).

É frequente o ataque de gorgulhos ainda nos campos de produção de sementes, especialmente pela presença de focos de infestação próximos, híbridos suscetíveis, capacidade de voo destes insetos e, além disso, a variedade de hospedeiros e a capacidade de penetração na massa de sementes e grãos, o que reforça a ideia de ser uma das pragas mais significativas para a cultura no armazenamento (LIMA-MENDONÇA et al., 2013; LORINI et al., 2015).

Importante destacar que, em condições de armazenamento inadequado das sementes e grãos, este inseto atua como agente disseminador de fungos fitopatogênicos, a exemplo de *Aspergillus flavus*, *Penicillium* spp. e *Fusarium* spp., que se desenvolvem na massa de sementes e produzem aflatoxinas, capazes de reduzir a qualidade e, conseqüentemente, prejudicar a comercialização das sementes (BOWERS et al., 2014; COSTA et al., 2015).

Assim, o inseto classificado e caracterizado como praga interna, capaz de penetrar na semente e gerar grande número de descendentes em um curto período de tempo (VILARINHO et al., 2016), é responsável pela redução de peso, poder germinativo, vigor e padrão comercial, com prejuízos de até 90%, especialmente quando as sementes são armazenadas sem tratamento (OJO; OMOLOYE, 2016; OLOYEDE-KAMIYO; ADETUMBI, 2017).

Para minimizar o efeito dessa praga na qualidade de sementes, a legislação vigente Lei 10.711/03, além de regulamentar a produção de sementes em nível nacional, determina parâmetros para comercialização referentes aos níveis de danos causados pelo gorgulho, sendo que essa detecção está prescrita nas Regras para Análise de Sementes, sob o nome de “exame de sementes infestadas” (BRASIL, 2004; 2009).

O princípio do teste é identificar sinais de oviposição e os danos causados por insetos (larva, pupa e adulto), a partir do exame de 100 sementes individualmente, em duas repetições, com o objetivo de detectar orifícios de saída e sinais visíveis da presença dos insetos. As sementes perfuradas são contabilizadas, registradas e descartadas, enquanto as demais sementes

aparentemente não danificadas por insetos são embebidas em água por 12-24 horas, para amolecê-las e, procede-se ao corte individual destas para observação das estruturas internas. Assim, registra-se o número de sementes com presença de larva, pupa ou inseto adulto e soma-se ao número de sementes perfuradas anteriormente registrado, para obter o número total de sementes danificadas por insetos por repetição (BRASIL, 2009).

É um método destrutivo, extremamente moroso, que pode levar a fadiga visual do analista, e colocar sua segurança em risco pelo uso de lâminas de corte, comprometendo os resultados da análise, o que leva a necessidade de metodologias alternativas (HUANG et al., 2015). Além da introdução de novos métodos direcionados à avaliação da qualidade de sementes, é fundamental avaliar a qualidade técnica dos profissionais envolvidos, conforme aponta Lima Júnior (2010), já que o perfil dos analistas é decisivo para o sucesso das análises, uma vez que exige responsabilidade, experiência, organização, acuidade visual, além de paciência, por se tratar de uma atividade rotineira, que demanda horas de dedicação para a realização e encerramento de uma análise (ABNT, 2005).

A análise radiográfica de imagem pode ser uma alternativa viável para avaliar os danos internos causados por insetos e, além de ser simples e não destrutiva, tornaria o teste mais seguro, prático e rápido na avaliação da qualidade de sementes; no entanto, não está validada.

2.3 Técnica de Raios X na avaliação de sementes infestadas

O início das pesquisas com raios X voltadas à qualidade de sementes ocorreu a partir do estudo de Runner com radiação ionizante, emitida por raios X, com o objetivo de controlar *Lasioderma serricorne* Fabricius (Coleoptera: Anobiidae), praga do tabaco armazenado (RUNNER, 1916). Em 1953, o uso de raios X na análise de sementes foi empregado por Simak e Gustafsson (1953) para avaliar a qualidade de sementes de *Pinus sylvestris* L. (Pinaceae). Por emitir baixa energia, a técnica confere a manutenção da viabilidade das sementes, com a possibilidade de semeadura e posterior comparação com o teste de germinação (SIMAK; BERGSTEN; HENRIKSSON, 1989).

Desde 1980 é descrito pela ISTA como um teste rápido e não destrutivo, sendo indicado para avaliar a qualidade física das sementes, por meio da detecção e análise interna das suas estruturas. Seu princípio consiste na absorção de raios X em diversas quantidades pelos diferentes tecidos das sementes que geram uma imagem latente com sombras claras e escuras (ISTA, 2009).

O teste tem sido aprimorado e empregado com o objetivo de obter informações sobre a ocorrência de sementes malformadas, vazias, infestações por insetos e fungos, e além dos danos ocorridos no eixo embrionário (HUANG et al., 2015) contribui para seleção e descarte de lotes de sementes indesejáveis e correlacionar as informações com o teste de germinação e tetrazólio (CARVALHO; NOVEMBRE, 2012).

A análise radiográfica está contida no conjunto de técnicas denominado de Análise de Imagens, com diversos objetivos, dentre os quais está a detecção de insetos pragas. Essa análise foi empregada por Masetto et al. (2007) em sementes de *Eugenia pleurantha* (Myrtaceae) infestadas por larvas de bruquídeos (Coleoptera: Bruchidae) e permitiu associar quedas no poder germinativo quando da ocupação das larvas em mais de 50% dos tecidos internos das sementes. Da mesma forma, a técnica de análise radiográfica possibilitou avaliar e associar os danos causados por percevejos em sementes de feijão (FORTI et al., 2008), danos mecânicos internos em sementes de milho (CARVALHO et al., 1999b; CICERO; BANZATTO JUNIOR, 2003) e de soja (OBANDO FLOR et al., 2004), com os prejuízos na germinação das sementes.

No Brasil, a introdução, utilização e funcionamento de aparelhos de raios X e instalações radiotivas são regulamentados pela resolução nº 145, de 20 de março de 2013 da Comissão Nacional de Energia Nuclear – CNEN (CNEN, 2013). Com base nesta resolução ficam estabelecidos os requisitos de segurança e proteção radiológica necessários para o licenciamento das instalações de radiografia, incluindo a posse, utilização, armazenamento e transporte de fontes de radiação para uso nessas instalações. Entretanto, para equipamentos geradores de radiação ionizante de baixo risco, como é o caso do sistema de raios X em cabine com revestimento interno de placa de chumbo, capaz de reter os raios emitidos e evitar sua exposição direta aos analistas, o equipamento está isento do processo de licenciamento, uma vez que atende os critérios estabelecidos na norma CNEN NN 3.01 Diretrizes Básicas de Proteção Radiológica e na Posição Regulatória PR 3.01/001 Critérios de Exclusão, Isenção e Dispensa de Requisitos de Proteção Radiológica (CNEN, 2014).

Apesar de ser um método rápido e seguro, ressalta-se a necessidade de verificar se este apresenta precisão, repetibilidade, reprodutibilidade e robustez dos resultados obtidos.

2.4 Sistema de validação metodológica

Os métodos de validação metodológica, normalmente utilizados para sementes, são definidos pela ISTA. Via de regra é um processo voltado ao desenvolvimento de um método

para novas espécies, comparar diferentes métodos e dentre eles escolher o mais adequado à situação, aperfeiçoar um método específico e comparar métodos tradicionais com um novo (ISTA, 2007).

A validação de métodos foi desenvolvida entre 1901 e 1905, a partir de um comitê com três especialistas em testes de sementes, constituído via Sociedade Agrícola Alemã e a Associação de Estações Experimentais Agrícola do Império Alemão. Os especialistas organizaram e padronizaram os testes com aporte de 23 estações experimentais, as quais deveriam evidenciar reprodutibilidade e praticabilidade (ISTA, 2008).

Conforme as regras oficiais, a validação ocorre por colaboração multilaboratorial ou validação dos pares. O primeiro sistema é o mais empregado e baseia-se na ocorrência simultânea dos testes em, no mínimo, seis laboratórios, de forma colaborativa. Entretanto, por se tratar de um teste lento e dispendioso, há o Programa Peer-Validation, baseado na validação dos métodos através da colaboração de dois laboratórios. Este sistema pressupõe eficiência e redução de tempo, específico para testes que exijam resultados rápidos, com nível de confiança adequado no processo de validação (ISTA, 2007).

Na escolha dos laboratórios participantes recomenda-se selecionar aqueles que tenham profissionais qualificados em testes de qualidade ou técnicas específicas como o teste comparativo; que apresentem instalações e equipamentos apropriados para executar as análises e, atenda e aceite os termos para participação do programa de validação de metodologia (ISTA, 2007). Em outras palavras é recomendado designar laboratórios com maiores números de métodos desenvolvidos, validados e já publicados nas regras oficiais.

O desenvolvimento de um método necessariamente adequado para atender cada caso, especificamente, pode ser processado conforme: (i) necessidade de adaptação de um método existente ou, (ii) a criação de um novo método, em que ambos se materializem a partir de esboços, conhecimento e experiência dos analistas (ISTA, 2007). Para ambas as situações, é necessário que o processo de desenvolvimento e a avaliação do método ocorram de forma interativa, até que este seja considerado adequado, ou seja, validado.

Após decisão das variáveis supracitadas, o processo de validação desenvolve-se da seguinte maneira: seleção e desenvolvimento do método, validação via testes comparativos, revisão dos resultados e preparação do relatório final, a exemplo de uma instrução normativa a qual é encaminhada para aprovação e publicação pelo órgão competente, como o Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento no Brasil.

No Brasil dois trabalhos envolvendo validação de métodos foram desenvolvidos e merecem destaque. O primeiro trabalho, proposto por Kataoka et al. (2011), envolveu a validação do teste de germinação em sementes de nabo-forrageiro, *Raphanus sativus* L. var. *oleiferus*, onde as metodologias de germinação com uso de substrato areia e papel foram consideradas validadas, pois denotaram exatidão, robustez e precisão. No trabalho proposto por Santana et al. (2012), foi desenvolvido a validação para testes de germinação em diferentes espécies florestais brasileiras, e ao final do processo as metodologias foram validadas.

2.5 Testes estatísticos no processo de validação de métodos

O Comitê Estatístico da ISTA orienta para a retirada de possíveis valores discrepantes (*outliers*) do banco de dados, previamente às análises estatísticas. A presença desses valores torna o modelo mal especificado, leva à estimação viesada de parâmetros e, por conseguinte, contribui para resultados incorretos (LIU et al., 2004).

A identificação dos valores discrepantes é realizada por testes estatísticos e técnicas gráficas. Assim, o Comitê Estatístico da ISTA preconiza a utilização do teste de Hampel (1974) e o Boxplot. O primeiro é robusto para a detecção de *outlier* e troca as estimativas da média e do desvio padrão, sensíveis à presença de *outlier*, pela mediana e o desvio absoluto mediano, respectivamente (KATAOKA et al., 2011). O Boxplot é um tipo de gráfico que sumariza a mediana, quartis inferior e superior, valores máximo e mínimo; além de dar ideia da posição, dispersão, assimetria e presença de valores discrepantes e confrontar as variáveis da mesma natureza em uma mesma escala (BUSSAB, MORETTIN, 2003).

A identificação de *outliers* nas variâncias consiste em avaliar se a variância de algum laboratório é discrepante em relação aos demais e, caso seja identificado como *outlier*, recomenda-se a retirada para as próximas etapas (ISTA, 2007). Um dos pressupostos fundamentais é considerar que as variâncias são homogêneas, dentro dos limites de tolerância (KATAOKA et al., 2011).

Os testes de Bartlett (1937), Cochran (1941), Levene para mediana (BROWN; FORSYTHE, 1974) e Levene para a média (1960) podem ser utilizados para determinar variâncias entre os laboratórios. Entretanto, em ensaios preliminares, Kataoka et al. (2011) verificaram que os três primeiros testes não demonstraram evidências para rejeitar a hipótese de homogeneidade das variâncias para dois métodos de germinação (areia e papel) de nabo forrageiro. Bartlett e Cochran são sensíveis a desvios de normalidade, enquanto Levene,

modificado para a mediana, é robusto com relação a desvios de normalidade, mas ineficiente para detectar desigualdade de variâncias com zeros estruturais (ALMEIDA et al., 2008).

