



CLÁUDIO DAS NEVES VIEIRA BÁRBARA

**ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO E
NÍVEL DE DETERIORAÇÃO DE SEMENTES
DE *Nicotiana tabacum L***

**LAVRAS - MG
2016**

CLÁUDIO DAS NEVES VIEIRA BÁRBARA

**ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO E NÍVEL DE
DETERIORAÇÃO DE SEMENTES DE *Nicotiana tabacum L***

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.

Orientadora

Profª. Dra. Maria Laene Moreira de Carvalho

**LAVRAS – MG
2016**

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

Bárbara, Cláudio das Neves Vieira.

Espectroscopia de infravermelho e nível de deterioração de sementes de *Nicotiana tabacum L.* : Avaliação de sementes de tabaco pelo NIR . / Cláudio das Neves Vieira Bárbara. – Lavras : UFLA, 2016.

55 p. : il.

Dissertação (mestrado acadêmico)–Universidade Federal de Lavras, 2016.

Orientador(a): Maria Laene Moreira de Carvalho.

Bibliografia.

1. Análise não destrutiva. 2. Teste de vigor. 3. Análise espectral. 4. Intensidade de absorbância. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CLÁUDIO DAS NEVES VIEIRA BÁRBARA

**ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO E NÍVEL DE
DETERIORAÇÃO DE SEMENTES DE *Nicotiana tabacum L.***

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 26 de fevereiro de 2016.

Prof. Dr. Renato Mendes Guimarães UFLA
Pesq. Dr. Carlos Eduardo Pucinelli SOUZA CRUZ

Dra. Maria Laene Moreira de Carvalho
Orientadora

**LAVRAS - MG
2016**

DEDICO

**A minha esposa Andréa e filha Luiza que
sempre me encorajaram, incentivaram, ao
apoio dado na hora em que mais
necessitava.
Amo vocês, mulheres da minha vida!**

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me mostrar os caminhos nos momentos de dificuldades.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), pela oportunidade de participar desta unidade de excelência em ensino superior e desenvolver a minha dissertação.

À Maria Laene Moreira de Carvalho, orientadora e amiga, pela confiança depositada a mim, incentivo e conhecimentos transmitidos.

Aos professores do DAG, João Almir Oliveira, Renato Mendes Guimarães e Édila Vilela de Resende Von Pinho, aos pesquisadores Cláudio Egon Faccion, João Roberto Antônio de Mello e Antônio Rodrigues Vieira, pelos ensinamentos e demonstração de profissionalismo e ao professor Alexandre Santos pelo apoio na resolução da estatística e interpretação dos resultados. Aos funcionários do Setor de Sementes Elza, Elenir, Viviana e Antônio Massessini que sempre me apoiaram, e de alguma maneira contribuíram para que tudo desse certo nessa etapa.

Aos acadêmicos que me acompanharam nessa etapa desde ao encorajamento para seleção da pós graduação até a conclusão do mesmo.

Em especial gostaria de agradecer ao casal Joel e Michelle que faz parte da minha vida e família, Ariadne e a Jujuba (Juliana Espindola).

Ao Diego amigo irmão, ranzinza, mas um rapaz bom que sempre me incentivou com suas palavras encorajadoras. Não posso esquecer da galega (Tanismare) e o Adriano que também fizeram parte dessa etapa de vida.

À Souza Cruz S/A pelo fornecimento das sementes para realização da pesquisa. Em especial aos doutores Carlos Eduardo Pucinelli e Humberto Pereira da Silva.

E a todos que, de alguma maneira, contribuíram para o engrandecimento da minha vida pessoal e profissional,

MUITO OBRIGADO!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!

RESUMO

O desenvolvimento de metodologias para avaliação da qualidade de sementes é essencial para programas de controle de qualidade das empresas produtoras, por possibilitar a diferenciação de lotes com diferentes níveis de vigor. O tabaco, *Nicotiana tabacum*, é comumente usado como planta modelo para estudos genéticos ou fisiológicos relacionados principalmente a tolerância a estresses abióticos, no entanto pouco se sabe sobre a possibilidade de utilização de métodos mais precisos para avaliação da qualidade fisiológica de sementes dessa espécie, na produção de lotes comerciais. A espectroscopia de infravermelho próximo (NIR) tem se destacado por ser um método não destrutivo e que tem potencial para substituir ou complementar metodologias convencionais de análises laboratoriais garantindo assim a qualidade das sementes. O objetivo neste trabalho foi verificar a eficiência no uso do NIR em identificar níveis de deterioração em lotes de sementes de tabaco. Foram utilizados 5 lotes de sementes, cultivar CSC100, grupo amarelinho, envelhecidas artificialmente por 0, 24, 48, 72 e 96 horas, avaliados em seu teor de água, germinação, velocidade de germinação, emergência, sanidade e análise espectral por meio do infravermelho próximo. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5 x 5. Na análise dos espectros obtidos, foi utilizado o teste análise discriminante por mínimos quadrados parciais (Partial Least Squares Discriminant Analysis - PLS-DA). A técnica da espectroscopia de infravermelho é eficaz na verificação de níveis de deterioração de lotes de sementes de tabaco. Existe relação entre os níveis de deterioração de lotes de sementes de tabaco envelhecidas artificialmente e avaliados por parâmetros fisiológicos, com a intensidade de absorbância obtida pela análise espectral (NIR) no comprimento de onda de 10000 a 5000 cm^{-1} .

Palavras-chave: Teste rápido. Vigor. Análise não destrutiva.

ABSTRACT

The development of methodologies to evaluate the seed quality is essential for programs of seed quality control, because they are enable the for distinction of seed lots with different vigor levels. The tobacco (*Nicotiana tabacum*) is commonly used like a model plant for genetic or physiological studies related to abiotic stress tolerance, mainly. However, it is known little about the possibility of the use of more precise procedures to evaluate the physiological quality of tobacco seeds in the commercial production. The near infrared spectroscopy (NIR) is standing out as a non-destructive method and has potential to replace or to complement the ordinary methodologies of laboratorial analysis to guarantee quality. The objective of this work was to verify the efficiency of the use of NIR to identify levels of deterioration in different lots of tobacco seeds. Five seed lots of cultivar CSC 100 “amarelinho” group were used and each one was submitted to artificial aging for 0, 24, 48, 72 e 96 hours and were realized the following tests and determinations: seed moisture content, germination and emergence test, health test and NIR spectral analysis. The experiment designed used was the completely randomized design in a factorial scheme 5 x 5. To analyze the spectra obtained was used the Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA). The deterioration and the modification caused by the artificial aging in tobacco seeds influenced differently the results obtained through NIR. There is a relationship between levels of deterioration of tobacco seeds artificially aged evaluated by physiological parameters and the intensity of the absorbance obtained by spectral analysis (NIR) at a wavelength 10000-5000 cm^{-1} .

Keywords: Quick tests. Vigor. Non-destructive analysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Resultados da primeira contagem de germinação (A) e germinação (B) de 5 lotes de tabaco, cultivar CSC100 envelhecidas artificialmente.....	26
Figura 2 Resultados da condutividade elétrica (A) e índice de velocidade de emergência de plântulas (B) em lotes de sementes de tabaco cultivar CSC 100, envelhecidas artificialmente.	28
Figura 3 Resultados do estande inicial (A) e da emergência de plântulas (B) em lotes de sementes de tabaco, cultivar CSC 100, envelhecidas artificialmente.....	29
Figura 4 Resultados da incidência de <i>Alternaria</i> spp. (A) e <i>Epicoccum</i> (B) em lotes de sementes de tabaco, cultivar CSC 100, envelhecidas artificialmente.....	34
Figura 5 Resultados da incidência de <i>Fusarium</i> sp. em lotes de sementes de tabaco, cultivar CSC 100, envelhecidas artificialmente.....	34
Figura 6 Padrão espectral de sementes de tabaco dos lotes: L1,, L2, L3, L4 e L5– envelhecidos artificialmente, de 0 a 96 horas, em comprimento de onda entre 10000 a 4000 cm^{-1}	35
Figura 7 Análise de componentes principais para semente de tabaco cultivar CSC 100, lote 1, envelhecidas artificialmente.....	36
Figura 8 Análise de componentes principais para semente de tabaco cultivar CSC 100, lote 2, envelhecidas artificialmente.....	37
Figura 9 Análise de componentes principais para semente de tabaco, cultivar CSC 100, lote 3, envelhecidas artificialmente.....	38
Figura 10 Análise de componentes principais para semente de tabaco do grupo amarelinho, cultivar CSC 100, lote 4, envelhecidas artificialmente.....	38

Figura 11	Análise de componentes principais para semente de tabaco cultivar CSC 100, lote 5, envelhecidas artificialmente.	39
Figura 12	Seleção das variáveis importantes na projeção (Variable importance in projection - VIP) em dez medidas de Absorbância do Lote L1 de sementes de tabaco, cultivar CSC100, envelhecidas artificialmente.	43
Figura 13	Seleção das variáveis importantes na projeção (Variable importance in projection - VIP) em dez medidas de Absorbância do Lote L2 de sementes de tabaco, cultivar CSC100, envelhecidas artificialmente.	44
Figura 14	Seleção das variáveis importantes na projeção (Variable importance in projection - VIP) em dez medidas de Absorbância do Lote L3 de sementes de tabaco, cultivar CSC100, envelhecidas artificialmente.	44
Figura 15	Seleção das variáveis importantes na projeção (Variable importance in projection - VIP) em dez medidas de Absorbância do Lote L4 de sementes de tabaco, cultivar CSC100, envelhecidas artificialmente.	45
Figura 16	Seleção das variáveis importantes na projeção (Variable importance in projection - VIP) em dez medidas de Absorbância do Lote 5 de sementes de tabaco, cultivar CSC100, envelhecidas artificialmente.	45
Figura 17	Intensidade de absorvância obtida pela análise espectral de sementes de tabaco dos lotes L1, L2, L3, L4 e L5, nos diferentes tempos de envelhecimento, no comprimento de onda de 10000 a 4000 cm^{-1}	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Valores médios do teor de água em cinco lotes de sementes de tabaco, cultivar CSC 100, envelhecidas artificialmente.	24
Tabela 2	Valores médios, primeira contagem de germinação, germinação, lotes de sementes de tabaco envelhecidas artificialmente.	25
Tabela 3	Resultados médios da condutividade elétrica, índice de velocidade de emergência, estande inicial e emergência em lotes de sementes de tabaco cultivar CSC 100, envelhecidas artificialmente.	30
Tabela 4	Valores médios da incidência de <i>Alternaria</i> spp., <i>Epicoccum</i> spp., <i>Fusarium</i> spp. em lotes de sementes de tabaco envelhecidas artificialmente.	33
Tabela 5	Resultados obtidos da espectroscopia de infravermelho de 5 lotes de sementes de tabaco envelhecidas artificialmente por 0, 24, 48, 72 e 96, para taxa de erro (%), PCA – análise de componentes principais, Acuracidade (%) e VIP – Variáveis de importância de projeção (%).	40

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	12
2.	REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1.	Importância do tabaco	13
2.2.	Qualidade das sementes oleaginosas e alterações químicas durante o processo de deterioração.	14
2.3.	Espectroscopia de Infravermelho	17
3.	MATERIAL E MÉTODOS	19
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
5.	CONCLUSÕES	49
	REFERÊNCIAS	50

1. INTRODUÇÃO

A cultura do tabaco é utilizada como planta modelo para estudos funcionais, e por apresentar facilidade de manuseio dos protocolos de transformação, além de ter uma grande quantidade de sementes por cápsula. É também uma cultura expressiva, servindo de fonte de renda para pequenos agricultores na região sul do Brasil. O impacto da produção de Fumo ajudou a levar o país à posição atual de segundo maior produtor de fumo do mundo e exportador de folhas e de sementes.

No sistema de produção do tabaco é importante levar em consideração a qualidade das sementes, uma vez que o melhoramento é voltado para produção de massa verde em detrimento da produção de frutos de qualidade. A maturação dos frutos ocorre de maneira desuniforme e a semente apresenta diferentes tipos de dormência, havendo assim a necessidade de um rígido controle de qualidade, para que a produção de mudas não seja afetada.

Há uma grande necessidade das empresas produtoras de sementes em obter resultados cada vez mais rápidos e confiáveis acerca da qualidade de lotes, algumas metodologias de análise podem ser adaptadas para utilização na indústria de sementes. Dentre as metodologias atuais existentes, a espectroscopia de infravermelho próximo (NIR) pode ser um método rápido, para detecção de níveis de qualidade em de lotes de sementes e pode ser uma ferramenta complementar às metodologias convencionais de análises, além de ser não destrutivo, garantindo a qualidade e as especificidades necessárias para a espécie a ser analisada.