O teste de Levene para média é o único capaz de rejeitar a hipótese nula e é robusto para uma grande variedade de distribuições (VORAPONGSATHORN; TAEJAROENKUL; VIWATWONGKASEM, 2004). Sua estatística é obtida a partir de uma análise de variância com um único fator, já que os níveis são os grupos e cada observação é k substituída pelo desvio absoluto da variável em relação à média do seu respectivo grupo (ALMEIDA et al., 2008).

Na validação de método para testes de qualidade de sementes, a precisão dos resultados é avaliada pela precisão dentro do laboratório (repetibilidade) e a precisão entre laboratórios (reprodutibilidade). Com base no pressuposto da ISTA (2007), a repetibilidade quantifica a variabilidade média dos resultados dentro de cada laboratório, ao passo que as repetições são feitas na amostra de um dado lote e a reprodutibilidade será a repetibilidade aumentada pela variabilidade dos resultados de um laboratório para outro laboratório de um dado lote (variância entre laboratórios), calculadas com base na ISO 5725-2 (ISO, 1994a).

Os limites críticos da repetibilidade e reprodutibilidade podem ser calculados a partir da multiplicação destes por um fator numérico D , equivalente a uma amplitude padronizada baseada na tabela de Tukey (1977), com graus de liberdade tendendo para o infinito. Consequentemente, são utilizados na comparação com as amplitudes determinadas entre as repetições entre e dentro dos laboratórios para indicar a aceitabilidade ou não dos índices obtidos de repetibilidade e reprodutibilidade.

A estatística k de Mandel é outra medida que pode auxiliar na avaliação da precisão, repetibilidade e da reprodutibilidade, além de indicar o desvio de um laboratório, na comparação com o desvio padrão da repetibilidade. Enquanto a estatística h relaciona-se com a avaliação da exatidão, pois o seu valor é a medida do desvio da média de um laboratório, que indica quais deles apresentam resultados sub ou superestimados em relação à média geral de todos os laboratórios (ISTA, 2007).

3 MATERIAL E MÉTODOS

No processo de validação de análise radiográfica para o exame de infestação de gorgulho em sementes de milho, o trabalho foi executado em três etapas. Na primeira etapa, realizada no Laboratório de Análise de Sementes do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras, foram selecionadas sementes de milho conforme a presença ou não de sinais de infestação e caracterizados os níveis de infestação de *S. zeamais*. A segunda etapa consistiu na distribuição dos materiais para laboratórios previamente selecionados, e na terceira etapa, procedeu-se a avaliação dos resultados por meio de ferramentas estatísticas.

3.1 Procedimentos para obtenção dos diferentes níveis de infestação

As sementes infestadas com *S. zeamais* foram obtidas pela manutenção de 400 sementes com 10 insetos adultos do inseto, em três recipientes de vidro com capacidade para 300 mL, fechados com tecido voile, para garantir circulação de ar e sobrevivência dos insetos, mantidos em sala climatizada à (25° C e 65% UR) do Laboratório de Entomologia da Universidade Federal de Lavras, durante 30 dias.

Quinze dias após a infestação do *S. zeamais* avaliou-se 32 amostras com 25 sementes, identificadas numericamente e sobrepostas em placas de filme de poliéster com fita adesiva dupla face, para serem radiografadas. O material foi submetido ao teste de raios X, sem e com contraste, utilizando o aparelho Faxitron HP MX-20 digital, do Laboratório Central de Análise de Sementes da UFLA, calibrado com intensidade de radiação (24 kv, 1 min) aos 35 cm da fonte emissora. A calibração com contraste foi realizada colocando as sementes em contato com vapor de clorofórmio, por quatro horas, em pote de vidro vedado, para validar a análise radiográfica sem contraste, conforme trabalho de Leite (2016).

Após analisar visualmente as radiografias, as sementes foram separadas em dois grupos: sementes isentas e sementes com sinais/presença de larva, pupa e/ou inseto adulto. Para confirmação da infestação, as sementes foram retiradas das placas e distribuídas em caixas plásticas contendo 100 compartimentos, que permitiram a individualização das sementes, que foram imersas em água deionizada por um período de 24 h. Após imersão, com ajuda de bisturi, procedeu-se o corte das sementes, para análise interna (BRASIL, 2009). As sementes foram confirmadas quanto à presença do inseto em qualquer estágio de desenvolvimento, comparadas com as radiografias e fotografadas com câmera Sony α 57 DT 18-55 mm F3.5 – 5.6 SAM.

Confirmadas as sementes infestadas, ou não, por larva, pupa, adulto e danos do inseto, procedeu-se a seleção das radiografias mediante uso do software CoreIDRAW® X8 para elaboração de oito pranchas, com 25 sementes cada, visando compor cada tratamento ou nível de infestação. Os tratamentos obtidos foram: controle (sementes sem infestação – 0%) e os níveis 1, 3 e 5% de infestação de gorgulho, correspondentes aos limites máximos aceitáveis de infestação para lotes comerciais de sementes básicas, C1, C2 (3%) e S1, S2 (5%).

Após a composição dos quatro tratamentos, correspondentes aos quatro níveis de infestação (0, 1, 3 e 5%, respectivamente), procedeu-se a distribuição das radiografias aos laboratórios participantes, para fins de avaliação.

3.2 Distribuição das radiografias e protocolos para os laboratórios

Para firmar parcerias no processo de validação do método, foi encaminhada carta convite para 10 laboratórios (Anexo A) credenciados junto ao MAPA, selecionados com base nas experiências com análise de sementes de milho.

Para cada laboratório foi enviado um Protocolo Geral de Validação de Metodologia (Anexo B) com orientações e Guia de Identificação com imagens radiográficas, distinguindo o inseto nos diferentes estágios de desenvolvimento, para familiarizar e treinar os analistas. Após 7 dias do envio do protocolo, encaminhou-se por e-mail as 32 radiografias, obtidas das 8 repetições de 25 sementes x 4 níveis de infestação, as quais foram avaliadas por 4 (quatro) analistas (repetições) de cada laboratório participante.

Os resultados do número de sementes com e sem danos observados foram anotados na Ficha de Avaliação (Anexo C) e, ao fim das análises aplicou-se um Questionário de Avaliação (Anexo D) para os analistas indicarem experiências e observações na execução do método.

Os resultados de avaliação e questionário foram enviados ao laboratório organizador via correspondência eletrônica para proceder as análises estatísticas.

3.3 Análises estatísticas

As técnicas estatísticas foram adotadas para a identificação de valores discrepantes e *outliers* nas variâncias; avaliação dos efeitos de laboratórios e níveis de infestação; verificação da precisão (repetibilidade e reprodutibilidade), exatidão e robustez do método.

Para os procedimentos estatísticos foram considerados o somatório de infestação obtida em cada nível (8 placas x 25 sementes) formando uma repetição de 200 sementes por nível. A variável resposta em estudo foi o nível de infestação de gorgulho observado nas sementes (Y).

Para as análises estatísticas foram utilizadas funções estatísticas específicas de validação, a partir do software R (R Development Core Team[®], 2017).

3.3.1 Valores discrepantes

A detecção de *outliers* dos laboratórios deu-se pelo método de Hampel (1974):

- computar a mediana ($\check{Y}_{j..}$) e o desvio absoluto mediano $MAD_j .. = \text{mediana } \{|Y_{jlk} - \check{Y}_{j..}|\}$, em que Y_{jlk} é a j -ésima porcentagem de infestação observada na k -ésima repetição (ensaio) do l -ésimo laboratório;
- utilizar a regra $|Y_{jlk} - \bar{Y}_{j..}| > 5,2 MAD_j$ para identificar se uma determinada observação é um *outlier*.

Na ocorrência de algum *outlier*, existe a orientação do programa de validação para proceder a sua retirada do banco de dados, antes de proceder às próximas análises (ISTA, 2007).

Uma representação gráfica pelo esboço do Boxplot (TUKEY, 1977) foi utilizada tanto como uma técnica auxiliar ou confirmatória do método de Hampel, como para permitir uma avaliação visual do comportamento dos resultados.

3.3.2 Identificação de outliers nas variâncias

Com a média obtida em cada nível de infestação realizou-se o teste de Levene (1960):

$$W_j = \frac{(N_j - p_j) \sum_{i=1}^{p_j} n_{jl} (\bar{Z}_{jl} - \bar{Z}_{j..})^2}{(p_j - 1) \sum_{i=1}^{p_j} \sum_{k=1}^{n_{jl}} (\bar{Z}_{jlk} - \bar{Z}_{jl})^2} \quad (1)$$

em que $\bar{Z}_{jlk} = |Y_{jlk} - \bar{Y}_{jlk}|$, sendo \bar{Y}_{jlk} o estimador da média do l -ésimo laboratório e Y_{jlk} a porcentagem de infestação da k -ésima repetição no l -ésimo laboratório; n_{jl} é o número de repetições do l -ésimo laboratório e N_j é o número total de observações ($N_j = \sum_{i=1}^{p_j} n_{jl}$).

A estatística W_j , sob H_0 , segue uma distribuição F com $(p_j - 1)$ e $(N_j - p_j)$ graus de liberdade.

No detecção da presença de *outlier*, o laboratório com maior variância foi retirado e o processo repetido, até que continuassem apenas os laboratórios com variâncias homogêneas de acordo com o teste Levene.

3.3.3 Avaliação dos efeitos de laboratórios e níveis de infestação

Os dados foram submetidos à análise de variância e o efeito dos níveis de infestação, teve suas médias agrupadas pelo teste de Scott-Kott ($p < 0,05$), utilizando o programa R (R Core Team[®], 2017).

Para avaliar os efeitos dos laboratórios e níveis de infestação foi aplicada a teoria da análise de variância em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 4 x 4 x 10 (4 níveis de infestação x 4 repetições x 10 laboratórios). Uma vez que a interação entre laboratórios e níveis foi não-significativa, esta foi considerada desprezível e seu efeito foi discriminado juntamente com os resíduos.

Utilizou-se o modelo estatístico proposto por Kataoka et al. (2011):

$$Y_{jlk} = \mu + \beta_j + \gamma_l + \varepsilon_{jlk} \quad (2)$$

em que Y_{jlk} é a porcentagem de infestação da k -ésima repetição, no l -ésimo laboratório e j -ésimo nível ($\forall k = 1, \dots, n_r, l = 1, 2, \dots, p$ e $j = 1, 2, \dots, n_j$); μ é a média geral; β_j é o efeito do j -ésimo nível; γ_l é o efeito do l -ésimo laboratório; ε_{jlk} é o erro experimental da k -ésima repetição, no l -ésimo laboratório e j -ésimo nível ($\varepsilon_{jlk} \sim \text{NID}(0, \sigma^2)$)⁶; n_j = número de níveis; n_r = número de repetições e p = número de laboratórios.

3.2.2.2.1 Repetibilidade, reprodutibilidade e estatísticas h e k de Mandel

A variância de repetibilidade (S_r^2) representa a variabilidade dentro dos laboratórios. Para o j -ésimo nível, o seu estimador foi obtido por meio da expressão 3 (ISO 5725, 1994b):

$$S_{rj}^2 = \frac{\sum_{l=1}^{P_j} (n_{jl} - 1) S_{jl}^2}{\sum_{l=1}^{P_j} (n_{jl} - 1)}, \quad (3)$$

em que n_{jl} é o número de repetições do l -ésimo laboratório; P_j é o número de laboratórios e S_{rj}^2 é o estimador da variância do l -ésimo laboratório.

Com seu valor determinado, calculou-se o limite crítico (r) de repetibilidade, estimado por $r = S_{rj} D_j$, em que D_j foi obtido da tabela de Tukey, com graus de liberdade tendendo para o infinito e grau de confiança de 99% (BANZATTO, KONKRA, 2006).

O valor de r foi comparado com a amplitude entre as repetições de cada laboratório, em cada nível (Lr_{jl}), com o objetivo de indicar os laboratórios com repetibilidade aceitável.