O objetivo com a presente pesquisa foi verificar a eficiência no uso da técnica do NIR para identificar níveis de deterioração em sementes de tabaco (*Nicotiana tabacum L.*) envelhecidas artificialmente.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Importância do tabaco

O tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) é uma planta modelo utilizada para ensaios de transformação genética, É uma cultura importante economicamente, principalmente para pequenos produtores, por absorver mão de obra, durante o processo de colheita

Essa cultura é considerada anual, pertencente à família *Solanaceae*, com hábito de crescimento determinado e ciclo de 4 a 5 meses. De fácil cruzamento, produz milhares de sementes por planta e possui grande diversidade fenotípica (ZHANG et al., 2011).

O cultivo de tabaco no Brasil tem como base as pequenas propriedades e diversificação agrícola. Os fumicultores possuem em média 16,7 hectares e de acordo com dados organizados pela Associação dos Fumicultores do Brasil – AFUBRA (2012), a renda do tabaco corresponde a 56% do orçamento do agricultor. A evolução tecnológica da indústria brasileira do tabaco é um dos fatores responsáveis pelo crescimento do setor, no mercado internacional, o qual fez com que o Brasil figure, desde a década de 1990, como maior exportador mundial do produto, além de ser referência na industrialização do tabaco.

A propagação da cultura do tabaco é realizada por meio do plantio de mudas, obtidas pela sementeira em substrato comercial. Para que se obtenha um estande adequado com posterior destino das mudas para plantio, é necessária a utilização de sementes de alta qualidade que propiciem maior vigor das mudas produzidas.

2.2. Qualidade das sementes oleaginosas e alterações químicas durante o processo de deterioração.

A semente de tabaco se caracteriza por ser muito pequena, com aproximadamente 15.625 sementes por grama (BRASIL, 2009) e apresenta muitas vezes maturação desuniforme e dormência, interferindo na qualidade fisiológica dos lotes produzidos.

O teste mais utilizado para avaliar a qualidade das sementes de tabaco é o de germinação. Objetiva – se com esse teste determinar a porcentagem de plântulas normais da espécie em análise. A semente germinada dá origem á plântulas que demonstram pelo grau de desenvolvimento de suas estruturas essenciais, capacidade para produzir uma planta normal sob condições favoráveis (BRASIL, 2009). Entretanto, os resultados obtidos nesse teste nem sempre refletem o desempenho das sementes em condições de semeadura. Nesse caso, a adição de testes de vigor para avaliação do potencial fisiológico tem sido útil para identificar as diferenças consistentes no desempenho de lotes de sementes sob condições adversas, complementando informações fornecidas pelo teste de germinação (CARVALHO; NOVENBRE, 2011).

O envelhecimento de sementes é um processo degenerativo contínuo, que envolve uma sequência de eventos bioquímicos e fisiológicos, levando a uma progressiva queda na qualidade de sementes e culminando na perda da viabilidade (ELLIS, 1991). As mudanças que ocorrem durante esse processo estão diretamente relacionadas e ocasionando a redução da velocidade e da uniformidade de emergência, refletindo no desenvolvimento das plantas no campo (BINGHAM; HARRIS; MC DONALD, 1994).

Para que os testes utilizados na avaliação da qualidade de sementes possam refletir a real situação dos de lotes avaliados, é de fundamental importância que as metodologias sejam de fácil execução e rápidas, além de

apresentarem baixo custo e alta correlação com os testes utilizados em análise de rotina no laboratório (FERNANDES; SADER; CARVALHO, 1987).

Na maturidade fisiológica, quando a semente atinge seu nível máximo de qualidade, a deterioração está em seu nível mínimo. A partir da maturidade, o nível de qualidade da semente começa a decrescer em consequência de diversos fatores, tais como as variações de temperatura durante a maturação, flutuações das condições de umidade do ambiente, deficiências nutricionais das plantas, pragas e doenças, além de técnicas inadequadas de colheita, secagem, beneficiamento, armazenamento e transporte (CARVALHO; FRANÇA NETO; KRZYZANOWSKI, 2006).

A temperatura e a umidade relativa do ar são fatores fundamentais que podem interferir na qualidade, visto que o alto teor de água na semente, aliado a elevadas temperaturas aceleram o metabolismo, levando à redução da qualidade. Desta forma o envelhecimento artificial pela exposição das sementes a altas umidades e temperaturas aceleram o processo de deterioração.

De acordo com Delouche e Baskin (1973), a deterioração é contínua e irreversível, não sendo possível recuperar o nível de atividades vitais. Embora exista um grande número de pesquisas relacionadas aos mecanismos que levam à deterioração de sementes, estes ainda não estão totalmente elucidados, pois a redução na qualidade fisiológica das sementes está associada às alterações bioquímicas que conduzem ao comprometimento de suas atividades metabólicas (FREITAS et al., 2006).

O conhecimento da composição química e de suas reservas em sementes é fundamental para estabelecer diretrizes para compreender suas reações após ao envelhecimento artificial (MARCO FILHO, 2015).

As semente, de tabaco tem um alto teor óleo em torno de 40%. A composição dos óleos da tabaco são ácidos graxos 65,0 a 74,3% para o ácido linoleico, principal componente (LAGO et al., 1978).

A peroxidação de lipídios, é a causa subsequente de danos na membrana (CHANG; SUNG, 1998) é ocasionada pelo envelhecimento das sementes. Essas alterações levam a lixiviação de substâncias essenciais, reduzindo à germinação (GOEL; SHEORAN, 2003).

Além da perda da integridade das membranas durante o processo de deterioração, verifica-se também uma redução da produção de ATP causada pela fermentação alcoólica; diminuição na síntese de proteínas e ácidos nucleicos e degeneração cromossômica (BEWLEY; BLACK, 1994).

Os radicais livres são grupos de átomos com um elétron não pareado, altamente reativo e instável, sendo os mais importantes a hidroxila (OH^\cdot), superóxido (O_2^\cdot) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Uma vez presente na célula, estes podem iniciar reações oxidativas em cadeia, altamente prejudiciais, especialmente com ácidos graxos polinsaturados, originando hidroperóxidos de lipídios (COOLBEAR, 1995). Uma vez desestruturado o sistema de membranas, os lipídios estruturais presentes reagem com o oxigênio molecular, resultando na formação de radicais livres e peróxidos de ácidos graxos com relativa instabilidade (CARVALHO; VON PINHO, 1999).

O envelhecimento da semente é acompanhado pelo aumento da taxa de respiração aeróbica e, a depender das condições em que foram submetidas, pode ocorrer modificações no metabolismo, modificando a rota aeróbica para a anaeróbica, produzindo assim a formação do acetaldeído e etanol.

Etanol e acetaldeído são tóxicos para as sementes embebidas, que terão que converter essas moléculas para o ácido acético menos tóxico. Ambas as reações de desintoxicação exigem a redução da coenzima NAD^+ a NADH (KODDE, 2011). Alterações químicas durante o processo de deterioração são passíveis de serem detectadas em análises espectrais de sementes pela alteração de grupos funcionais das moléculas.

2.3. Espectroscopia de Infravermelho

A espectroscopia de infravermelho próximo (NIR) tem se destacado por ser um método não destrutivo, e que tem potencial complementar metodologias convencionais de análises laboratoriais, assumindo grande importância em variadas áreas. Sua área de aplicação envolve o estudo de polímeros, identificação de compostos orgânicos e inorgânicos, análise de misturas complexas como gasolina e poluentes atmosféricos, controle de qualidade de produtos diversos, estudos de semicondutores, transportes de moléculas bioativas em tecidos vivos, mecanismos de catálise etc. (BARBOSA, 2007). Essa técnica se constitui em uma abordagem física não destrutiva, rápida, reproduzível e de baixo custo (ROBERTS; WORKMAN JÚNIOR; REEVES, 2004).

A região do infravermelho próximo tem recebido bastante atenção, em particular com relações das análises quantitativas e multivariadas.

O NIR – infravermelho próximo é um tipo de vibração espectroscópica, que emprega energia do fóton ($h\nu$) na faixa de $7,8 \times 10^{-6}$ – $2,5 \times 10^{-6}$, correspondente a uma unidade usual em intervalo de comprimento de onda de $0,78$ – $2,5 \mu\text{m}$ ou 14.290 a 4.000 cm^{-1} .

A faixa de energia gerada na espectroscopia de infravermelho próximo é maior do que a necessária para promover nas moléculas seus mais baixos estados vibracionais excitados, por meio de uma transição vibracional fundamental e menores do que os valores normais necessários para a excitação de elétrons em moléculas (SUNDARAM; KANDALA; BUTTS, 2009; ZHU et al., 2011). O resultado dessa vibração é a geração de espectros de absorção, correspondente às frequências características dos grupos funcionais das moléculas, dentro de determinadas seções (SCARF et al., 2006), proporcionando

assim uma visão ampla da "assinatura" de qualquer amostra (NEWHEY; ROBSON; CROZIER, 2008).

Existem evidências do uso dessa técnica na avaliação da qualidade de sementes em relação a determinação da umidade (HART; NORRIS; GOLUMBIC, 1962), na seleção de genótipos de aveia, correlacionar o conteúdo de proteínas e lipídios com as características físicas dos grãos (LEMONS; SILVA, 2008) e seleção de genótipos de girassol com maior conteúdo de óleo (GRUNVALD et al., 2009). Além dessas características, também é possível determinar o grau de umidade em amostras de café cru aplicando um modelo matemático de PLS (MORGANO, 2008), e a detecção de fungos em sementes de espinafre (OLESEN; DUIJN; BOELT, 2014).

No caso do tabaco, o NIR é utilizada para determinar nitrosaminas específicas (N- nitrosaminas) presente nas folhas em diferentes grupos de cultivares (MA et al., 2012), além da detecção de proteína, glicose, frutose e alcalóides (WANG et al., 2014).

Segundo Souza e Poppi (2012), analisando a sequência a distinção entre óleos vegetais de canola, azeite e soja, por meio de espectros de FT-IR e a PCA, pode-se observar a separação entre os materiais, com escores da PC1 amostras de óleo de canola e outro formado pelas amostras de óleo de soja e azeite na parte positiva da PC2. No caso das sementes de tabaco, não existem informações sobre as variações na qualidade fisiológica e a análise espectral. Portanto, há a necessidade de verificar a relação entre a qualidade fisiológica das sementes e os resultados obtidos pela espectroscopia de infravermelho.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram conduzidos nos Laboratórios Central de Sementes do Departamento de Agricultura, e de Patologia de Sementes da Universidade Federal de Lavras, MG entre novembro de 2013 e outubro de 2014.

Para desenvolvimento da pesquisa foram utilizados cinco lotes de sementes de tabaco cultivar CSC 100, grupo amarelinho (L1, L2, L3, L4, L5, codificados como lotes 1 a 5) produzidos na safra 2012/2013 e cedidos pela empresa Souza Cruz S/A.

Inicialmente, as sementes de cada lote foram homogeneizadas e divididas pelo método manual de divisões sucessivas em 5 porções, sendo uma delas não envelhecida e as demais submetidas ao envelhecimento artificial para simular diferentes níveis de deterioração.

Para o envelhecimento artificial, as sementes foram dispostas em esferas de tela de nylon sobrepostas à tela metálica, acoplada a caixas plásticas tipo *gerbox*, contendo ao fundo 40 mL de água. Os gerboxes foram levados à câmaras de germinação tipo BOD, regulada à temperatura de 42 °C pelos períodos de 0, 24, 48, 72 e 96 horas e posteriormente mantidas em condições ambientais de dessecadores até atingirem teor de água que continham antes de serem submetidas ao envelhecimento. Para caracterização e distinção dos lotes foram realizados determinação de teor de água, testes de germinação, emergência, condutividade elétrica de massa, sanidade, bem como espectroscopia do infravermelho próximo.

O teor de água foi determinado pelo método da estufa 130 ± 3 °C durante 1 hora, utilizando-se quatro repetições de 0,1 grama de semente por tratamento. Os resultados foram expressos em porcentagem, com base no peso úmido (BRASIL, 2009).

A germinação foi conduzida com 200 sementes (4 repetições de 50 sementes), distribuídas em caixas plásticas tipo gerbox (11,0 x 11,0 x 3,5cm) sobre duas folhas de papel mata – borrão, umedecido com água na proporção de 2,5 vezes o peso do papel seco, em temperatura alternada de (20-30°C) e fotoperíodo de 8 horas. As avaliações foram realizadas ao sétimo dia (primeira contagem) e ao décimo sexto dia após a semeadura, computando-se as plântulas normais germinadas, seguindo os critérios estabelecidos pelas Regras para Análise de Sementes. Os resultados foram expressos em porcentagem (BRASIL, 2009).

As sementes remanescentes do teste de germinação foram imersas em solução de tetrazólio a 1% por 24 horas a 40 °C, para determinação da viabilidade das mesmas.

Emergência – foram semeadas 200 sementes por tratamento (distribuídas em bandejas de isopor com 200 células individuais), com medida externa sendo, comprimento 670 mm, largura 370 mm por altura 53 mm e volume de 12 cm³, contendo substrato comercial multiplant hortaliças®. As bandejas foram mantidas no sistema “Float” em casa de vegetação, com uma lâmina de água de 3 cm, na temperatura 30 °C. A avaliação foi realizada aos 15 dias (estande inicial) e aos 21 dias após a semeadura, por meio da contagem de plântulas com altura igual ou superior a 0,5 cm. Os resultados foram expressos em porcentagem de plântulas emergidas em cada tratamento. Paralelamente ao teste de emergência foi calculado o índice de velocidade de emergência, computando-se diariamente o número de plântulas emergidas, utilizando-se da fórmula proposta por Maguire (1962).

Condutividade elétrica de massa - o teste foi realizado com 4 repetições de 0,02g de sementes, previamente pesadas e dispostas em recipientes com capacidade para 4 mL de água deionizada e mantidas em BOD, à temperatura constante de 25 °C por 12 horas. Após o condicionamento, a condutividade

elétrica da solução foi medida por meio do condutivímetro da marca Digimed, modelo CD-21, com resultados expressos em $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$.

A qualidade sanitária das sementes foi avaliada pelo método do papel de filtro “Blotter Test” Para tanto, 200 sementes foram distribuídas em 4 repetições de 50 e semeadas em placa de Petri com 15 cm de diâmetro, contendo três folhas de papel de filtro previamente umedecidas com água destilada + 2,4D e meio de cultura (Ágar) com 2,4D, ambos esterilizados. Após a semeadura as placas foram colocadas em câmara de crescimento à temperatura de 20 ± 2 °C. Decorridos 7 dias, as sementes foram avaliadas individualmente em microscópio estereoscópico para identificação e contagem dos patógenos presentes nas amostras. Os resultados foram expressos em número absoluto de ocorrência dos patógenos para cada lote.

Para análise dos dados obtidos na qualidade de sementes, o delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5 X 5, sendo 5 lotes L1, L2, L3, L4, L5 e 5 tempos de envelhecimento (0; 24; 48; 72 e 96 horas). Os resultados foram submetidos a análise de variância. Os dados foram submetidos à análise de regressão para os dados quantitativos e comparação de médias para os dados qualitativos (Scott-Knott) em nível de 5% de significância, por meio do software estatístico SISVAR®.

Na avaliação da espectroscopia de infravermelho, para cada lote e tempo de envelhecimento foram utilizadas 35 amostras contendo 0,02 g de sementes, sendo essas dispostas em vials. Os espectros foram gerados por meio do detector FT-IR, acoplado ao equipamento Tensor 27 da Bruker®. O software utilizado para a leitura espectral foi o OPUs Spectroscopy Version 6 do mesmo fabricante. Inicialmente foi realizado o background, utilizando-se o ouro como padrão, e a transformada de Fourier, com resolução 8 cm^{-1} , tempo de varredura 256 e fundo de tempo de varredura 128, na amplitude 3189, posição de 61035.

O espectrofotômetro coletou 256 leituras para cada medida de absorvância, que produziram um espectro médio constituindo o banco de dados de leituras para cada amostra. A absorvância infravermelha próxima com o comprimento de onda entre 4000 – 10000 cm^{-1} foi emitida por um espectrômetro Bruker. As reflectâncias de infravermelho próximo foram gravadas como absorvância ou $\log(1/\text{reflectância})$ em intervalos de $3,85\text{cm}^{-1}$, totalizado 1558 medidas de absorvância ao longo do espectro.

Os espectros obtidos passaram por uma fase de pré-processamento, constituído por correção da linha base (baseline correction) por padrão normal de variáveis (SNV - Standard Normal Variate) e remoção da tendência linear por mínimos quadrados (Detrend) (CANAZA-CAYO; ALOMAR; QUISPE, 2013).

Visando à detecção de um padrão espectral para sementes de tabaco, foi empregada a análise discriminante por mínimos quadrados parciais (Partial Least Squares Discriminant Analysis - PLS-DA), que é um caso especial de regressão por mínimos quadrados parciais (Partial least squares regression - PLSR) para variáveis categóricas e não quantitativas (PÉREZ-ENCISO; TENENHAUS, 2003). Para tanto, as 1558 medidas de absorvância de cada amostra submetida a regressão PLS-DA, onde o efeito da colinearidade dos dados do modelo pode ser reduzido com maior eficiência, além da maximização da correlação entre as medidas de absorvância preditoras e a variável resposta (MEVIK; CEDERKVIST, 2004). A regressão por mínimos quadrados parciais é descrita pela equação:

$$X = TP' + E$$

$$Y = UQ' + F$$

onde: X é a matriz preditora; Y é a matriz resposta; $T=X$ -scores; $U=Y$ -scores; $P=X$ -sobre ajustes; $Q=Y$ - sobre ajustes; $E=X$ -resíduos; e $F=Y$ -resíduos (GELADI; KOWALSKI, 1986; YE et al., 2008).

Para minimizar erros da regressão PLS-DA ajustada foi selecionado o número de componentes principais de acordo com a taxa de erro de classificação (Classification error rate), prevista pelo processo de validação cruzada por leave-one-out (MEVIK; WEHRENS, 2007). A escolha das variáveis preditoras a serem incluídas na regressão PLS-DA foi realizada com o cálculo das variáveis importantes na projeção (Variable importance in projection - VIP) (TENENHAUS, 1998), que determina a contribuição de cada medida de absorbância no conjunto de dados e permite identificar quais são as medidas mais importantes para a previsão dentro de cada lote. O ajuste e calibração da regressão PLS-DA foi realizado com um subconjunto de 35 amostras, vezes cinco tempos e a predição 7 amostras vezes 5 de cada tempo utilizados como dados de validação cruzada. Cada espectro classificado-acertadamente e o total 1558 com o número de ondas entre 4000 a 10000 cm^{-1} .

As reflectâncias de infravermelho próximo foram gravadas como absorbância ou $\log(1/\text{reflectância})$ em intervalos de $3,85\text{cm}^{-1}$, totalizado 1558 medidas de absorbância ao longo do espectro. Para cada lote e tempo, o espectrofotômetro coletou 256 leituras de scans em absorbância, que produziram um espectro médio e constituiu-se no banco de dados de leituras para cada um dos cinco lotes com seu respectivo nível de qualidade totalizando 875 espectros mensurados.

As análises dos dados foram realizadas com o emprego do programa R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2005) e com o uso dos pacotes mixOmics (DEJEAN; GONZALEZ; CAO, 2013) e pracma (BORCHERS, 2014).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O envelhecimento artificial promoveu acréscimos no teor de água das sementes, variando de 5,5 a 19,6%, entre os lotes avaliados, como pode ser observado na tabela 1.

Tabela 1 Valores médios do teor de água em cinco lotes de sementes de tabaco, cultivar CSC 100, envelhecidas artificialmente

Lotes	Teor de água (%)				
	0h	24h	48h	72h	96h
L1	5,5 b	10,0 c	11,9 d	13,2 c	16,6 c
L2	6,5 b	12,8 b	17,5 a	18,3 a	19,6 a
L3	8,0 a	12,9 b	15,8 b	16,0 b	16,9 c
L4	7,0 a	15,3 a	14,4 c	14,2 c	18,2 b
L5	5,5 b	12,2 b	13,5 c	15,6 b	16,5 c
CV (%)	6,65				

As médias, seguidas pela mesma letra minúscula na pertencem ao mesmo agrupamento pelo teste de Scott-Knott no nível de 5% de significância.

Apesar de ocorrerem diferenças no teor de água dos lotes, houve um aumento gradual da umidade com o período de envelhecimento, sendo esse incremento mais acentuado nas primeiras 24 horas. A partir desse período, o teor de água continua aumentando, porém em menor proporção. Esse fato também foi observado em sementes de alface e almeirão, com maiores valores da umidade nas primeiras 48 horas e acréscimo gradual no período em que foram submetidas ao envelhecimento artificial em água (SANTOS et al., 2011).

Na avaliação da qualidade de sementes de tabaco, foi observado o efeito da interação entre lotes e tempo de envelhecimento para todas as características avaliadas. Portanto, o envelhecimento artificial proporcionou alterações na qualidade das sementes, o que possibilitou variações no nível de qualidade dos lotes.

O estabelecimento inicial de plântulas de cada lote (primeira contagem) foi afetado pelo envelhecimento artificial (Tabela 2, Figura 1A). A qualidade dos lotes de sementes de tabaco foi reduzida de maneira diferenciada, sendo que os lotes L1 e L2 reduziram a qualidade na medida em que as sementes foram envelhecidas a partir de 24 horas e para o L4 a redução foi observada somente a partir de 96 horas de envelhecimento. Além disso, foi possível observar até 4 níveis de vigor entre os lotes quando as sementes foram envelhecidas por 72 horas e 3 níveis quando envelhecidas por 0 e 24 horas (Tabela 2).

Tabela 2 Valores médios, primeira contagem de germinação, germinação, lotes de sementes de tabaco envelhecidas artificialmente

Lotes	Primeira contagem (%)				
	0h	24h	48h	72h	96h
L1	84 a	82 a	69 a	68 a	52 a
L2	56 b	38 b	36 b	21 d	22 b
L3	59 b	41 c	42 b	51 b	50 a
L4	60 b	57 c	63 a	57 b	33 b
L5	34 c	42 c	40 b	42 c	29 b
CV (%)	16,24				
Lotes	Germinação (%)				
	0h	24h	48h	72h	96h
L1	92 a	94 a	95 a	94 a	85 a
L2	82 b	78 b	67c	65 c	57 b
L3	82 b	77 b	75 b	75 b	83 a
L4	76 b	79 b	72 c	79 b	82 a
L5	62 c	71 b	78 b	79 b	59 b
CV (%)	6,87				

As médias, seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de agrupamento de Scott-Knott no nível de 5% de probabilidade.

Pode-se observar pelo resultado da primeira contagem que houve maior variação da qualidade de sementes de tabaco quando comparado ao teste de germinação. Nesse caso, a primeira contagem de germinação permitiu diferenciar a qualidade dos lotes durante o processo de envelhecimento das sementes.

O percentual de germinação somente foi afetado negativamente após 48 horas de envelhecimento, no entanto na o efeito na velocidade de germinação já se nota entre os cinco lotes nas primeiras 24 horas.

No caso da germinação, o comportamento das sementes durante o envelhecimento também difere entre os lotes, sendo o lote L1 com qualidade superior. Para esse lote, foi possível observar reduções da germinação apenas com 96 horas de envelhecimento. No caso do lote 2, a qualidade das sementes foi reduzida a partir de 48 horas e para o lote 5 foi possível verificar uma tendência de aumento da germinação entre 24 e 72 horas, com redução em 96 horas. Já para os lotes 3 e 4 não foram observadas alterações na germinação durante o envelhecimento das sementes (Tabela 2, Figura 1B). Também foi possível verificar diferenças entre níveis de qualidade dos lotes quando avaliados pelo teste de germinação, sendo que o tempo de 0, 48 e 72 horas separaram os lotes em três níveis e dos demais períodos em dois níveis (Tabela 2)

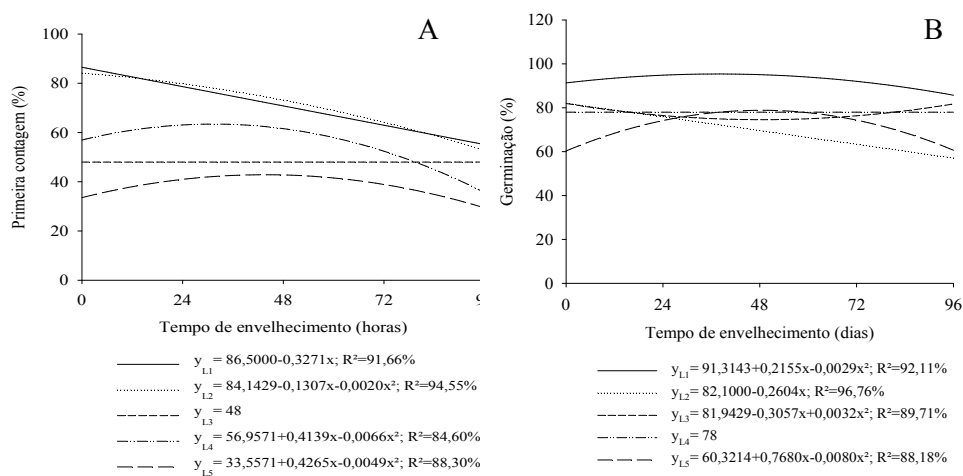


Figura 1 Resultados da primeira contagem de germinação (A) e germinação (B) de 5 lotes de tabaco, cultivar CSC100 envelhecidas artificialmente

Os diferentes níveis de qualidade entre os lotes de sementes de tabaco podem ser visualizados quando se avalia a Primeira contagem. No caso da germinação, essas diferenças já não são tão pronunciadas. Bhering et al. (2006), em trabalho com sementes de pimenta, verificaram que o envelhecimento acelerado a 38°C ou 42°C, por 96 horas, fornece informações semelhantes aos resultados encontrados nesse trabalho. Para Torres e Negreiros (2008), o teste de envelhecimento acelerado, utilizando-se a temperatura de 41 °C, durante 48 horas, mostra-se como indicativo na separação dos lotes de sementes de berinjela cv. Embu, em diferentes níveis de vigor.