A variância de reprodutibilidade (S_{Rj}^2) representa uma medida da variabilidade entre e dentro dos laboratórios. Para o j -ésimo nível, o seu estimador foi obtido por meio da expressão 4 (ISSO 5725, 1994a):

$$S_{Rj}^2 = S_{rj}^2 + S_{Lj}^2, \quad (4)$$

em que $S_{Lj}^2 = \frac{s_{d_j}^2 - s_{rj}^2}{\bar{n}_j}$, é o estimador da variância entre laboratórios; $S_{d_j}^2 = \frac{1}{(P_j - 1)} \sum_{l=1}^{P_j} n_{jl} (\bar{Y}_{jl} - \bar{Y}_{j..})^2$; sendo $\bar{Y}_{j..}$ o estimador da média geral de todas as observações e \bar{Y}_{jl} o estimador da média do l -ésimo laboratório; $\bar{n}_j = \frac{1}{(P_j - 1)} \left(\sum_{l=1}^{P_j} n_{jl} - \frac{\sum_{l=1}^{P_j} n_{jl}^2}{\sum_{l=1}^{P_j} n_{jl}} \right)$.

A partir da determinação do seu valor, calculou-se o limite crítico (R) de reprodutibilidade para cada nível, estimado por $R_j = S_{Rj} D_j$. Esse valor de R foi comparado com a amplitude entre os laboratórios para cada repetição, com discriminação de quais níveis apresentaram reprodutibilidade aceitável, com 99% confiança.

Outra medida utilizada para auxiliar na avaliação da precisão dos resultados foi a estatística k de Mandel, enquanto a estatística h foi a medida utilizada para avaliar graficamente a estimativa do viés, por conseguinte a exatidão, dos resultados, a partir da expressão (ISO 5725, 1994b):

$$h_{jl} = \frac{(\bar{Y}_{jl} - \bar{Y}_{j..})}{\sqrt{\frac{\sum_{l=1}^{P_j} (\bar{Y}_{jl} - \bar{Y}_{j..})^2}{(P_j - 1)}}} \quad (5)$$

$$h_c = \frac{(p - 1)t_{(\alpha, \eta)}}{\sqrt{p(t_{(\alpha, \eta)}^2 + p - 2)}} \quad (6)$$

em que h_c é o valor crítico referente a estatística h de Mandel; $t_{(\alpha, \eta)}$ é o quantil 100 $(1 - \alpha)$ % da distribuição t de Student, com graus de liberdade $\eta = (p - 2)$.

Após os cálculos, foram esboçados os gráficos dos valores de k e h para cada nível e laboratório, e comparados com os valores críticos para os $\alpha = 0,01$ e $0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Valores discrepantes (*outliers*)

Os resultados do fator laboratório evidenciaram menor quantidade de *outliers* no método de Hampel (1974) quando comparado com o Boxplot. Em comum, todas *outliers* identificadas no método de Hampel foram detectadas no Boxplot (Tabela 1).

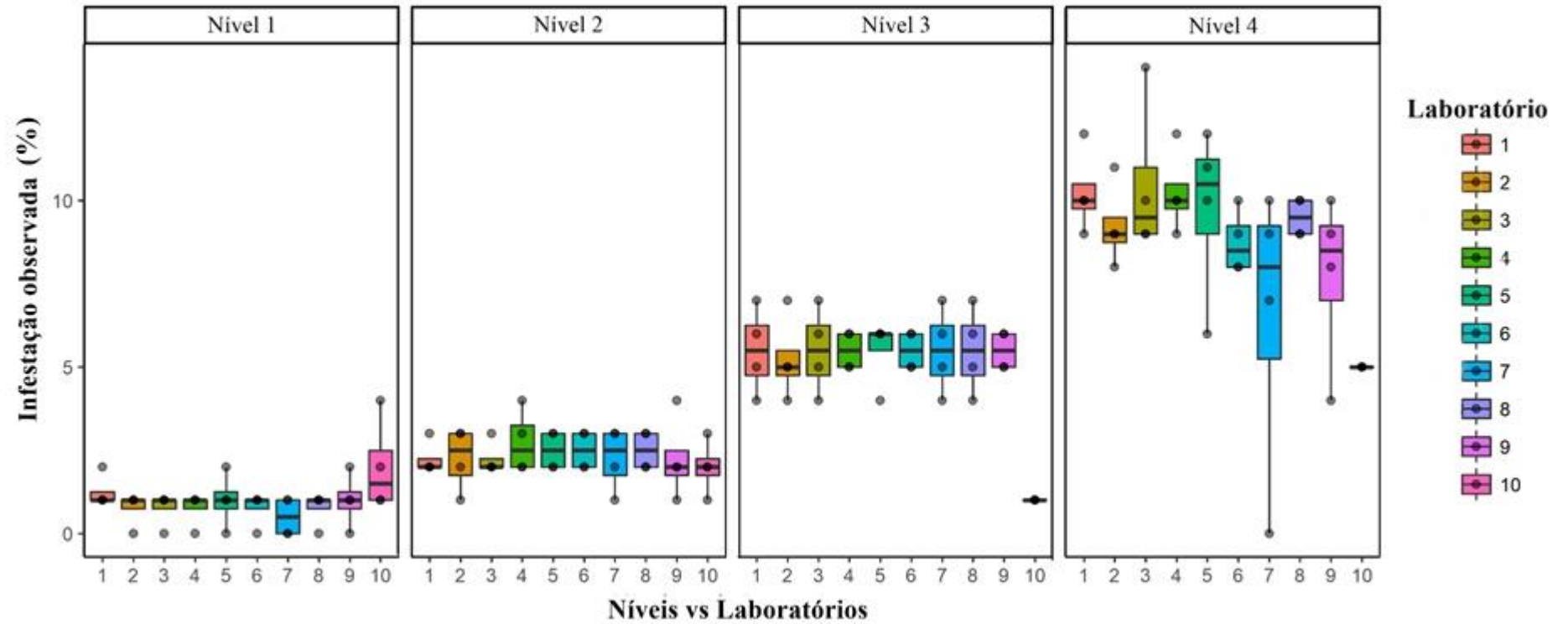
Tabela 1 - Identificação de valores discrepantes nos resultados do processo de validação de análise radiográfica para o exame de infestação de *Sitophilus zeamais* em sementes de milho, a partir das estatísticas de Hampel e Boxplot.

Método de Hampel				Boxplot			
Níveis de Infestação	Laboratórios	Repetições	Infestação observada	Níveis de Infestação	Laboratórios	Repetições	Infestação observada
1	1	4	2	1	1	4	2
	2	1	0		2	1	0
	3	3	0		3	3	0
	4	4	0		4	4	0
	5	1	2		5	1	2
	5	3	0		5	3	0
	6	2	0		6	2	0
	7	1	0		7	1	0
	7	4	0		7	4	0
	8	3	0		8	3	0
	9	1	0		9	1	0
	9	4	2		9	4	2
	10	1	4		10	1	4
10	2	2	10	2	2		
4	7	2	0	3	10	1	1
					10	2	1
					10	3	1
					10	4	1
4	7	2	0	4	3	3	14
					9	1	4

Fonte: Do autor (2018).

A sumarização do Boxplot (Figura 1) indica tendência linear positiva para infestação observada e *outliers*, em função do aumento nos níveis de infestação. Os menores valores de mediana e variabilidade obtidos para os níveis 1, 2 e 3, em relação ao nível 4, sugerem precisão dos laboratórios em determinar os níveis com distintas qualidades. Em função da presença de *outliers*, observa-se sobreposição de caudas entre os níveis 1 com 2 e 3 com 4, o que sugere que suas médias não diferem entre si.

Figura 1 - Sumarização do Boxplot por agrupamento da infestação média de *Sitophilus zeamais* em sementes de milho observada pelos laboratórios via análise radiográfica.



Legenda: (•) representa os *outliers* observados por cada laboratório participante; Linha escura no centro da caixa indica a mediana, as caixas representam os quartis e as linhas, as caudas.

Fonte: Do autor (2018).

As menores quantidade de *outliers* encontradas na estatística de Hampel decorre da utilização de estimador insensível a desvios de pressuposições básicas, enquanto as maiores quantidades de *outliers* no Boxplot decorre da sensibilidade a valores discrepantes e de intervalo normal mais estreito (KATAOKA et al., 2011; ZHAO et al., 2013), o que permite confirmar os resultados exibidos na estatística de Hampel. No entanto, a sensibilidade do Boxplot pode superestimar a correta identificação de *outliers*, com riscos para distorções e conclusões inválidas.

Em relação as maiores quantidades de *outliers* observadas nos níveis com menor variabilidade, resultados semelhantes foram evidenciados por Behrens (1997a) ao relacionar maior número de *outliers* em níveis com baixa variabilidade e com menores faixas interquartis. É provável que o excesso de *outliers* esteja relacionado a determinada variabilidade inerente aos analistas (acuidade visual), à eventos inesperados (desistência de analistas) ou adoção de parâmetros de avaliação distintos entre os laboratórios ou analistas. Ressalta-se que a sobreposição de caudas provocadas pelos discrepantes na análise do Boxplot pressupõe redução da precisão dos laboratórios quanto à distinção de determinados níveis de infestação. Trata-se, portanto, de um fator que conduz a um modelo estatístico mal especificado, com tendência a estimação viesada de resultados (KATAOKA et al., 2011).

Em função dos problemas apontados, nos processos de validação a ISTA preconiza pressupostos estatísticos, a exemplos do Hampel e Levene, capazes de detectar lotes ou amostras com medianas próximas, graus de variabilidade e, apontar se a continuidade de dados é capaz de formar distintas qualidades. Estes pressupostos são observados nas validações para introdução e germinação de *Brassica carinata* A. Braun (Brassicaceae) (ZECCHINELLI, 2017); determinação de umidade em sementes florestais (PASQUINI, 2015) e teste de qualidade para espécies florestais (SANTANA et al., 2012).

4.2 Identificação de *outliers* nas variâncias

O teste de Levene ($p < 0,01$) apesar de detectar variabilidade entre os laboratórios dentro de cada nível (Tabela 2), não apontou pressuposição para aceitar a hipótese de variâncias heterogêneas. Essa decisão reduz o risco de considerar que um laboratório esteja fora do padrão quando de fato não está.

Tabela 2 - Resultados do teste de Levene, a 1% de significância, para detecção de *outliers* nas variâncias para cada nível de infestação de *Sitophilus zeamais*.

Níveis	Valor-p após retirada de <i>outliers</i>	Condição	Indicação
1	-	Variâncias homogêneas	Continuar a análise
2	0,7687	Variâncias homogêneas	Continuar a análise
3	0,2424	Variâncias homogêneas	Continuar a análise
4	0,5983	Variâncias homogêneas	Continuar a análise

Fonte: Do autor (2018).

Ao considerarmos a utilização do teste de Levene para comparação de variância de grupos distintos, observa-se que no Nível 1 o Valor-p retornou um resultado não numérico (Not a Number). Frequentemente, em grupos sem variabilidade, o quociente com um valor próximo a zero no denominador vai tender a infinito, e o resultado não será um número. Apesar deste resultado, a homocedasticidade alcançada em ambos os grupos presume que as variâncias dos laboratórios em relação aos níveis de infestação são equivalentes (KATAOKA et al., 2011).

4.2.1 Avaliação dos efeitos de laboratórios e níveis de infestação

Uma vez retirados os *outliers*, o delineamento experimental passou a ser não balanceado. Para garantir a coerência entre os resultados, foram utilizadas as somas de quadrado tipo III, para a obtenção dos quadrados médios (Tabela 3).

Tabela 3 - Resumo da análise de variância e teste de Shapiro-Wilk para a variável infestação de *Sitophilus zeamais* em sementes de milho, com interação confundida no resíduo.