Durante o envelhecimento de sementes de tabaco, a permeabilidade das membranas foi alterada como evidenciado pelo teste de condutividade elétrica (Tabela 3), permitindo assim classificar os lotes em quatro níveis de vigor nos períodos de 24, 48 e 72 horas. Dentre eles, o lote L2 possui maior vigor devido a menor quantidade de íons liberados durante o teste. Quando se verifica o comportamento de cada lote durante o envelhecimento é possível verificar que para os lotes L1, L3 e L5 não houve efeito da deterioração durante o período avaliado. Já para os lotes L2 e L4, o envelhecimento das sementes alterou a condutividade elétrica das mesmas, principalmente no tempo de 96 horas (Tabela 3, Figura 2A).

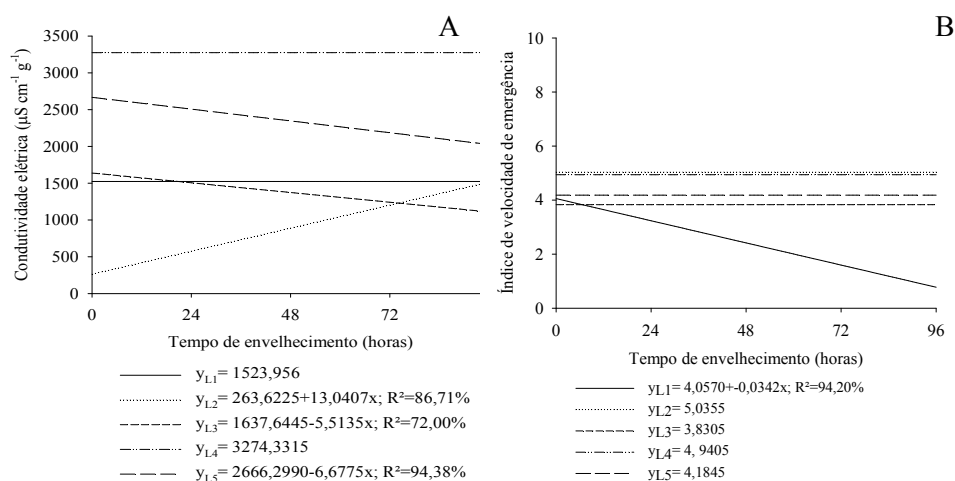


Figura 2 Resultados da condutividade elétrica (A) e índice de velocidade de emergência de plântulas (B) em lotes de sementes de tabaco cultivar CSC 100, envelhecidas artificialmente

A velocidade de emergência das plântulas foi menos afetada durante o envelhecimento das sementes (Tabela 3). Nota-se que apenas no período de 96 horas foi possível verificar maiores diferenças entre os lotes, destacando o lote L1 como o mais vigoroso, seguido do L5. Os lotes L2, L3 e L4 não diferiram quanto ao vigor no mesmo período (Tabela 3). Durante o envelhecimento artificial foram observadas diferenças apenas para o lote L1, com um decréscimo da velocidade de emergência durante o envelhecimento (Figura 2B).

Para o estabelecimento inicial de plântulas são observadas maiores diferenças entre os lotes quando submetidas a 96 horas de envelhecimento artificial. Após esse período, o lote L1 apresentou maior vigor, seguido dos lotes L5, L2, L3 e L4 (Tabela 3). Ao longo do envelhecimento, o lote L1 aumentou a velocidade de emergência de plântulas. No caso dos lotes L2 e L5 o envelhecimento não influenciou na velocidade de emergência; já para os lotes L3 e L4 houve alterações no desempenho das plântulas emergidas, com reduções

da qualidade a partir de 72 horas para o primeiro e 48 horas para o segundo (Tabela 3, Figura 3A).

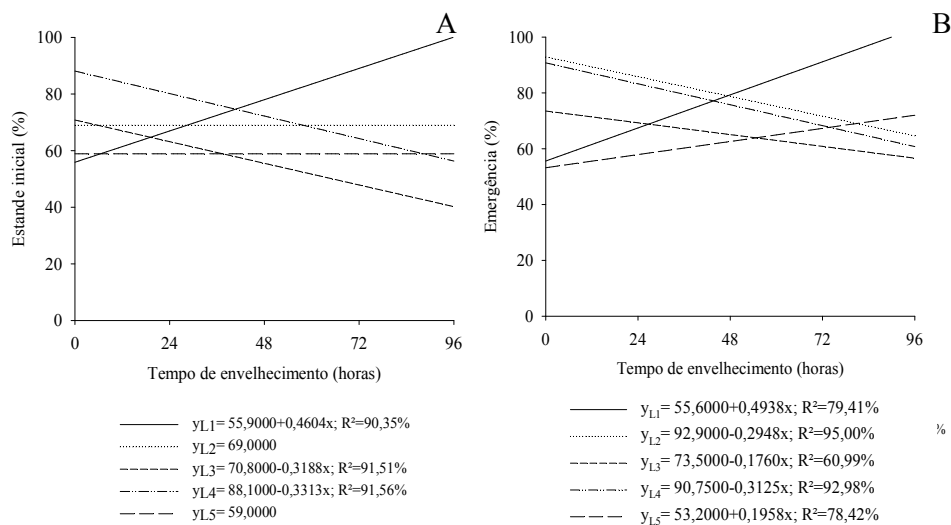


Figura 3 Resultados do estande inicial (A) e da emergência de plântulas (B) em lotes de sementes de tabaco, cultivar CSC 100, envelhecidas artificialmente

Diferenças entre os lotes de tabaco também foram encontradas quando se avaliou a emergência de plântulas. Nesse caso, os resultados obtidos corroboram com o do estande inicial, com os melhores resultados para o lote L1, seguido por L5, L2, L3 e L4, em 96 horas de envelhecimento artificial (Tabela 3). Contudo, o desempenho de cada lote no processo de deterioração das sementes não foi o mesmo observado para o referido teste, pois ocorreram acréscimos na porcentagem de plântulas emergidas dos lotes L1 e L5 e decréscimos para os lotes L2 e L4 a partir de 72 horas e L3 a partir de 96 horas (Tabela 3, Figura 3B).

Tabela 3 Resultados médios da condutividade elétrica, índice de velocidade de emergência, estande inicial e emergência em lotes de sementes de tabaco cultivar CSC 100, envelhecidas artificialmente

Lotes	Condutividade elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$)				
	0h	24h	48h	72h	96h
L1	1720,09 b	1366,29 c	1252,90 c	1793,25 c	1487,25 a
L2	388,25 c	620,25 d	656,00 d	1040,25 d	1743,14 b
L3	1629,48 b	1587,71 c	1187,22 c	1397,70 d	1062,87 a
L4	2710,83 a	3600,75 a	2941,96 a	2859,11 a	4259,00 a
L5	2650,83 a	2540,46 b	2280,82 b	2274,07 b	1982,73 b
CV (%)	20,35				
Lotes	IVE				
	0h	24h	48h	72h	96h
L1	3,79 b	4,92 a	6,05 a	6,78 a	6,96 a
L2	5,26 a	5,41 a	5,43 a	5,11 b	3,98 b
L3	4,60 b	3,49 b	4,65 a	3,95 b	2,47 c
L4	6,35 a	5,24 a	4,57 a	3,82 b	4,73 b
L5	3,94 b	3,82 b	3,65 a	4,49 b	5,03 b
CV (%)	24,03				
Lotes	Estande inicial (%)				
	0h	24h	48h	72h	96h
L1	50 b	72 a	82 a	93 a	94 a
L2	73 a	73 a	73 a	73 b	55 c
L3	67 a	67 a	58 a	50 b	37 c
L4	86 a	85 a	68 a	68 b	55 c
L5	49 b	56 a	58 a	63 b	70 b
CV (%)	20,80				
Lotes	Emergência (%)				
	0h	24h	48h	72h	96h
L1	44 c	78 a	85 a	96 a	95 a
L2	92 a	85 a	82 a	75 b	62 c
L3	74 b	65 a	67 b	69 b	51 c
L4	87 a	87 a	77 a	71 b	58 c
L5	53 c	57 b	68 b	62 b	74 b
CV (%)	9,87				

As médias, seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de agrupamento de Scott-Knott no nível de 5% de probabilidade.

O vigor de sementes reflete características que determinam o potencial do seu desempenho sob condições diferentes de ambiente (BHERING et al., 2006). No caso das sementes de tabaco, o comportamento de cada lote durante a

exposição das sementes ao estresse por elevada temperatura e umidade relativa foi alterado, principalmente por períodos de exposição mais elevados. Nesse caso, o lote L1 pode ser considerado o mais vigoroso, e as alterações verificadas durante o envelhecimento foram reduzidas, quando comparado aos demais lotes.

Sementes submetidas a períodos prolongados de envelhecimento artificial perdem a sua viabilidade, fato esse verificado na presente pesquisa. Os períodos de 72 e 96 horas de envelhecimento proporcionaram reduções no vigor das sementes de tabaco. Na medida em que se aumenta o período de exposição das sementes à temperaturas elevadas e alta umidade relativa, o envelhecimento torna-se prejudicial às sementes (BARBOSA; COSTA; SÁ, 2011), reduzindo assim a germinação, a velocidade e o estabelecimento inicial de plântulas no campo, assim como a emergência.

Em outras solanáceas, períodos superiores a 72 horas de envelhecimento foram eficientes em separar os lotes de sementes em diferentes níveis de qualidade, como em cubiu (PEREIRA; MARTINS FILHO, 2010). Para alguns lotes dessa espécie, períodos prolongados de envelhecimento proporcionaram redução na viabilidade, fato esse verificado na presente pesquisa, estratificando os lotes em três níveis de vigor.

Durante o processo de deterioração das sementes, a perda da integridade de membranas é o principal fator no processo de envelhecimento. No entanto, em função da espécie e das condições em que são expostas podem ocorrer alterações no vigor das mesmas (BARBOSA; COSTA; SÁ, 2011). No caso do tabaco, pode ser verificado que na medida em que as sementes foram expostas às condições de elevada temperatura por longos períodos, cada lote se comportou de maneira diferenciada, evidenciando que o processo de deterioração também é variável entre lotes para uma mesma espécie. Quanto a condutividade elétrica, foi evidente a estratificação dos lotes durante o tempo em que as sementes foram

ficaram expostas, confirmando assim que ocorreram alterações no sistema de membranas durante o envelhecimento.

Para algumas espécies, a exposição a temperaturas elevadas durante período determinado pode afetar positivamente o desempenho de lotes de sementes. No caso de sementes de tabaco sabe-se que a sua maturação ocorre de maneira desuniforme e que pode ocorrer o processo de dormência. Na presente pesquisa, o processo de envelhecimento para o lote L1 favoreceu a velocidade de emergência, o desenvolvimento inicial de plântulas no campo e a emergência, podendo inferir que esse lote pode apresentar dormência e que a temperatura de 42 °C até 96 horas favorece a germinação.

O envelhecimento artificial em sementes de tabaco alterou a incidência dos microrganismos presentes. Foi verificada maior porcentagem dos fungos *Alternaria* spp., *Epicoccum* spp. e *Fusarium* sp. (Tabela 4, Figuras 4 e 5).

A incidência de *Alternaria* spp foi variável entre lote. Na medida em que as sementes ficaram expostas a condições de elevada temperatura e umidade relativa, ocorreram acréscimos desse microrganismo, principalmente nos tempos de 72 e 96 horas (Tabela 4). Durante o tempo de exposição, os lotes L1, L2 e L5 aumentaram a incidência de *Alternaria* spp. Para os lotes L3 e L4 não foram observados os efeitos da deterioração (Tabela 4, Figura 4A).

No caso do *Epicoccum* spp., sua incidência foi verificada antes do envelhecimento. Durante o tempo de exposição das sementes, pode-se verificar a presença do fungo no lote L3. Para os demais lotes, na medida em que aumentava o período de exposição das sementes, a incidência do microrganismo foi reduzida (Tabela 4, Figura 4B).

Apesar da menor incidência verificada para *Fusarium* sp., o microrganismo permaneceu nas sementes durante o envelhecimento artificial, principalmente nos lotes L4 e L5 (Tabela 4, Figura 5).

Tabela 4 Valores médios da incidência de *Alternaria* spp., *Epicoccum* spp., *Fusarium* spp. em lotes de sementes de tabaco envelhecidas artificialmente

<i>Alternaria</i> spp. (%)					
Lotes	0h	24h	48h	72h	96h
L1	59 b	43 b	40 b	75 a	89 a
L2	28 c	62 a	62 a	78 a	78 b
L3	72 a	52 a	76 a	59 b	87 b
L4	57 b	41 b	67 a	66 b	70 b
L5	38 c	60 a	52 b	70 a	77 b
CV (%)	14,45				
<i>Epicoccum</i> spp. (%)					
Lotes	0h	24h	48h	72h	96h
L1	15 b	0 c	0 b	0 b	0 b
L2	5 c	0 c	0 b	0 b	0 b
L3	16 b	58 a	33 a	22 a	22 a
L4	28 a	12 b	5 b	0 b	0 b
L5	22 a	0 c	5 b	2 b	0 b
CV (%)	57,71				
<i>Fusarium</i> spp. (%)					
Lotes	0h	24h	48h	72h	96h
L1	15 b	29 a	0 b	0 b	3 b
L2	5 c	0 b	3 b	3 b	0 b
L3	16 b	5 b	8 b	6 b	7 b
L4	28 a	2 b	3 b	1 b	1 b
L5	22 a	10 b	20 a	23 a	18 a
CV (%)	63,91				

As médias, seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de agrupamento de Scott-Knott no nível de 5% de probabilidade.

Segundo Segato e Gabaldi (2012), pode-se observar que nas sementes de tabaco armazenadas os fungos são encontrados em ordem decrescente pertencente do gênero *Alternaria* spp, *Fusarium* spp e *Epicoccum* spp. Porém, esses patógenos podem propiciar o aparecimento de anormalidades em plântulas que geralmente são indicativos de uma baixa qualidade, fato esse observado na presente pesquisa.

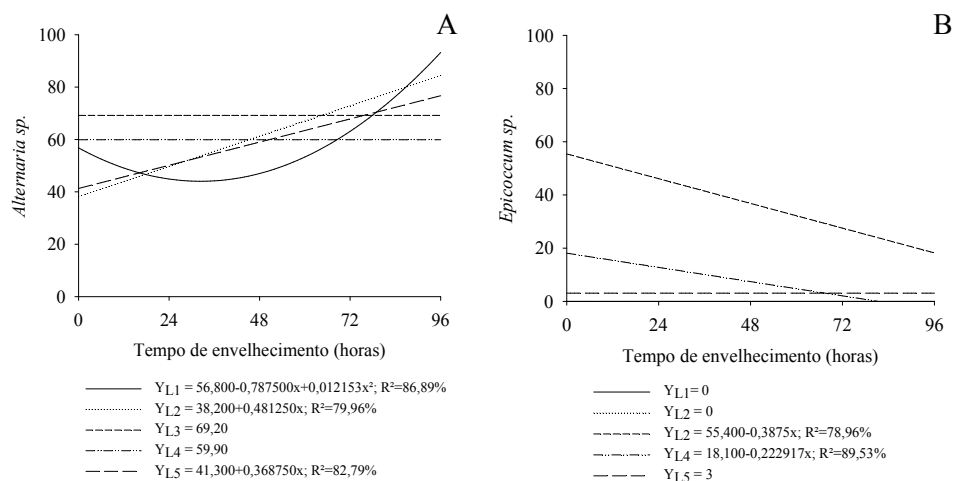


Figura 4 Resultados da incidência de *Alternaria* spp. (A) e *Epicoccum* (B) em lotes de sementes de tabaco, cultivar CSC 100, envelhecidas artificialmente

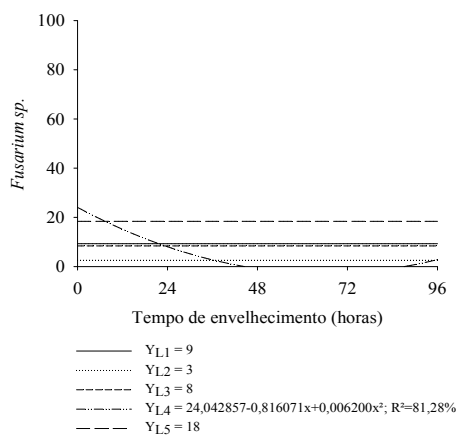


Figura 5 Resultados da incidência de *Fusarium* sp. em lotes de sementes de tabaco, cultivar CSC 100, envelhecidas artificialmente

Com relação a análise da espectroscopia de infravermelho próximo, os espectros obtidos para cada tempo dentro de cada lote, após a fase de pré-processamento, demonstraram um padrão espectral semelhante em relação aos

picos de absorbância ou banda espectral (Figura 6A, B, C, D e E), similaridade esta esperada para indivíduos de uma mesma espécie. Segundo Ma et al. (2012) é difícil de analisar os picos nos espectros em função da complexidade das amostras e a natureza da espectroscopia por apresentarem o mesmo padrão, sendo necessário assim de utilizar outras ferramentas estatísticas para analisar os resultados obtidos.

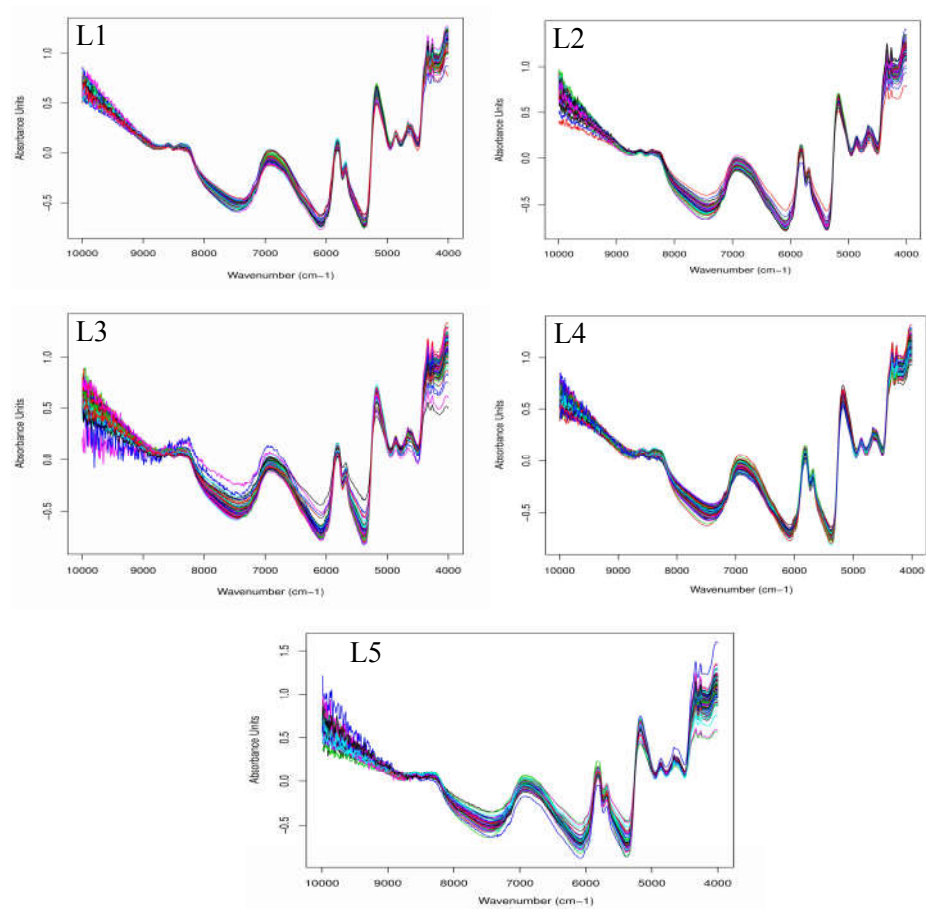


Figura 6 Padrão espectral de sementes de tabaco dos lotes: L1,, L2, L3, L4 e L5– envelhecidos artificialmente, de 0 a 96 horas, em comprimento de onda entre 10000 a 4000 cm^{-1}

A análise visual dos gráficos do padrão espectral possibilitou a distinção de espectros principalmente no comprimento de onda de 9000 a 5000 cm^{-1} . Desta forma foi feito um desdobramento por lote para análise individual.

Na determinação dos componentes principais, observa-se que houve diferenças dentro de cada lote durante o envelhecimento de sementes.

Sob o ponto de vista formal, fazer uma análise de componentes principais é realizar uma mudança da base do espaço vetorial do conjunto de dados. Cada objeto (no nosso caso cada elemento) que era então representado num espaço N-dimensional definido pelas N variáveis, passa a ser representado por N componentes principais (LYRA et al., 2010).

Nas análises de componentes principais (PCA), para o lote L1, evidenciou-se uma maior variação com agrupamentos distintos nos tempos de envelhecimento 0, 24, 48 e 72 horas. Para 96 horas não foi possível observar o mesmo comportamento (Figura 7).

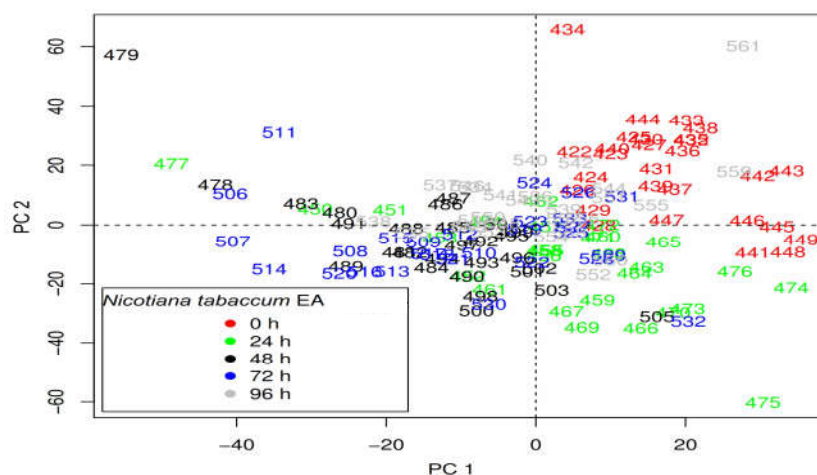


Figura 7 Análise de componentes principais para semente de tabaco cultivar CSC 100, lote 1, envelhecidas artificialmente

Na análise de componentes principais (PCA), para o lote 2 pode-se observar que foi possível obter diferenças entre os tempos de 0, 24, 72 e 96 horas, já que as amostras para os referidos tempos se agruparam em diferentes vetores no PC1 e PC2 onde é possível observar diferenças entre as sementes envelhecidas e não envelhecidas, sendo essas afastadas do ponto central e em diferentes vetores (Figura 8). O tempo de 48 horas se manteve mais na região central, levando a entender que o tempo 48 de envelhecimento não difere no PCA.

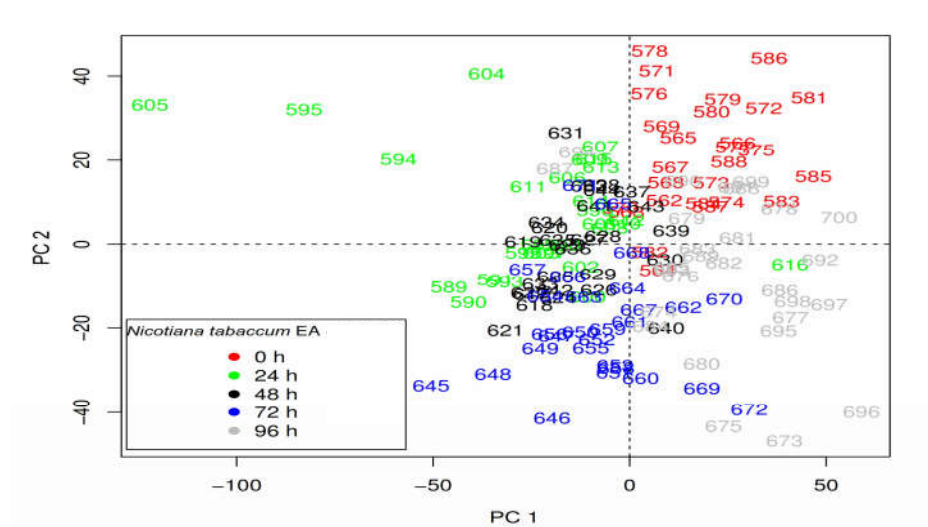


Figura 8 Análise de componentes principais para semente de tabaco cultivar CSC 100, lote 2, envelhecidas artificialmente

Na análise de componentes principais (PCA), para o lote L3 pode-se observar que não foi possível obter diferenças entre os tempos de 24, 48 e 72 horas, já que as amostras para os referidos tempos ficaram agrupadas em um mesmo local e próximo do ponto central (Figura 9). Nos tempos de 0 hora e 96 horas, para algumas amostras foi possível observar diferenças entre as sementes envelhecidas e não envelhecidas, sendo essas afastadas do ponto central e em diferentes vetores (Figura 9).