Fonte de variação	G.L.	Quadrado médio	F	Valor p
Laboratório	9	10,7062	6,9041	<0,0001**
Níveis	3	435,6060	280,9077	<0,0001**
Resíduo	132	1,5507		
C.V. (%)		26,91		
Shapiro – Wilk (valor p)		0,0002		

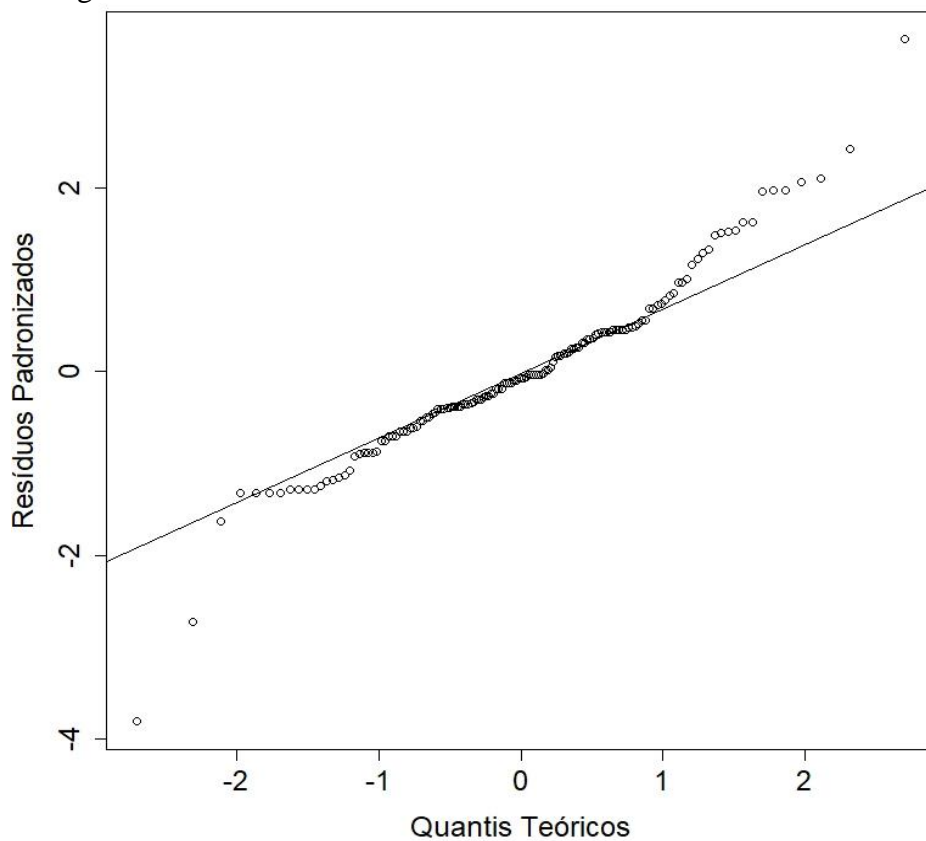
Fonte: Do autor (2018).

Ocorreu efeito altamente significativo ($p < 0,01$) tanto para laboratórios quanto para níveis, semelhante observações de Kataoka et al. (2011) frente à validação de teste de germinação em nabo forrageiro e de Wagner et al. (2016) na validação de substituição da germinação de *Brassica* spp. pela medição de sua condutividade. As diferenças para laboratórios e níveis já eram esperadas, no primeiro caso é provável ter ocorrido efeito das

diferentes experiências dos analistas com exame de infestação tradicional e com a metodologia de análise radiográfica testada, o que dificultou a identificação/diferenciação de danos pelo inseto. Quanto ao efeito dos níveis as diferenças são lógicas, uma vez que no processo de validação o princípio é a utilização de lotes ou amostras com distintos níveis de qualidade (ISTA, 2007).

A partir do teste de Shapiro-Wilk ($p < 0,01$) ficou evidenciado que para os resíduos dos percentuais de infestação observada em todos os níveis, o pressuposto de normalidade foi atendido (Figura 2).

Figura 2 - Verificação das suposições de normalidade dos resíduos em função da análise radiográfica.



Fonte: Do autor (2018).

Observa-se que os maiores desvios de normalidade se dispõem na cauda superior, ao contrário das observações de Kataoka et al. (2011) mediante proposta de validação de metodologia para teste de germinação em sementes de nabo forrageiro, a partir da qual ocorreram maiores desvios nas caudas inferiores. Sileshi (2012) tem defendido a ideia de que o atendimento da pressuposição de normalidade é um objetivo desejável pois é um indício de não ocorrência de violação dos pressupostos do modelo de análise de variância.

4.4 Repetibilidade, reprodutibilidade e estatísticas k e h de Mandel

Repetibilidade e Reprodutibilidade

Os resultados de amplitude de cada laboratório (Lr_j) (Tabela 4) e de cada nível (Lr_{jk}) (Tabela 5) associadas aos limites críticos e graus de confiança de 99%, evidenciaram repetibilidade e reprodutibilidade aceitáveis para todos laboratórios e níveis de infestação.

Tabela 4 - Amplitude (Lr_{jl}), limite crítico, desvio padrão de repetibilidade e resultados da determinação da condição de repetibilidade (Re) ou não (Nr) para os laboratórios em cada nível de infestação de *Sitophilus zeamais*.

Laboratório		Níveis de infestação			
		1	2	3	4
1	Lr_{j1}	0	1	3	3
	Condição	Re	Re	Re	Re
2	Lr_{j2}	0	2	3	3
	Condição	Re	Re	Re	Re
3	Lr_{j3}	0	1	3	5
	Condição	Re	Re	Re	Re
4	Lr_{j4}	0	2	1	3
	Condição	Re	Re	Re	Re
5	Lr_{j5}	0	1	2	6
	Condição	Re	Re	Re	Re
6	Lr_{j6}	0	1	1	2
	Condição	Re	Re	Re	Re
7	Lr_{j7}	0	2	3	3
	Condição	Re	Re	Re	Re
8	Lr_{j8}	0	1	3	1
	Condição	Re	Re	Re	Re
9	Lr_{j9}	0	3	1	6
	Condição	Re	Re	Re	Re
10	Lr_{j10}	0	2	0	0
	Condição	Re	Re	Re	Re
Limite crítico		0,00	3,75	4,71	7,69
S_r		0,00	0,81	1,01	1,67

Legenda: Limites críticos calculados a partir da multiplicação dos valores de repetibilidade por um fator numérico D, obtidos da tabela de Tukey (1977), com graus de liberdade tendendo para o infinito.

Fonte: Do autor (2018).

Tabela 5 - Amplitude (Lr_{jk}), limite crítico, desvio padrão de reprodutibilidade e resultados da determinação da condição de reprodutibilidade (Re) ou não (Nr) para os níveis de infestação de *Sitophilus zeamais* em cada repetição.

	Níveis	Repetição				Limite crítico	S_R
		1	2	3	4		
1	LR_{j_1}	0	0	0	0	0,00	0,00
	Condição	Re	Re	Re	Re		
2	LR_{j_2}	2	3	2	3	3,39	0,73
	Condição	Re	Re	Re	Re		
3	LR_{j_3}	6	6	6	5	7,75	1,67
	Condição	Re	Re	Re	Re		
4	LR_{j_4}	8	6	9	6	10,08	2,19
	Condição	Re	Re	Re	Re		

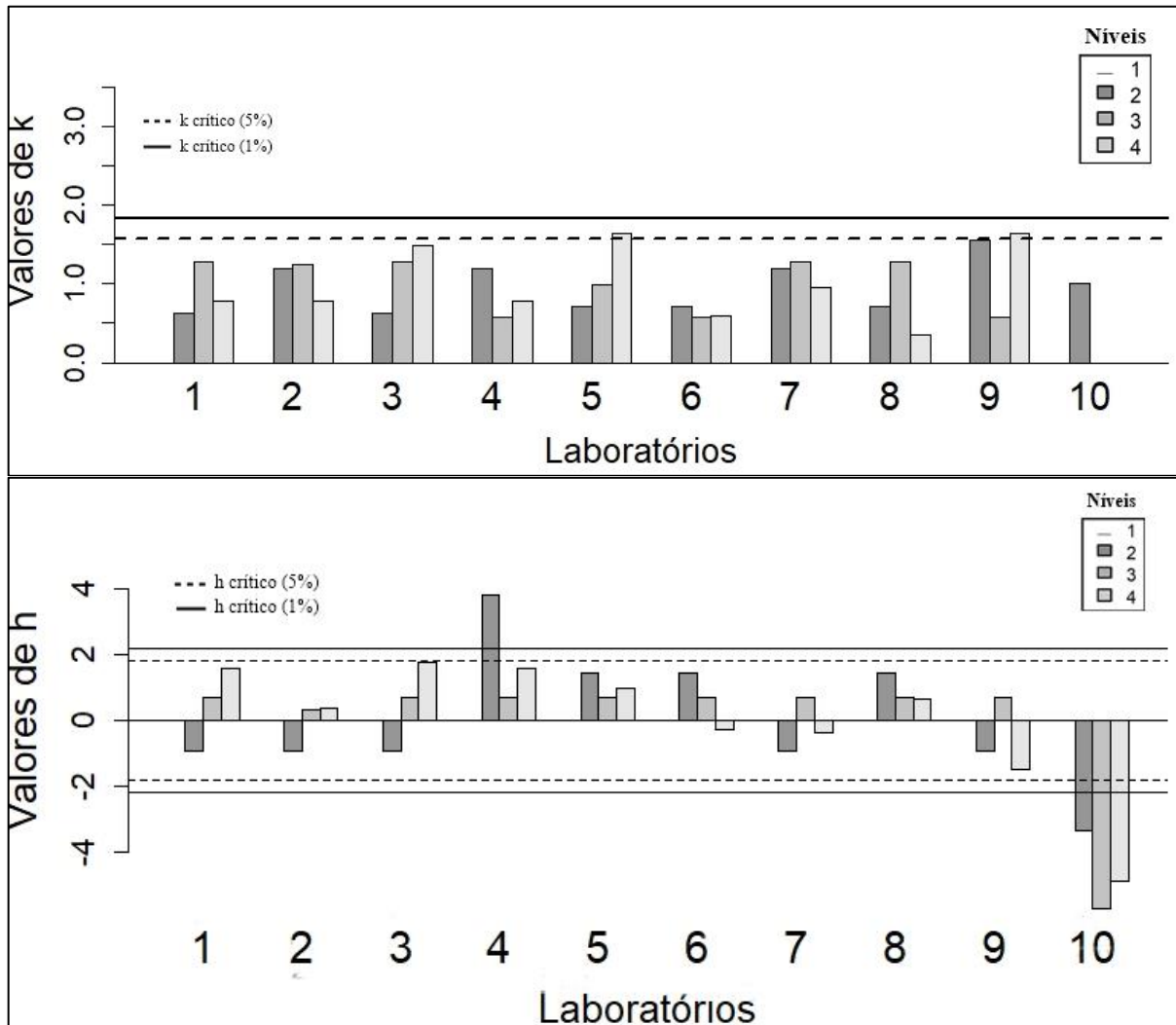
Legenda: Limites críticos calculados a partir da multiplicação dos valores de reprodutibilidade por um fator numérico D, obtidos da tabela de Tukey (1977), com graus de liberdade tendendo para o infinito. Fonte: Do autor (2018).

Tanto para repetibilidade quanto reprodutibilidade, observou-se aumento do limite crítico e da variabilidade de repetibilidade e reprodutibilidade em função dos níveis de infestação. Resultados semelhantes foram relatados por Zecchinelli (2017) em estudo para introdução de *Brassica carinata* com método de germinação em papel com temperatura constante (20° C) ou alternada (20 – 30° C). É provável que as variâncias de repetibilidade e reprodutibilidade tenham sido afetadas pela qualidade das sementes, sendo que lotes de baixa qualidade apresentam, muitas vezes, variâncias maiores. De forma geral, a menor a variabilidade pode indicar maior confiabilidade nos resultados e maiores condições dos laboratórios em reproduzirem e repetirem a metodologia proposta (ISO 5725, 1994b).

Estatísticas k e h de Mandel

Com a plotagem do gráfico dos valores de k verificaram diferentes graus de variabilidade entre os laboratórios, com tendência de os laboratórios 5 e 9, em relação ao nível 4 de infestação, ultrapassarem o limite crítico à 5%. Foi observado padrão aleatório em relação a super e subestimação de resultados para a estatística h de Mandel, onde o laboratório 4 superestimou o nível 2, e o laboratório 10 subestimou todos os níveis. Os laboratórios citados ultrapassaram os limites críticos, a 1% e 5% (Figura 3).

Figura 3 - Gráficos dos valores de k e h para o exame de infestação de *Sitophilus zeamais* em sementes de milho realizado a partir de análise radiográfica.



Fonte: Do autor (2018).

Comportamentos semelhantes em relação as variabilidades e níveis de subestimação e superestimação de resultados entre laboratórios foram observados por Nijënstein e Eekelen (2015) na validação de germinação de duas espécies da família Poaceae, assim como Hosseini, Gallo, Ilbi (2014) em proposta de adição de grão-de-bico (Fabaceae) ao teste de condutividade para o vigor das sementes e, também, Gallo et al. (2016) na validação do método de tetrazólio como teste de vigor para sementes de soja. Em ambas as validações, mesmo com certos graus de precisão e exatidão acima dos limites críticos estabelecidos, na média, os testes foram repetitivos dentro de laboratórios e reproduzíveis em diferentes laboratórios.