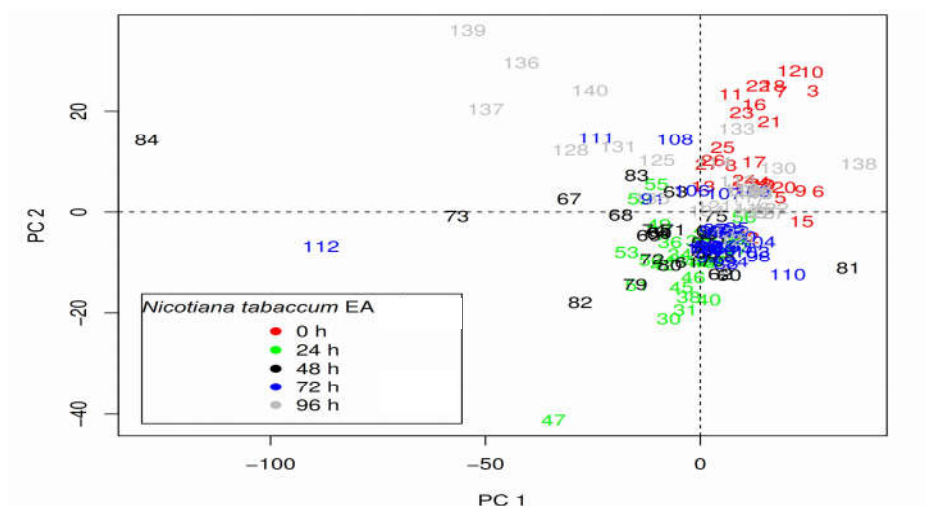


Figura 9 Análise de componentes principais para semente de tabaco, cultivar CSC 100, lote 3, envelhecidas artificialmente

As análises de componentes principais (PCA) para o lote 4, evidenciou uma maior variação com agrupamentos distintos nos tempos de envelhecimento 0, 24, 72 e 96 horas. Quanto ao tempo de 48 horas, o mesmo se agrupou mais no eixo central no PC1 e PC2 (Figura 10).

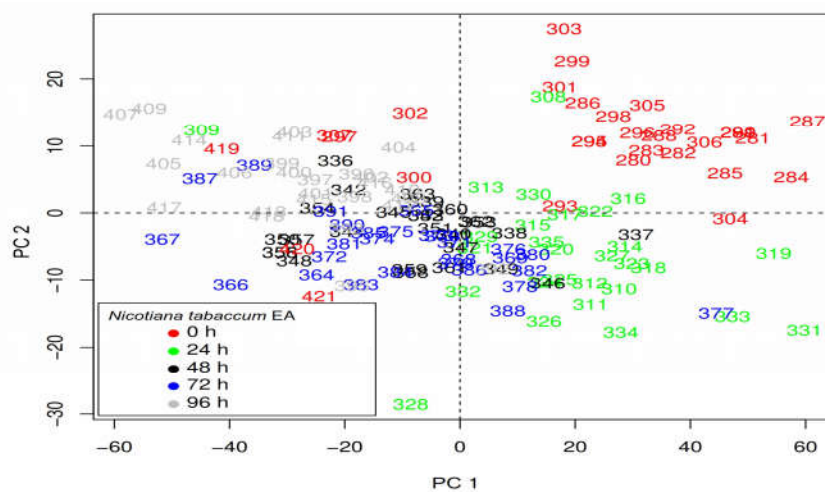


Figura 10 Análise de componentes principais para semente de tabaco do grupo amarelinho, cultivar CSC 100, lote 4, envelhecidas artificialmente

Apesar de se observar uma acuracidade de 97% dos resultados, para o lote L5 não foi possível observar diferenças entre as amostras que foram submetidas ao envelhecimento artificial (Figura 11), pois todos os tratamentos ficaram agrupados em um mesmo ponto.

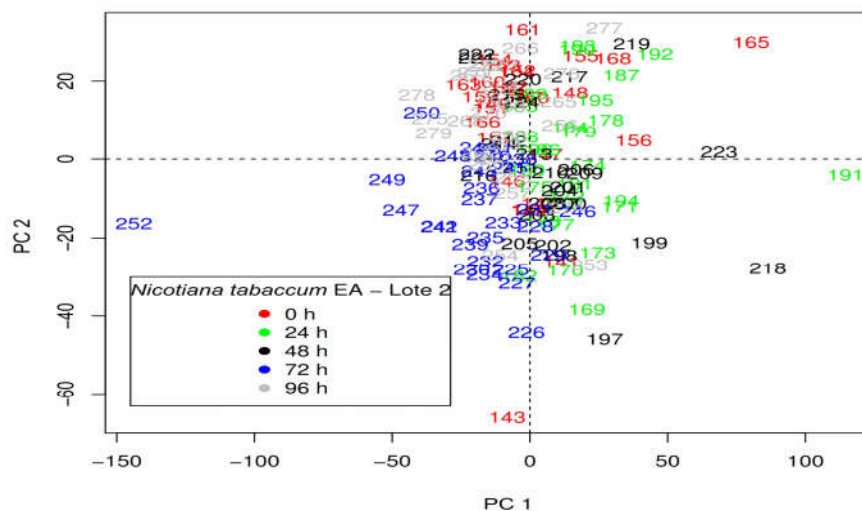


Figura 11 Análise de componentes principais para semente de tabaco cultivar CSC 100, lote 5, envelhecidas artificialmente

É interessante observar que os grupamentos de componentes principais estão relacionados com o comportamento fisiológico dos lotes. Em lotes mais deteriorados ocorre maior agrupamento dos pontos enquanto que em lotes mais vigorosos, existe uma separação mais nítida, com agrupamentos distintos nos tempos de envelhecimento 0, 24, 48 e 72 horas. A medida que ocorre maior deterioração, como no caso das sementes envelhecidas por 96 horas, para o lote 1 e demais lotes deteriorados com menor tempo de envelhecimento, não existe separação em função do nível de deterioração.

Os espectros obtidos no infravermelho podem apresentar problemas de deformação da linha de base, variações no caminho óptico, ruídos, entre outros.

Dessa forma, os pré-processamentos são aplicados para melhorar a eficiência dos modelos multivariados.

Após os modelos pré processados dos espectros e retirados as linhas tendenciosas, os modelos passaram por uma seleção de variáveis havendo uma separação das derivações de sua Assinatura (SSS) dos Lotes L1, L2, L3, L4 e L5, envelhecidos artificialmente em 0, 24, 48, 72 e 96 horas.

Em um estudo de PCA – análises de componentes principais, Durgante et al. (2013) e Krajsek, Zega e Kreft (2008), utilizando a mesma quantidade de amostras da presente pesquisa, foi possível separar diferentes espécies arbóreas, com acuracidade de 99,4%, outros autores como Wang et al. (2014) observaram que analisando folha de tabaco seca para obtenção algoritmo de PCA – componentes principais, aplicado para a análise de NIR extraindo as informações de composto único, obteve dois grupos de dados de PC1 e PC2, enquanto que o coeficiente de correlação entre os dois grupos de dados foi 0,97.

No caso do presente estudo principalmente para o lote L4, L1 e L2 foi possível separar as sementes envelhecidas artificialmente com uma acuracidade de 99,99%. Os demais lotes, L3 e L5, obtiveram uma acurácia de 94,29 % a 97,14% (Tabela 5).

Tabela 5 Resultados obtidos da espectroscopia de infravermelho de 5 lotes de sementes de tabaco envelhecidas artificialmente por 0, 24, 48, 72 e 96, para taxa de erro (%), PCA – análise de componentes principais, Acuracidade (%) e VIP – Variáveis de importância de projeção (%)

Lote	Taxa Erro (%)	Nº PCA	VIP (%)	Acuracidade (%)
L1	0,675	10	3.20	99,99
L2	0,567	8	2.30	99,99
L3	0,713	11	2.29	94,29
L4	0,695	12	2.34	99,99
L5	0,695	9	2.60	97,14

As regressões por análise discriminante por mínimos quadrados parciais (Partial Least Squares Discriminant Analysis - PLS-DA) ajustadas, apresentaram uma taxa de erro da validação cruzada para as sementes envelhecidas nos tempos 0, 24, 48, 72 e 96 para os lotes L1 é 0,675, L2 0,567 e L4 0,695 foi observado uma a acuracidade de 99,99% dos modelos ajustados com 10, 8 e 12 componentes principais.

As regressões por análise discriminante por mínimos quadrados parciais (Partial Least Squares Discriminant Analysis - PLS-DA) ajustadas, apresentaram uma taxa de erro da validação cruzada de 0,713 para o L3 e de L5 de 0,695 para sementes envelhecidas, havendo uma pequena diferença na acuracidade L3 94,29%, L5 97,14% dos modelos ajustados com 9 e 11 componentes principais.

Quando se comparam os lotes, pode-se observar maior variação nos lotes L4, L1 e L2 ,para os demais lotes, L3 e L5 podem ser explicada por menos variável resposta no envelhecimento artificial.

Observa-se que há uma variação na taxa de erro sendo pequena entre lotes e entre tempos de envelhecimento artificial, porém havendo uma variação de componentes principais, e é possível visualizar que o lote L2 se destaca pelo menor número de componentes principais e a menor taxa de erro e a maior acuracidade.

Após a definição do número de componentes principais do modelo foi realizada a determinação de quais medidas de absorbância são mais importantes para a previsão dentro de cada lote envelhecida artificialmente, pela seleção das variáveis importantes na projeção (Variable importance in projection - VIP).

Souza e Poppi (2012) relatam que a região espectral ou números de ondas, que contém a faixa de impressão digital, onde apresenta alterações significativas na distribuição dos máximos de absorção. Assim, ela é a mais apropriada para realizar a identificação, baseada em comparações espectrais.

Para lote L1 o cálculo do valor do VIP foram para dez medidas de absorvância do espectros mais importantes, 8687.39804 cm^{-1} (VIP= 2.277604), 9960.41818 cm^{-1} (VIP=2.268943), 8691.25568 cm^{-1} (VIP=2.221919), 9609.37324 cm^{-1} (VIP=2.085234), 8725.97441 cm^{-1} (VIP=2.200826), 8660.39459 cm^{-1} (VIP=2.152410), 9605.5156 cm^{-1} (VIP= 2.151617), 9605.5156 cm^{-1} (VIP= 2.151617), 9883.26545 cm^{-1} (VIP= 2.141708), 8880.27988 cm^{-1} (VIP= 2.138574), 9601.65796 cm^{-1} (VIP=2.085234) (Figura 12).

O Cálculo do VIP demonstrou que para o lote L2, foram oito medidas de absorvância do espectro mais importantes, 9609.37324 cm^{-1} (VIP=2.498323), 9605.5156 cm^{-1} (VIP=2.407162), 9601.65796 cm^{-1} (VIP=2.322213), 8660.39459 cm^{-1} (VIP=2.321423), 8687.39804 cm^{-1} (VIP=2.318569), 9960.41818 cm^{-1} (VIP= 2.311), 8880.27988 cm^{-1} (VIP= 2.303879) e 8691.25568 cm^{-1} (VIP= 2.293505) (Figura 13).

O cálculo do VIP demonstrou que para o lote L3 foram onze medidas de absorvância do espectro mais importantes, 8687.39804 cm^{-1} (VIP=2.287463), 9960.41818 cm^{-1} (VIP=2.238019), 8691.25568 cm^{-1} (VIP=2.206951), 9609.37324 cm^{-1} (VIP=2.187947), 8725.97441 cm^{-1} (VIP=2.144804), 9883.26545 cm^{-1} (VIP=2.124377), 8880.27988 cm^{-1} (VIP=2.107769), 8660.39459 cm^{-1} (VIP=2.096290), 9605.5156 cm^{-1} (VIP=2.096068), 8845.56115 cm^{-1} (VIP=2.048698), 8706.68623 cm^{-1} (VIP=2.043471) (Figura 14).