Problemas de repetibilidade e reprodutibilidade podem estar relacionados com a utilização de critérios distintos na avaliação do método proposto, seja do protocolo fornecido, da falta de experiência com o método ou entendimento ambíguo do objetivo proposto. Na prática, laboratórios com repetibilidade e reprodutibilidade problemáticos são contatados e, a critério do pesquisador, os dados podem continuar (ISO 5725, 1994b). Isso ocorre porque o estudo de repetibilidade e reprodutibilidade permite o monitoramento da precisão dos métodos e dá indícios de melhoria da qualidade dos laboratórios (CHUI et al., 2004).

Para auxiliar na compreensão das informações estatísticas, os resultados do questionário de avaliação indicaram o comportamento dos laboratórios frente a execução do método proposto. Todos os laboratórios demonstraram inexperiência e/ou ausência de contato com o uso de raios X para análise de sementes, o que resultou em:

- i - difícil identificação de oviposição e larvas nos primeiros estádios de desenvolvimento;
- ii – dúvidas quanto aos sinais de infestação em relação às regiões da camada negra e do embrião, pois apresentam coloração ou pontos escuros e desuniformes, confundidos com danos do inseto;
- iii – dificuldade de diferenciação de indícios de infestação com partes (tecidos) da semente, possivelmente em função da variação na nitidez das radiografias;
- iv - dúvidas e insegurança em confirmar se era ovo, dano mecânico ou tecido da semente;

Mesmo com dificuldades, 80% dos laboratórios consideraram a metodologia viável para uso em rotina, 40% consideraram a metodologia proposta de fácil execução, e outros 40% apresentaram prós e contras entre a metodologia proposta e a tradicional.

A partir do questionário os laboratórios apresentaram as seguintes observações:

- A priori o método parece “muito subjetivo”, seja em função da “falta de nitidez das imagens, ou conhecimento da técnica”;
- É necessário “treinamentos e práticas” com ênfase na “melhor combinação de intensidade de radiação e tempo de exposição para melhorar a nitidez das imagens; treinar a acuidade visual para evitar falsos positivos e negativos (trincas, pontos de pixels, danos mecânicos e estruturas da semente) os quais foram confundidas com indícios de infestação”;
- “Para melhor análise” das radiografias, “o ambiente deve ser de baixa luminosidade”;
- O método proposto demonstra ser viável para uso em rotina, especialmente por ser mais rápido, prático para a montagem e realização do teste” que, “em relação à metodologia tradicional com uso de lâmina, é cansativa e pior para ergonomia”.

Ressalta-se que a viabilidade de uso de análise radiográfica em sementes foi demonstrada em estudos de detecção e classificação dos danos de percevejos em cotilédones de *Crotalaria juncea* L. (Fabaceae) (ARRUDA et al., 2016), na infestação do caruncho-do-feijão, *Callosobruchus maculatus* (Fabr., 1775) (Coleoptera: Bruchinae), em sementes de soja (CHELLADURAI et al., 2014) e também na classificação de estágios de desenvolvimento de gorgulho-do-milho em sementes de milho de pipoca (BRABEC et al., 2017). Os resultados podem ser explicados pela capacidade de os raios X formarem diferentes níveis de atenuação entre semente e sinais de infestação, desde que exista variação na densidade/composição de cada objeto radiografado (CROCKER et al., 2014).

O método de análise radiográfica para detecção dos níveis de infestação é útil quando os danos ou sinais de infestação por inseto, como orifícios de entrada ou saída, não são visivelmente externos às sementes. O sucesso na interpretação das radiografias depende de experiência pois as imagens são geradas em preto e branco (SCHMIDT, 2000), o que possibilita interpretações distintas de indícios de infestação (DOGAN et al., 2017). Por consequência, as interpretações ambíguas resultam em dois tipos possíveis de erro, o Falso positivo, quando o analista erra no diagnóstico de uma infestação; e o falso negativo, ocasião na qual a infestação não foi percebida (PEREIRA et al., 2009).

Apesar de não detectar ovos do inseto, o método de análise radiográfica em sementes, além das inspeções visuais e microscópicas, está aprovado na Europa para detecção de infestação e determinação dos níveis de qualidade, respeitando os limites estabelecidos (DOGAN et al., 2017). Aosa (1979) e Simak, Bergsten e Henriksson (1989) atribuem o sucesso da análise radiográfica na detecção de infestação em função da maior precisão, rapidez nas análises e ser não-destrutivo em relação ao corte de sementes, sem contar que pode indicar com precisão quais fatores interferem na qualidade, seja em função de espaços vazios, deficiências morfológicas e até danos mecânicos.

5 CONCLUSÕES

O teste de Levene, para níveis de infestação, identificou a existência de variabilidade dentro dos níveis sem pressupostos para eliminar qualquer laboratório do processo;

Com o estabelecimento dos limites críticos as condições para repetibilidade e reprodutibilidade foram alcançadas tanto para laboratórios quanto para os níveis de infestação;

A partir dos resultados da análise de variância e das variâncias de repetitividade e reprodutibilidade verificou-se que os métodos são robustos;

Na conjuntura das informações estatísticas para repetibilidade, reprodutibilidade e estatísticas de k e h de Mandel, os resultados obtidos nos dez laboratórios confirmam que os mesmos apresentam exatidão e precisão, dentro dos limites críticos de 1 e 5 %, para a infestação de *Sitophilus zeamais*.

O método proposto para o exame de infestação de *Sitophilus zeamais* em sementes de milho, com a utilização da análise radiográfica, é válido.

REFERÊNCIAS

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR ISSO/IEC 17025:** Requisitos Gerais para a Competência de Laboratórios de Ensaio e Calibração. Rio de Janeiro, 2005.
- ALMEIDA, A.; ELIAM, S; NOBRE, J. Modificações alternativas aos testes de Levene e de Brown e Forysthe para igualdade de variâncias e médias. **Revista Colombiana de Estatística**, Bogotá, v. 31, n. 2, p. 241-260, dez. 2008
- ANTONELLO, L.M.; MUNIZ, M.B.; BRAND, S.C.; VIDAL, M.D.; GARCIA, D.; RIBEIRO, L.; SANTOS, V. Qualidade de sementes de milho armazenadas em diferentes embalagens. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 7, p. 2191-2194, ago. 2009.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS. **Radiographic analysis of agricultural and forest tree seed**. Wichita: AOSA, 1979.
- AQUINO, S.; POTENZA, M. R. Análise da microbiota associada à entomofauna em rações a granel para animais domésticos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 80, n. 2, p. 243-247, abr./jun. 2013.
- ARRUDA, N.; CICERO, M. S.; GOMES-JUNIOR, F. G. Radiographic analysis to assess the seed structure of *Crotalaria juncea* L. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 38, n. 2, p. 162-169, jun. 2016.
- BANZATTO, D. A.; KONKRA, S. N. **Experimentação Agrícola**. 4. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2006.
- BARTLETT, M. S. Properties of sufficiency and statistical tests. **Proceedings of the Royal Statistical Society of London Series A: Mathematical, Physical & Engineering Sciences**, London, v. 160, n. 901, p. 268-282, 1937.
- BEHRENS, J. T. Principles and procedures of exploratory data analysis. **Psychological Methods**, [S.I], v. 2, n. 2, p. 131-160, 1997a.
- BELLUZZO, L. G. M.; FRISCHTAK, C. R. Produção de commodities e desenvolvimento econômico: uma Introdução. In: BELLUZZO, L. G; FRISCHTAK, C. R; LAPLANE, M. **Produção de commodities e desenvolvimento econômico**. Campinas: UNICAMP, 2014, p. 9-21.
- BOWERS, E.; HELLMICH, R.; MUNKVOLD, G. Comparison of fumonisin contamination using HPLC and ELISA methods in *Bt* and near-isogenic maize hybrids infested with European corn borer or western bean cutworm. **Journal Agricultural Food Chemical**, Washington, v. 62, n. 27, p. 6463-6472, june 2014.
- BRABEC, D.; CAMPBELL, J.; DOWELL, F.; WEST, M. Detection of internally infested popcorn using electrically conductive roller mills. **Journal of Stored Products Research**, Manhattan (KS), v. 70, p. 37-43, 2017.

BRASIL. Instrução Normativa nº 45, de 17 de setembro de 2013. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 20 set. 2013b. Seção 1, n. 183, p. 6-27.

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

_____. Decreto nº 5.153, de 23 de julho de 2004. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, n.142, p. 6, 26 jul. 2004.

BROWN, M. B.; FORSYTHE, A. B. Robust tests for equality of variances. **Journal of the American Statistical Association**, New York, n. 69, p. 364-367, June 1974.

BUSSAB, W. O.; MORETTIN, P. A. **Estatística básica**. 5. ed. São Paulo: Saraiva, 2003.

CARVALHO, C.; KIST, B.B.; SANTOS, C.E.; TREICHEL, M. **Anuário brasileiro de sementes**. Santa Cruz do Sul: Gazeta Santa Cruz, 2017.

CARVALHO, M. L. M. et al. Pre-harvest stress crack in maize (*Zea mays* L.) kernels as characterized by visual, X-ray and low temperature scanning electron microscopical analysis: effect on kernel quality. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 9, n. 3, p. 227-236, Feb. 1999b.

CARVALHO, T.; NOVENBRE, A. Comparação de métodos para avaliação de injúrias mecânicas em sementes de duas cultivares de soja. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 7, n. 3, p. 372-379, set. 2012.

CHELLADURAI, V. et al. Detection of *Callosobruchus maculatus* (F.) infestation in soybean using soft X-ray and NIR hyperspectral imaging techniques. **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v. 57, p. 43-48, Apr. 2014.

CHUI, Q. S. H. et al. O papel dos programas interlaboratoriais para a qualidade dos resultados analíticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 6, p. 993-1003, dez. 2004.

CICERO, S. M.; BANZATTO JUNIOR, H. L. Avaliação do relacionamento entre danos mecânicos e vigor, em sementes de milho, por meio da análise de imagens. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 25, n. 1, p. 29-36, Jul. 2003.

COCHRAN, W.G. The distribution of the largest of a set of estimated variances as a fraction of their total. **Annals of Eugenics**, London, n. 11, p. 47-52, Jan. 1941.

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR (CNEN). **Diretrizes básicas de proteção radiológica**, CNEN NN 3.01, 11 mar. 2014. Resolução CNEN 164/14 (Alteração do item 5.4.3.1)

_____. **Requisitos de Segurança e Proteção Radiológica para serviços de Radiografia Industrial**, CNEN NN 6.04, 25 mar. 2013. Resolução CNEN 145/13.

COMPANHIA NACIONAL DE ABSTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos: safra 2017 - 2018**. Brasília: Conab, v. 5, n. 6, p. 1-40, Mar. 2018.

COSTA, S. I. F. R. et al. Utilization of different corn fractions by broilers. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v. 17, n. 3, p. 307-312, jul./set. 2015.

CROCKER, T.; THAMBURAJ, R.; NAGAR, A. Segmentation techniques in X-ray images for the analysis of mango stem boring insects. **Mathematics For Applications**, República Checa, v. 3, p. 33-44, may 2014.

CUSTÓDIO, C. J. S. et al. Fatores que contribuíram para o crescimento da produtividade de milho no Brasil. **Revista Eletrônica da Univar**, Barra do Garça, v. 1, n. 15, p. 174-179, jun. 2016.

DOGAN, H.; SUBRAMANYAM, B.; PEDERSEN, J. R. Analysis for Extraneous Matter. In: NIELSEN, S. S. (eds). **Food Analysis**. 5. ed. Boston: Spring, v. 14, p. 351-356. 2010.

FORTI, V. A.; CICERO, S. M.; PINTO, T. L. F. Análise de imagens na avaliação de danos mecânicos e causados por percevejos em sementes de feijão. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 30, n. 1, p. 121-130, abr. 2008.

GALLO, C. et al. Proposal for the addition of tetrazolium method as a vigour test to *Glycine max* seeds. **ISTA Method Validation Reports**, Bassersdorf, p. 44-64, apr. 2016.

HAMPEL, F. R. The influence curve and its role in robust estimation. **Journal of the American Statistical Association**, Alexandria, n. 69, p. 383-393, june 1974.

HOSSEINI, M. K.; GALLO, C.; ILBI, H. Proposal for the addition of *Cicer arietinum* (Kabuli type) as a species to which the conductivity test for seed vigour can be applied. **ISTA Method Validation Reports**, Bassersdorf, n. 853, p. 33-41, apr. 2014.

HUANG, M. et al. Review of seed quality and safety tests using optical sensing technologies. **Seed Science and Technology**, Bassersdorf, v. 43, p. 337-366, apr. 2015.

INTERNATION ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). **Precision of Test Methods: ISO 5725/2**. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method. Geneva, dec. 1994a.

_____. **Precision of Test Methods: ISO 5725/4**. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 4: Basic methods for the determination of the trueness of a standard measurement method. Geneva, dec. 1994b.

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. **International Rules for Seed Testing**. Bassersdorf, 2009.

_____. **Seed Testing Internacional**. New Bulletin, 2008.

_____. **Method validation for seed testing**. Bassersdorf, 2007.

KATAOKA, V. Y. et al. Validação de metodologia para o teste de germinação em sementes de nabo forrageiro (*Raphanus sativus* L. var. *Oleiferus*). **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, n. 1 p. 69-79, mar. 2011.

LEITE, E. R. **Determinação de sementes infestadas por *Sitophilus zeamais* mots. 1855 em sementes de milho, pela técnica de raios-x com e sem contraste**. 2016. 36 p. Monografia (Graduação) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.

LEVENE, H. Robust Tests for Equality of Variances. In: OLKIN, I. et al. **Contributions to Probability and Statistics: Essays in Honor of Harold Hotelling**. Palo Alto: Stanford University Press, 1960. p. 278-292.

LIMA, J. M. E.; FAGUNDES, G. S.; SMIDERLE, O. J. Qualidade fisiológica de sementes de feijão-caupi tratadas com terra diatomácea e infestadas por carunchos. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, Maringá, v. 7, n. 3, p. 733-746, dez. 2014.

LIMA JUNIOR, M. J. **Manual de procedimentos para análise de sementes florestais**. Manaus: M. J. L. Junior, 2010.

LIMA-MENDONÇA, A. et al. Efeito de pós vegetais sobre *Sitophilus zeamais* (Mots., 1855) (Coleoptera: Curculionidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 80, n. 1, p. 91-97, jan./mar. 2013.

LIU, H.; SHAH, S.; JIANG, W. On-line outlier detection and data cleaning. **Computers and Chemical Engineering**, Amsterdam, v. 28, p. 1635-1647, mar. 2004.

LORINI, I. et al. **Manejo integrado de pragas de grãos e sementes armazenadas**. Brasília: Embrapa, 2015.

MASETTO, T. E.; DAVIDE, A. C.; SILVA, E. A. A.; FARIA, J. M. R. Avaliação da qualidade de sementes de *Eugenia pleurantha* (Myrtaceae) pelo teste de raios X. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 29, n. 3, p. 151-155, dez. 2007.

MATEUS, A. E. Potencial da *Moringa oleifera* como inseticida no controle de adultos de *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) em grãos de milho armazenados. **Acta Iguazu**, Cascavel, v. 6, n. 2, p. 112-122, jun. 2017.

NIJËNSTEIN, J. H.; EEKELEN, M. V. Validation study for the germination of *Dactylis glomerata* and *Festuca arundinacea*. **Seed Testing International**, Bassersdorf, n. 150, p. 30-34, oct. 2015.

OBANDO FLOR, E. P. et al. Avaliação de danos mecânicos em sementes de soja por meio da análise de imagens. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 26, n. 1, p. 68-76, jun. 2004.

OJO, A. A.; OMOLOYE, A. A. Development and life history of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) on cereal crops. **Advances in Agriculture**, [S.l.], set. 2016.

OLOYEDE-KAMIYO, Q. O.; ADETUMBI, J. A. Relationship between seed physical traits and maize weevil (*Sitophilus zeamais*) damage parameters in selected Quality Protein Maize (QPM) varieties. **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v. 73, p. 42-46, sept. 2017.

PASQUINI, S. Validation study on moisture determination in forest tree seed. **Seed Testing International**, Bassersdorf, n. 149, p. 31-36, apr. 2015.

PEREIRA, W. et al. Ajuste de metodologias para a identificação de cultivares de soja quanto à tolerância ao glifosato. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 31, n. 4, p. 133-144, dez. 2009.

R DEVELOPMENTO CORE TEAM. **R**: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Viena, fev. 2017. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 08 de june 2018.

RUNNER, G. A Effect of Rontgen rays on the tobacco, or cigarette beetle and the results of experiments with a new form of Rontgen tube. **Journal of Agricultural Research**, Washington, v. 6, n. 11, p. 383-388, sept. 1916.

SANTANA, D. G.; WIELEWICKI, A. P.; SALOMÃO, A. N. Validation of quality tests for forest seed species. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 22, p. 74-79, feb. 2012.

SILESHI, G.W. A critique of current trends in the statistical analysis of seed germination and viability data. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 22, n. 4, p. 145-159, sept. 2012.

SILVA, A. L. et al. Qualidade fisiológica e controle de sementes de milho tratadas com *Piper nigrum*. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 14, n. 2, p. 131-142, fev. 2012.

SIMAK, M.; BERGSTEN, U.; HENRIKSSON, G. Evaluation of ungerminated seeds at the end germination test by radiografy. **Seed Science and technology**, Bassersdorf, v. 17, n. 2, p. 361-369, apr. 1989.

SIMAK, M.; GUSTAFSSON, A. X-ray fotografy and sensitive in forest tree species. **Hereditas**, Londres, v. 39, p. 458-468, aug. 1953.

SCHMIDT, L. **Guide to handling of tropical and subtropical forest seed**. Humlebaek, Denmark: D. F. Seed Centre, 2000.

TUKEY, J.W. **Exploratory data analysis**. Reading, USA: A. Wesley, 1977.

VILARINHO, M. K. C. et al. Chemical pesticides and vegetal extracts on *Sitophilus zeamais* control in stored corn grains. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 32, p. 288-297, mar./abr. 2016.

VORAPONGSATHORN, T.; TAEJAROENKUL, S.; VIWATWONGKASEM, C. A comparison of type I error and power of Bartlett's test, Levene's test and Cochran's test under violations of assumptions. **Journal Science Technology**, Hat Yai, v. 26, n. 4, p. 537-547, july/aug. 2004.

ZECCHINELLI, R. Validation study to support the germination method for introducing a new species (*Brassica carinata* A. Braun) into the ISTA Rules. **Seed Testing International**, Bassersdorf, n. 153, p. 25-27, apr. 2017.

ZHAO, Y. et al. Outlier detection rules for fault detection in solar photovoltaic arrays. **IEEE**, Long Beach, p. 2913-1920, may 2013.

WAGNER, M. H. et al. Shortening the controlled deterioration (CD) test for Brassica by replacing the germination test with a conductivity measurement. **ISTA method validation reports**, Bassersdorf, p. 88-101, apr. 2016.

**ANEXO A - Laboratórios executores credenciados pelo Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento**

Laboratórios executores	Cidade/Estado
APASEM – Ass. Paranaense dos Produtores de Sementes e Mudas	Ponta Grossa-PR
KWS Melhoramentos e Sementes LTDA	Patos de Minas-MG
Laboratório de Análise de Sementes e Mudas da UFLA	Lavras
Laboratório Central de Sementes e Mudas – CATI	Campinas-SP
LAS Du Pont do Brasil – Divisão Pioneer Sementes	Itumbiara-GO
LASO/LANAGRO – MG	Belo Horizonte-MG
Monsanto do Brasil LTDA (2)*	Uberlândia-MG
Qualiteste Análises Agronômicas LTDA	Uberlândia

Legenda: * Número de laboratórios (2) que participaram do processo de validação de metodologia.

Fonte: Do autor (2018).

ANEXO B - Protocolo geral para validação de metodologia de análise radiográfica para o exame de infestação de *Sitophilus zeamais* em sementes de milho

Organizadores do teste: Laboratório de Análise de Sementes LAS/UFLA
E-mail: fabiano.francads@hotmail.com ou milaene@gmail.com
Endereço: Universidade Federal de Lavras, Departamento de Agricultura/Setor de Sementes-CP3037 – CEP: 37200-000, Lavras MG
Telefone: 35 3829 1055 ou 35 3829 1084

1 Orientações Gerais

- a – Acusar o recebimento das imagens radiográficas.
- b - Deverão ser selecionados 4 analistas (repetições), os quais irão avaliar as radiografias.
- c – Seguir as recomendações propostas neste protocolo. Em caso de dúvidas encaminhar e-mail para fabiano.francads@hotmail.com

2 Procedimento inicial

Recomenda-se aos analistas selecionados familiarizar com as imagens radiográficas (Guia de Identificação em anexo), para treinar e aguçar a visão, no sentido de conseguir perceber e distinguir os diferentes estágios de desenvolvimento do inseto bem como os sinais de infestação ou danos provocados por estes.

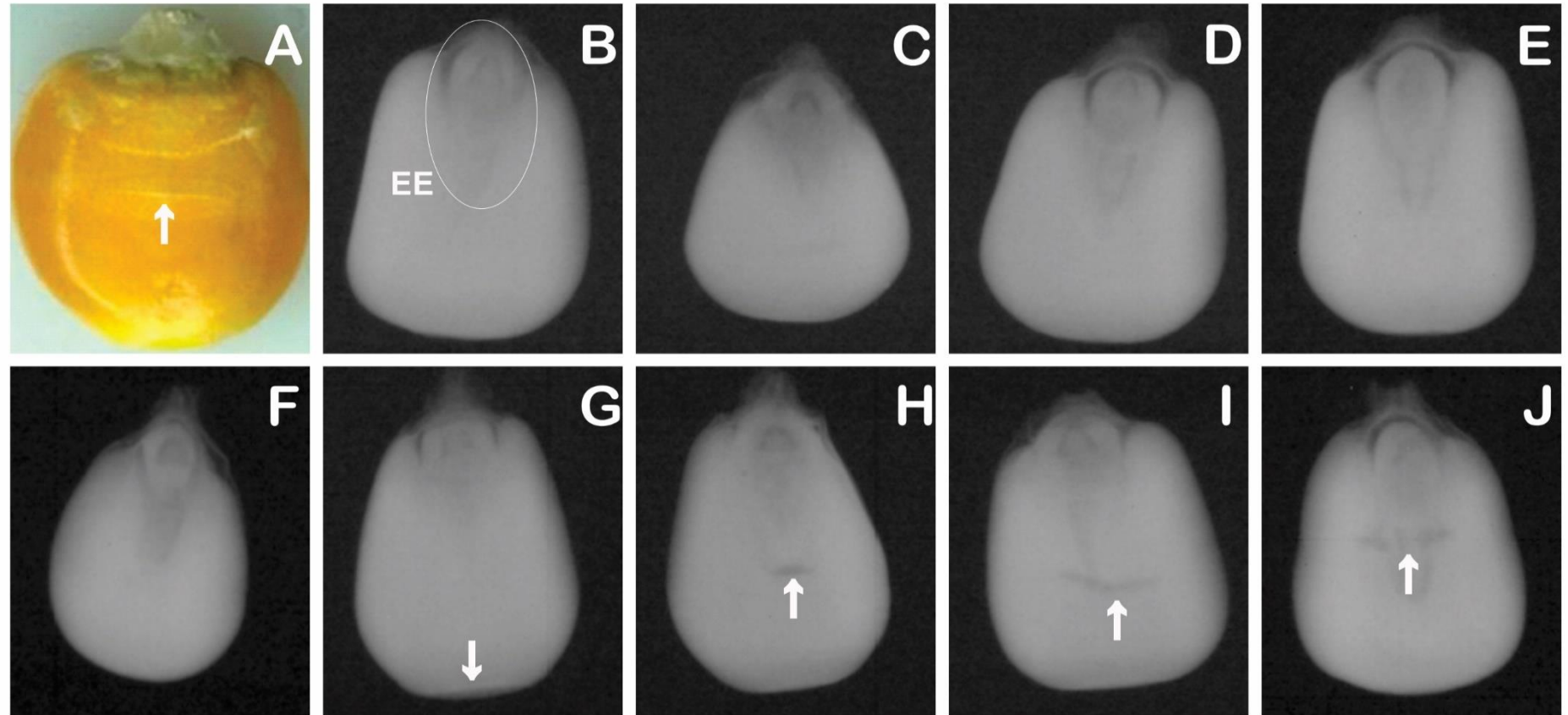
Observação I: Danos internos são caracterizados pela coloração mais escura.