Observamos que para o lote L4 foram doze medidas de absorvância do espectros mais importantes, 8691.25568 cm^{-1} (VIP=2.303651), 8687.39804 cm^{-1} (VIP=2.273819), 9960.41818 cm^{-1} (VIP=2.247994), 9609.37324 cm^{-1} (VIP= 2.182636), 9605.5156 cm^{-1} (VIP=2.121071), 8725.97441 cm^{-1} (VIP=2.118553), 9883.26545 cm^{-1} (VIP=2.084064), 8880.27988 cm^{-1} (VIP=2.068613), 8660.39459 cm^{-1} (VIP=2.065069), 8706.68623 cm^{-1} (VIP=2.033059), 9601.65796 cm^{-1} (VIP=2.020701), 8845.56115 cm^{-1} (VIP=2.018249), observada na (Figura 15).

E para lote L5 foram nove medidas de absorbância do espectros mais importantes, 9960.41818 cm^{-1} (VIP=2.324540), 8687.39804 cm^{-1} (VIP=2.320922), 9609.37324 cm^{-1} (VIP=2.286863), 8691.25568 cm^{-1} (VIP=2.241895), 8725.97441 cm^{-1} (VIP= 2.206891), 9605.5156 cm^{-1} (VIP= 2.206219), 8880.27988 cm^{-1} (VIP= 2.149588), 9883.26545 cm^{-1} (VIP= 2.140517), 8845.56115 cm^{-1} (VIP=2.133304) (Figura 16);

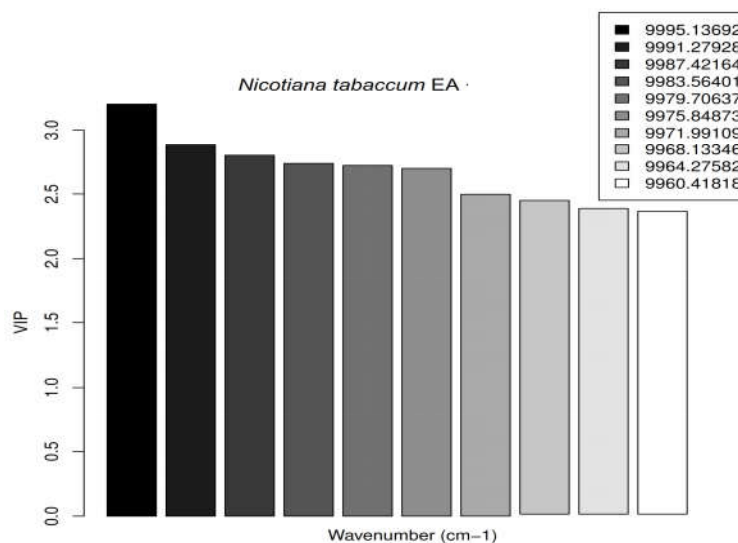


Figura 12 Seleção das variáveis importantes na projeção (Variable importance in projection - VIP) em dez medidas de Absorbância do Lote L1 de sementes de tabaco, cultivar CSC100, envelhecidas artificialmente

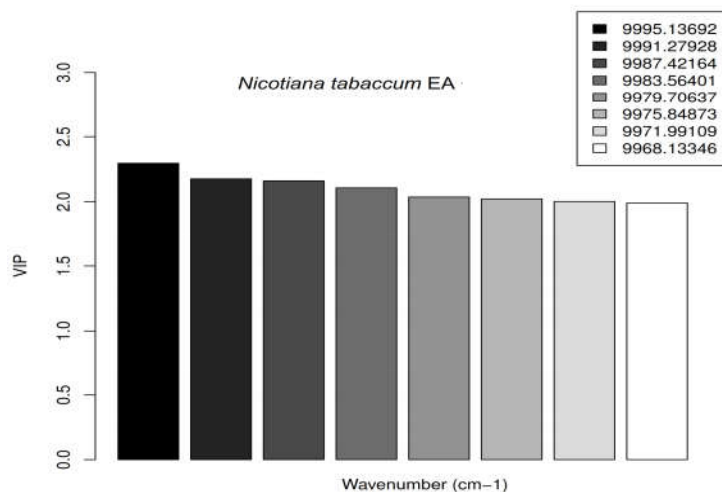


Figura 13 Seleção das variáveis importantes na projeção (Variable importance in projection - VIP) em oito medidas de Absorbância do Lote L2 de sementes de tabaco, cultivar CSC100, envelhecidas artificialmente

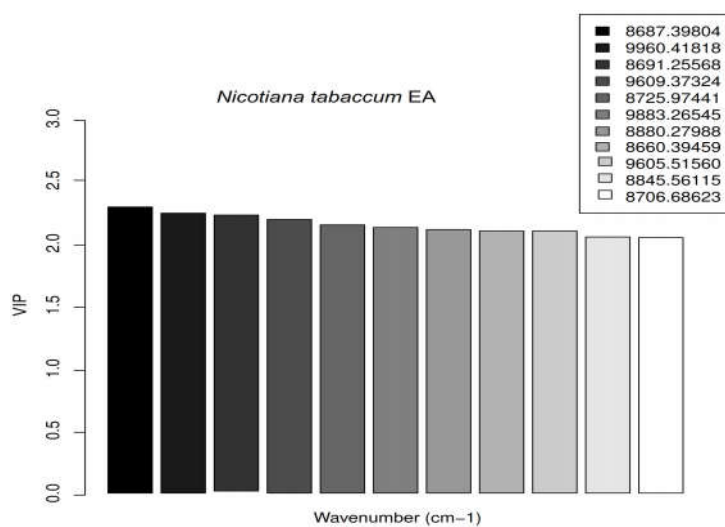


Figura 14 Seleção das variáveis importantes na projeção (Variable importance in projection - VIP) em onze medidas de Absorbância do Lote L3 de sementes de tabaco, cultivar CSC100, envelhecidas artificialmente

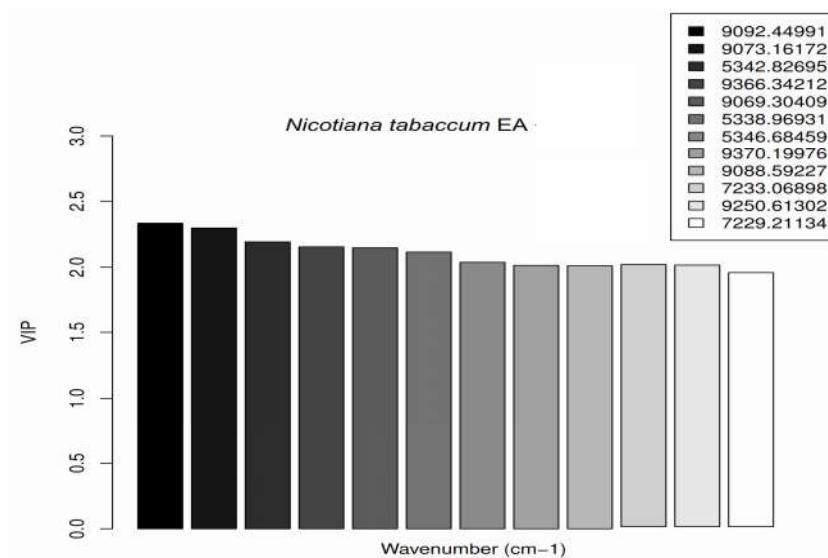


Figura 15 Seleção das variáveis importantes na projeção (Variable importance in projection - VIP) em doze medidas de Absorbância do Lote L4 de sementes de tabaco, cultivar CSC100, envelhecidas artificialmente

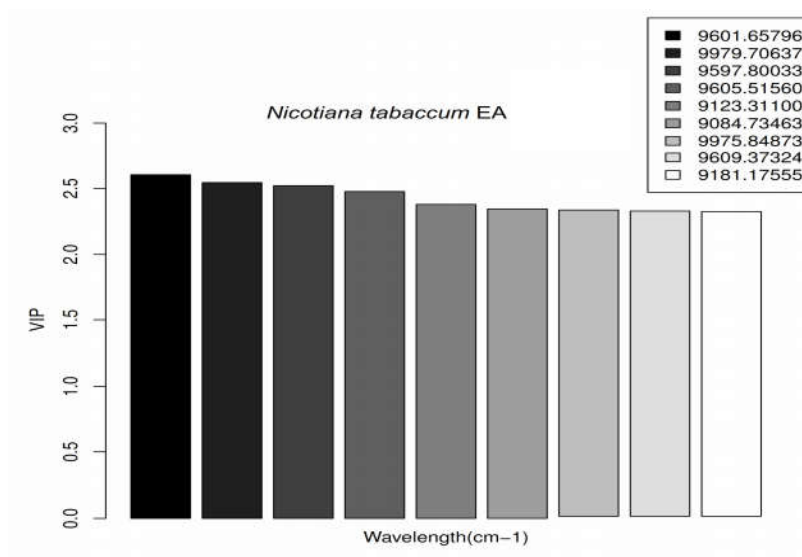


Figura 16 Seleção das variáveis importantes na projeção (Variable importance in projection - VIP) em nove medidas de Absorbância do Lote 5 de sementes de tabaco, cultivar CSC100, envelhecidas artificialmente

A regressão PLS-DA aplicada à absorvância do espectro no infravermelho próximo demonstrou ser uma abordagem promissora para cultivar CSC100 dos lotes estudados, em sementes envelhecidas artificialmente. A alta acuracidade na separação do envelhecimento artificial por lote corrobora com outros trabalhos que empregaram essa técnica com a mesma finalidade Durgante et al. (2013) e Krajsek, Zega e Kreft (2008), para separação de espécies arbóreas.

Segundo Vidigal et al. (2008) as principais alterações estão correlacionadas com o processo de deterioração de sementes, até mesmo com mudanças na composição dos grupos funcionais.

Os comprimentos de onda selecionados para cultivar CSC100 dos lotes L1 e L2) originados de sementes envelhecidas artificialmente, indicam uma vibração molecular correspondente ao grupo funcional dos Fenóis O-H (WORKMAN JÚNIOR; WEYER, 2012), que se encontra na região espectral $9995.13692\text{ cm}^{-1}$. Oliveira (2011) relata o que os fenóis estão correlacionados na deterioração de sementes. Algodão.

O lote L4 obteve um comprimento de onda selecionado na região espectral $9092.44991\text{ cm}^{-1}$ o que é correspondente ao grupo funcional com uma combinação de álcoois R-C-O-H. No lote L5; o comprimento de onda selecionado na região espectral $9601.65796\text{ cm}^{-1}$ corresponde a um grupo funcional hidrocarbonetos alifáticos C – H. Já para o lote L3, o comprimento de onda selecionado na região espectral $8687.39804\text{ cm}^{-1}$ corresponde a um grupo funcional hidrocarbonetos aromáticos C–H aromático (ArCH) (WORKMAN JÚNIOR; WEYER, 2012).

A análise do padrão espectral possibilitou a distinção de espectros principalmente no comprimento de onda de $9000\text{ a }5000\text{ cm}^{-1}$. Desta forma foi feito um desdobramento por lote para análise individual, observando a intensidade de absorvância obtida pela análise espectral dos lotes nos diferentes

tempos de envelhecimentos no comprimento de onda cm^{-1} (Figura 17 A, B, C, D e E).