Observação II: Sementes intactas, com maior densidade, são esbranquiçadas.

Observação III: Não há necessidade de identificar o estágio de desenvolvimento do inseto na análise das pranchas radiográficas. Apenas devem ser anotadas nas fichas de avaliação o número de sementes com danos encontrados.

SEMENTE SEM DANOS

Apresenta a região correspondente ao embrião, endosperma e eixo embrionário intactos, sem manchas ou sinais provocados por *Sitophilus zeamais*. Trincas provocadas por dano mecânico podem ser observadas, porém não devem ser consideradas como dano de inseto.

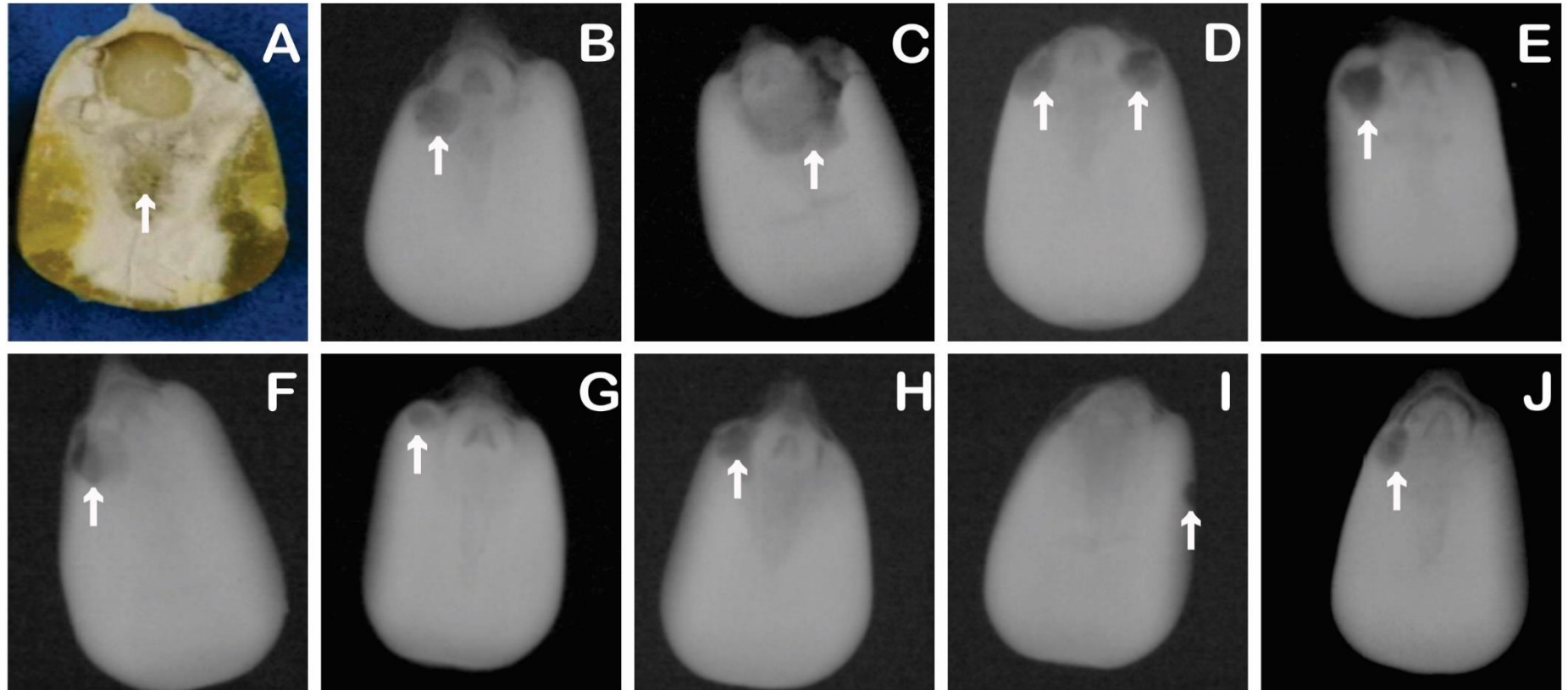


Legenda: **A:** semente com trinca observada ao olho nú; **B-C-D-E-F:** sementes com tecidos do eixo embrionário (EE) íntegros; **G:** reentrância (dente) característica de sementes de milho observada através dos raios-X; **H-I-J:** trincas e espaços vazios em função de dano mecânico.

Fonte: Do autor (2018).

INFESTAÇÃO

Semente com sinais aparentes de danos/injúrias causadas pro *Sitophilus zeamais* - são mais facilmente visualizadas nas radiografias, pois as regiões afetadas apresentam tecidos mais escuros.

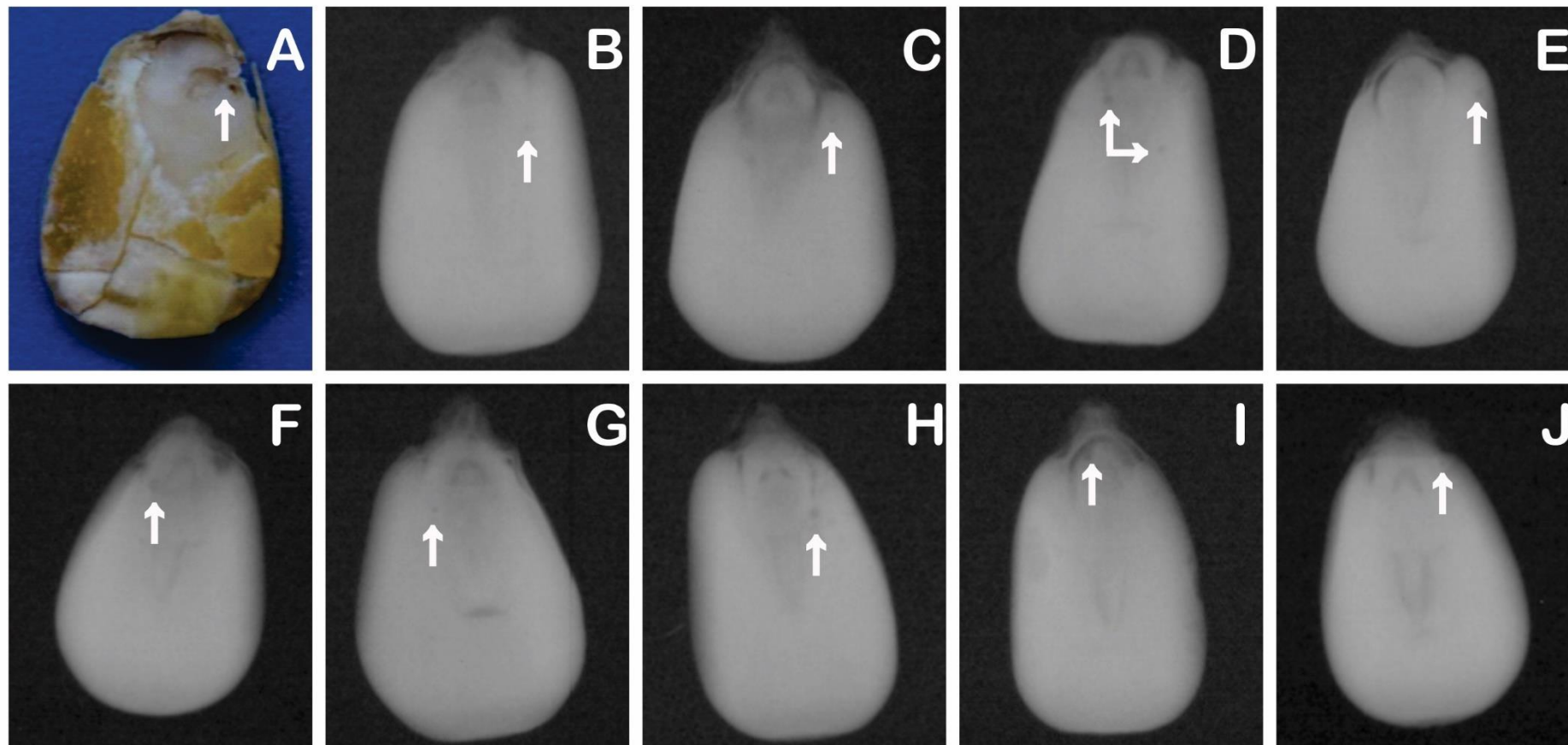


Legenda: **A**: danos do inseto na semente observada após corte com bisturi; **B-C-D-E-F-G-H-I-J**: danos externos (orifícios) e internos provocados por infestação são caracterizados pela coloração mais escura.

Fonte: Do autor (2018).

SINAIS DE OVIPOSIÇÃO

Semente com sinal de oviposição de *Sitophilus zeamais* é representado por pontos circulares, diminutos, visualizados em manchas de tonalidade escura.

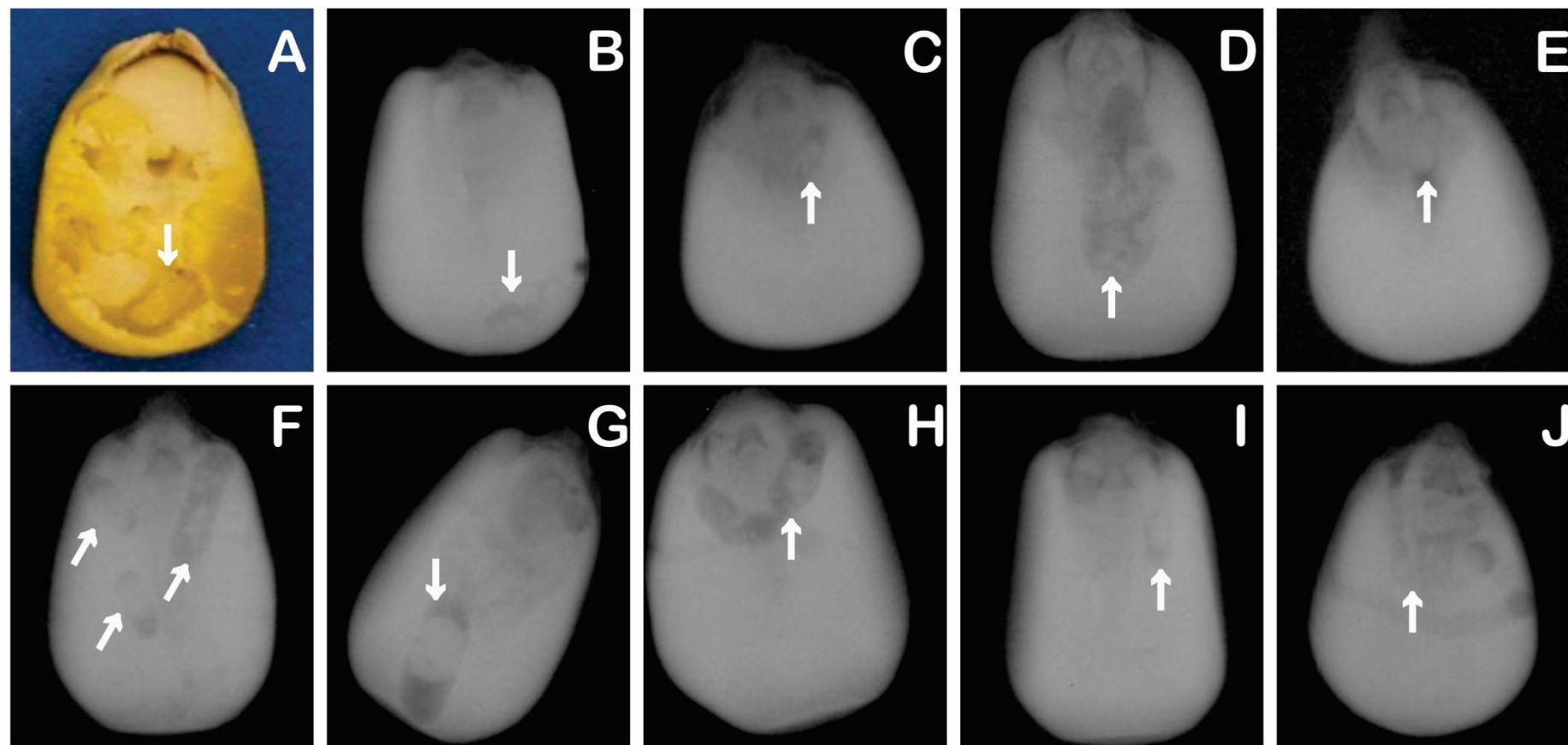


Legenda: **A**: semente com ovos do inseto, apresentam coloração branca; **B-C-D-E-F-G -H-I-J**: pontuações diminutas, bem definidas, mais escuras e quase imperceptíveis, denotam a presença de oviposição do inseto.

Fonte: Do autor (2018).

LARVA

Semente com larva – as larvas de *Sitophilus zeamais* apresentam-se ovaladas, com limites uniformes e geralmente estão delimitadas por uma região das sementes sem tecido e com coloração mais escura. As larvas são mais circulares e uniformes quando comparadas com as pupas.

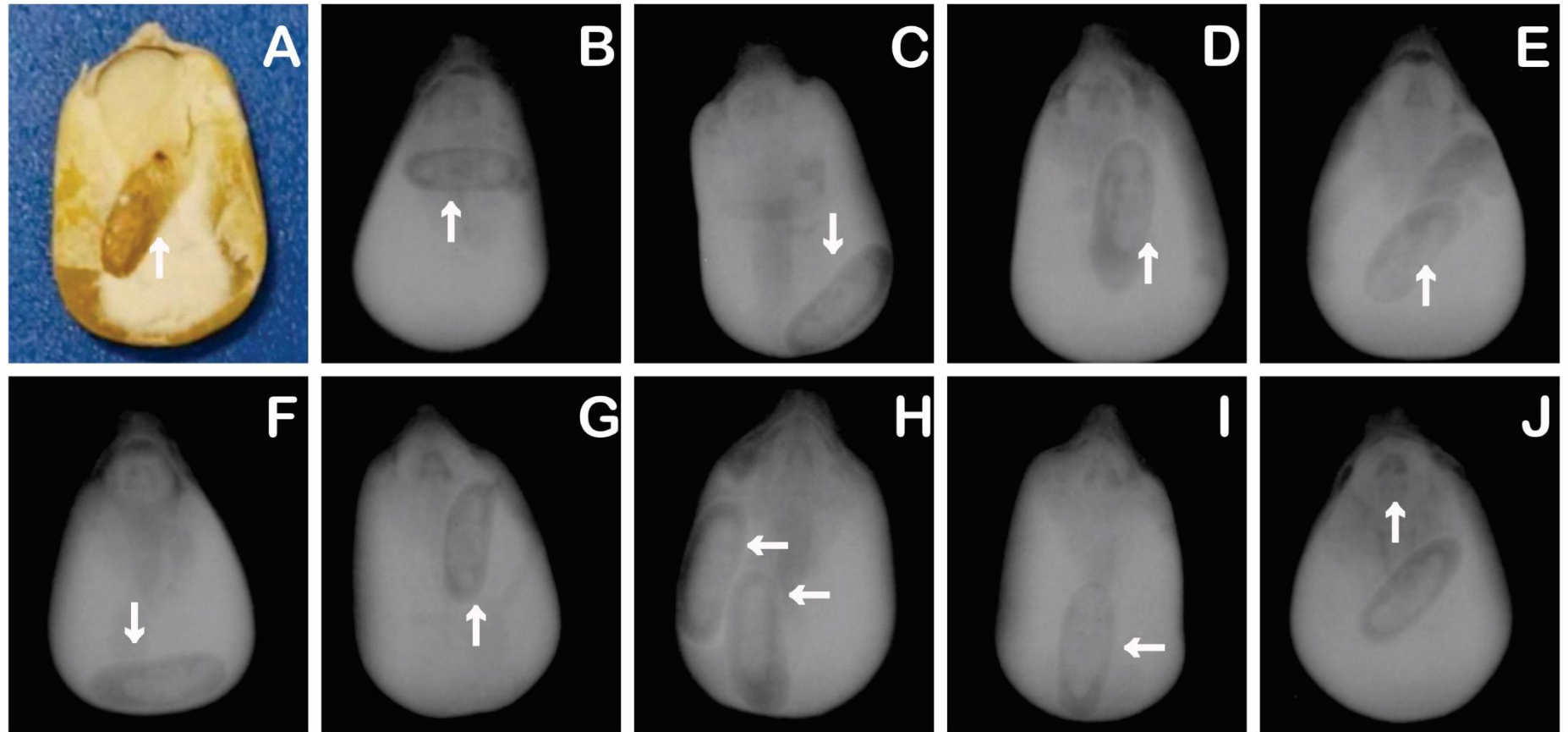


Legenda: **A**: presença da larva no interior da semente; **B-C-D-E-F-G-H-I-J**: identificação das larvas a partir das características do estágio de desenvolvimento e seus danos às sementes.

Fonte: Do autor (2018).

PUPA

Semente com pupa – as pupas de *Sitophilus zeamais* são observadas apresentando o corpo formado. É delimitada por regiões sem tecidos das sementes. Apresentam superfícies mais irregulares devido ao desenvolvimento do corpo do inseto em estágio avançado.

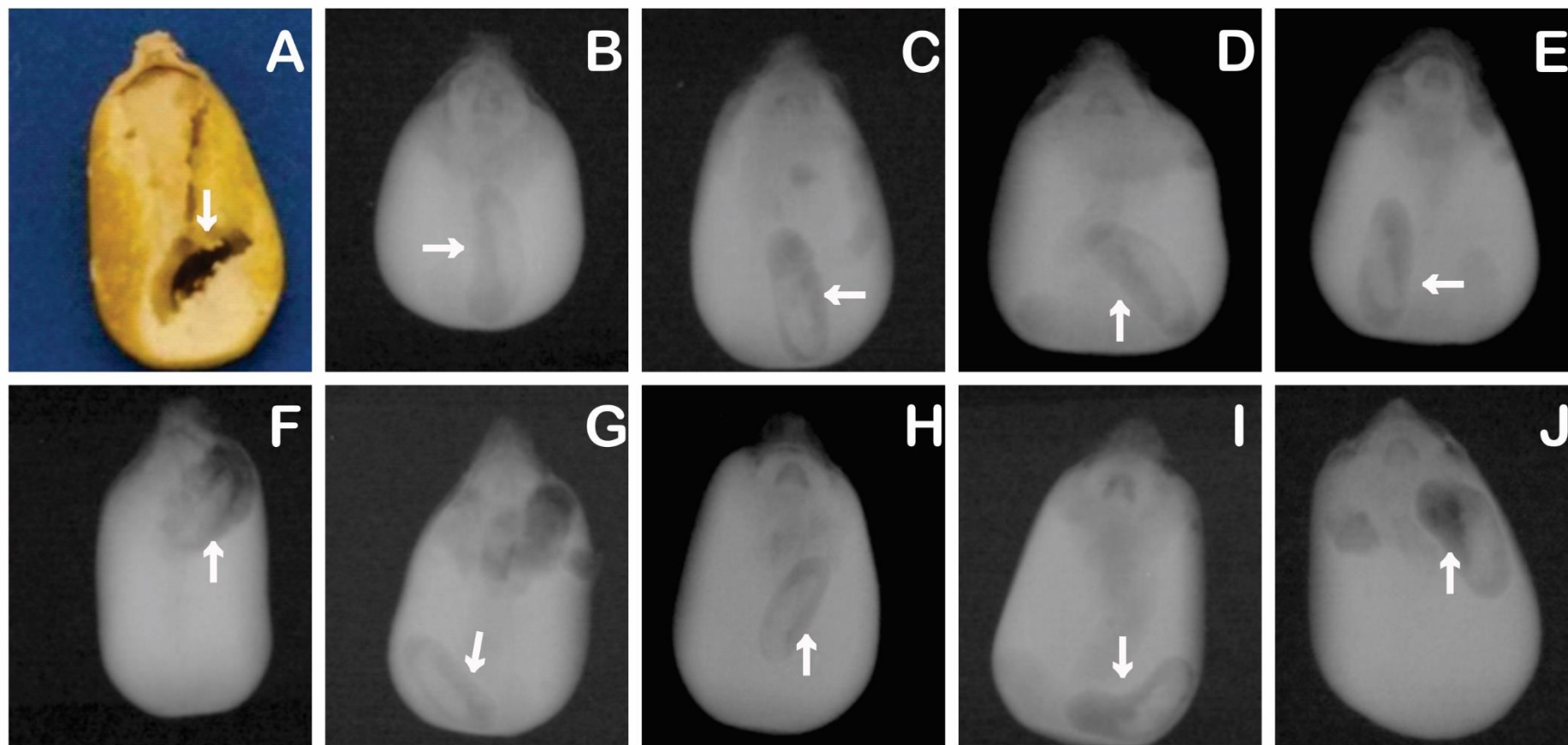


Legenda: **A:** Confirmação de semente de milho com presença da pupa, após corte com bisturi; **B-C-D-E-F-G-H-I-J:** evidências de pupa do gorgulho (*S. zeamais*) internamente às sementes, a partir das radiografias.

Fonte: Do autor (2018).

ADULTO

Semente com inseto adulto de *Sitophilus zeamais* – apresentam semelhanças em relação às pupas, porém são de tamanho reduzido em relação as pupas.



Legenda: **A:** presença do inseto adulto no interior da semente de milho após corte com bisturi; **B-C-D-E-F-G- H-I-J:** inseto adulto geralmente posicionado em direção a saída para o exterior das sementes, ocupa menos espaço em relação a área provocada pelas pupas.

Fonte: Do autor (2018).

3 Metodologia de avaliação das imagens radiográficas

- a) Em função da inexistência de equipamentos de raios X nos laboratórios de análises de sementes e para padronização das análises, estamos encaminhando apenas as radiografias.
- b) Após recebimento, os quatro analistas de cada um dos dez laboratórios colaboradores devem avaliar as imagens radiográficas. Na ficha de avaliação, identificar com “X” o número de sementes com danos causados pelo inseto e registrar no campo “Total” o número total das observações.

4 Comunicação dos resultados e orientações finais

- a) Enviar fichas e questionários de avaliação para os e-mails dos organizadores do teste.
- b) Qualquer inconsistência nos resultados comunicar imediatamente os organizadores do teste.
- c) Em caso de dúvidas ou eventualidades que comprometa a execução do trabalho ou necessite de reanálise, entrar em contato com os organizadores.

ANEXO C - Ficha de avaliação

Teste para validação de método

Espécie: *Zea mays* L.

Escopo: Exame de sementes infestadas

Repetição _____

Código do laboratório: _____

Níveis: () 1 () 2 () 3 () 4

Placas	Presença de danos do inseto																									Total		
	Número de sementes																											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25			
1																												
2																												
3																												
4																												
5																												
6																												
7																												
8																												
Total																												

Observações:

ANEXO D - Questionário de avaliação

Teste para validação de método

Espécie: *Zea mays* L.

Escopo: Exame de sementes de milho infestadas com gorgulho

Repetição _____

Código do laboratório: _____

1. Você possui experiência na identificação de insetos-praga em sementes?
2. Você já trabalhou com alguma metodologia de análise de sementes por imagem? Se sim, qual técnica?
3. Você já realizou análise de sementes por imagem utilizando raios X? Descreva a espécie e a finalidade, caso já tenha realizado.
4. Após análise das radiografias você considera esta técnica viável para utilização em rotina?
5. Qual das metodologias você julga ser mais fácil avaliar: a tradicional com uso de lâminas perfurocortantes, prescrita na RAS como “exame de sementes infestadas” ou a análise radiográfica?
6. Classifique o nível de dificuldade encontrada durante a análise das imagens.
() 0: nenhuma dificuldade,
() 1: baixa dificuldade,
() 2: dificuldade intermediária,
() 3: dificuldade moderada,
() 4: elevada dificuldade,
() 5: dificuldade extrema.
Cite as dificuldades encontradas, se for o caso.
7. O que você sugere para aprimoramento e utilização da técnica de análise radiográfica em rotina?