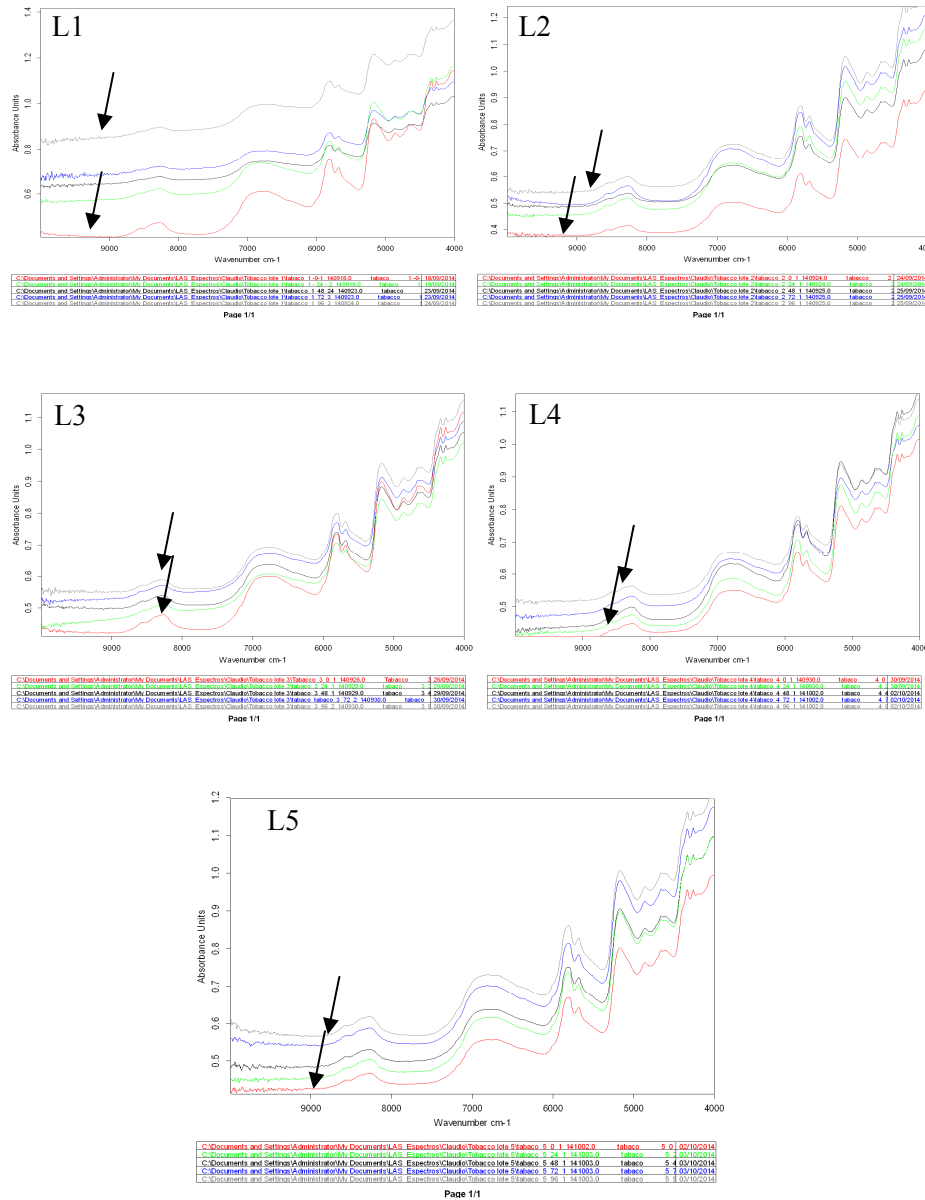


Figura 17 Intensidade de absorvância obtida pela análise espectral de sementes de tabaco dos lotes L1, L2, L3, L4 e L5, nos diferentes tempos de envelhecimento, no comprimento de onda de 10000 a 4000 cm^{-1}

Observando as figuras acima, nota-se que há uma variação de intensidade de absorvância, sendo a linha espectral vermelha, que corresponde a 0 hora com menor unidade de absorvância em relação as outras cores, que compreendem os períodos de 24, 48, 72 e 96 horas. A partir de 24 horas ocorreram acréscimos na absorvância, principalmente no período de 96 horas para o lote L1.

Apesar de tratar de um estudo preliminar exploratório, existem evidências de que a técnica de espectroscopia de infravermelho próximo (NIR) é potencial para detecção do nível de deterioração em sementes de tabaco.

Dentre as evidências devem ser consideradas as relação entre os níveis de deterioração de lotes e os grupamentos de componentes principais, as variações na acuracidade, nas variáveis de importância de projeção- VIP e na distinção de espectros, principalmente no comprimento de onda de 10000 a 5000 cm^{-1} .

Uma vez analisadas todas regiões espectrais, é possível ter uma ideia dos tipos de grupo funcionais devido seus estiramentos onde resulta as bandas e sua absorção.

5. CONCLUSÕES

A técnica de espectroscopia de infravermelho próximo é rápida e promissora para distinção de lotes de sementes de tabaco.

Existe relação entre os níveis de deterioração de lotes de sementes de tabaco envelhecidas artificialmente, avaliados por parâmetros fisiológicos e a intensidade de absorbância obtida pela análise espectral (NIR) no comprimento de onda de 10000 a 5000 cm^{-1} .

REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO DOS FUMICULTORES DO BRASIL. **Relatório de Atividades Afubra 2007**. Santa Cruz do Sul, 2012.

BARBOSA, L. C. A. **Espectroscopia no infravermelho na caracterização de compostos orgânicos**. Viçosa, MG: UFV, 2007. 189 p.

BARBOSA, R. M.; COSTA, D. S.; SÁ, M. E. Envelhecimento acelerado de sementes de espécies oleráceas. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 41, n. 3, p. 328-335, jul./set. 2011.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seed physiology of development and germination**. 2nd ed. New York: Plenum, 1994. 445 p.

BHERING, M. C. et al. Teste de envelhecimento acelerado em sementes de pimenta. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 28, n. 3, p. 64-71, 2006.

BINGHAM, L. J.; HARRIS, A.; McDONALD, L. A comparative study of radicle and coleoptile extension in maize seedlings from age and unaged seed. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 22, n. 1, p. 127-139, 1994.

BORCHER, H. W. **Pracma**: practical numerical math functions. R package version 1.7.0. 2014. Disponível em: <<http://CRAN.R-project.org/package=pracma>>. Acesso em: 22 jan. 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 2009. 399 p.

CANAZA-CAYO, A. W.; ALOMAR, D.; QUISPE, E. Prediction of alpaca fibre quality by near-infrared reflectance spectroscopy. **Animal**, Bethesda, v. 7, n. 7, p. 1219-1225, 2013.

CARVALHO, C.; NOVENBRE, A. D. L. C. Avaliação da qualidade de sementes de fumo, nuas e revestidas, pelo teste de condutividade elétrica. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 33, n. 1, p. 177-185, 2011.

CARVALHO, M. L. M.; FRANÇA NETO, J. B.; KRZYZANOWSKI, F. C. Controle de qualidade na produção de semente. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 27, n. 232, p. 52-58, maio/jun. 2006.

CARVALHO, M. L. M.; VON PINHO, E. V. R. **Armazenamento de sementes**. 1999. 67 p. Monografia (Especialização em Produção e Tecnologia de Sementes) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999.

CHANG, S. M.; SUNG, J. M. Deteriorative changes in primed sweet corn seeds during storage. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 26, p. 613-626, 1998.

COOLBEAR, P. Mechanisms of seed deterioration. In: BASRA, A. S. (Ed.). **Seed quality: basic mechanisms and agricultural implications**. New York: Food Products, 1995. p. 223-275.

DEJEAN, S.; GONZALEZ, I.; CAO, K. A. L. **mixOmics: Omics data integration project**. R package version 5.0-1. 2013. Disponível em: <<http://CRAN.R-project.org/package=mixOmics>>. Acesso em: 25 jan. 2016.

DELOUCHE, J. C.; BASKIN, C. C. Accelerated aging techniques for predicting the relative storability seed lots. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 1, n. 2, p. 427-252, 1973.

DURGANTE, F. M. et al. Species spectral signature: discriminating closely related plant species in the Amazon with Near-Infrared Leaf-Spectroscopy. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 291, p. 240-248, 2013.

ELLIS, R. H. Seed storage in national centers. In: RICE germplasm: collecting, preservation, use. Manila: IRRI, 1991. p. 81-85.

FERNANDES, E. J.; SADER, R.; CARVALHO, N. M. Viabilidade de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) estimada pelo pH do exsudato. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SEMENTES, 5., 1987, Gramado. **Anais...** Brasília: ABRATES, 1987. p. 80.

FREITAS, R. A. et al. Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de algodão submetidas ao envelhecimento artificial. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 22, n. 1, p. 67-76, 2006.

GELADI, P.; KOWALSKI, B. R. Partialleast-squaresregression: a tutorial. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 185, p. 1-17, 1986.

GOEL, A.; SHEORAN, I. S. Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes in cotton seeds under natural ageing. **Biologia Plantarum**, Praga, n. 46. v. 3, p. 429-434, 2003.

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

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

KODDE, J. et al. A fast ethanol assay to detect seed deterioration. **Seed Science Research**, Wallingford, p. 1-8, 2011. Disponível em: <<http://library.wur.nl/WebQuery/edepot/185592>>. Acesso em: 23 jun. 2015.

KRAJSEK, S. S. B.; ZEGA, P.; KREFT, A. S. Identification of herbarium Whole-leaf Samples of *Epilobium* Species by ATR-IR Spectroscopy. **Chemistry & Biodiversity**, Zurich, v. 5, p. 310-317, 2008.

LAGO, R. C. A. et al. Composição da semente e do óleos de semente de tabaco brasileiros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 13, n. 2, p. 93-102, 1978.

LEMONS, E. S. C. F. et al. Near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) to assess protein and lipid contents in *Avena sativa* L. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, MG, n. 8, p. 127-133, 2008.

LYRA, W. S. et al. Classificação periódica: um exemplo didático para ensinar análise de componentes principais. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 7, p. 1594-1597, 2010.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 1, p. 176-177, 1962.

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

MA, Y. et al. Rapid determination of four tobacco specific nitrosamines in burley tobacco by near-infrared spectroscopy. **Methods of Biochemical Analysis**, New York, v. 4, p. 1371, 2012.

MEVIK, B. H.; CEDERKVIST, H. R. Mean squared error of prediction (MSEP) estimates for principal component regression (PCR) and partial least squares regression (PLSR). **Journal of Chemometrics**, Chichester, v. 18, p. 422–429, 2004.

MEVIK, B. H.; WEHRENS, R. The pls package: principle component and partial least-squares regression in R. **Journal of Statistical Software**, Los Angeles, v. 18, p. 1–24, 2007.

MORGANO, M. A. et al. Determinação de umidade em café cru usando espectroscopia NIR e regressão multivariada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 1, p. 12-17, jan./mar. 2008.

NEWAY, P. S.; ROBSON, S. K. A.; CROZIER, R. H. Near-infrared spectroscopy as a tool in behavioural ecology: a case study of the weaver ant, *Oecophylla smaragdina*. **Animal Behaviour**, London, v. 76, n. 5, p. 1727-1733, Nov. 2008.

OLESEN, M. H.; DUIJN, B.; BOELT, B. Introduction of new methods: spectral imaging. **Seed Testing International**, Edinburgh, n. 147, p. 10-13, 2014.

OLIVEIRA, A. S. **Alterações no potencial fisiológico de sementes de algodão no armazenamento**. 2011. 125 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

PEREIRA, M. D.; MARTINS FILHO, S. Envelhecimento acelerado em sementes de cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 40, n. 3, p. 251-256, jul./set. 2010.

PÉREZ-ENCISO, M.; TENENHAUS M. Prediction of clinical outcome with microarray data: a partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) approach. **Human Genetics**, Berlin, v. 112, n. 5/6, p. 581-592, 2003

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: a language and environment for statistical computing**. Vienna: Foundation for Statistical Computing, 2005. 2576 p.

ROBERTS, C. A.; WORKMAN JÚNIOR, J.; REEVES, J. B. (Ed.). **Near-infrared spectroscopy in agriculture**. Madison: ASA, 2004. 44 p.

SANTOS, F. et al. Teste de envelhecimento acelerado para avaliação da qualidade de sementes de alface e almeirão. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 33, n. 2, p. 322-323, 2011.

SCARF, M. et al. Near infrared spectroscopy for bioprocess monitoring and control: Current status and future trends. **Critical Reviews in Biotechnology**, Boca Raton, v. 26, n. 1, p. 17-39, 2006.

SEGATO, S. V.; GABALDI, F. C. Fungos associados às sementes de fumo (*Nicotiana tabacum* L.). **Nucleus**, Ituverava, v. 9, n. 2, p. 1-6, out. 2012.

SOUZA, A. M.; POPPI, R. J. Experimento didático de quimiometria para análise exploratória de óleos vegetais comestíveis por espectroscopia no infravermelho médio e análise de componentes principais: um tutorial. **Química Nova**, São Paulo, v. 35, n. 1, p. 223-229, 2012.

SUNDARAM, J.; KANDALA, C. V.; BUTTS, C. L. Application of near infrared spectroscopy to peanut grading and quality analysis. **Sensing and Instrumentation for Food Quality and Safety**, Cham, v. 3, n. 3, p. 156-164, 2009.

TENENHAUS, M. **La régression PLS: théorie et pratique**. Paris: Technip, 1998. 254 p.

TORRES, S. B.; NEGREIROS, M. Z. Envelhecimento acelerado em sementes de berinjela. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 30, n. 2, p. 209-213, 2008.

VIDIGAL, D. S. et al. Teste de condutividade elétrica para semente de pimenta. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 30, n. 1, p. 168-174, 2008.

WANG, D. et al. The application of near-infrared spectra micro-image in the imaging analysis of biology SAMPLES. **Journal of Innovative Optical Health Sciences**, Munich, v. 7, n. 4, p. 1-10, 2014.

WORKMAN JÚNIOR, J.; WEYER, L. **Practical guide and spectral atlas for interpretive near-infrared spectroscopy**. Boca Raton: CRC, 2012. 304 p.

ZHANG, J. et al. Dynamic metabonomic responses of tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants to salt stress. **Journal Proteome Research**, Washington, v. 10, p. 1904-1914, 2011.

ZHU, D. et al. Quality assessment of crop seeds by near-infrared hyperspectral imaging. **Sensor Letters**, Valencia, v. 9, n. 3, p. 1144-1150, 2011.