

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
CÂMPUS DE CHAPADÃO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

IZABELA CRISTINA DE OLIVEIRA

**Espectroscopia óptica: uma nova ferramenta para avaliação do vigor
de sementes de *Brachiaria***

CHAPADÃO DO SUL – MS

2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
CÂMPUS DE CHAPADÃO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

IZABELA CRISTINA DE OLIVEIRA

**ESPECTROSCOPIA ÓPTICA: UMA NOVA FERRAMENTA PARA
AVALIAÇÃO DO VIGOR DE SEMENTES DE *BRACHIARIA***

Orientador(a): Prof (a). Dr(a) Charline Zaratin Alves

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agronomia, área de concentração: Produção Vegetal.

CHAPADÃO DO SUL – MS

2021



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

DISCENTE: Izabela Cristina de Oliveira

ORIENTADOR: Dra. Charline Zaratín Alves

TÍTULO: Espectroscopia óptica: uma nova ferramenta na avaliação do vigor de sementes de Brachiaria

AVALIADORES:

Profa. Dra. Presidente Charline Zaratín Alves

Prof. Dr. Cicero Rafael Cena da Silva

Prof. Dr. Daniel Araujo Gonçalves

Chapadão do Sul, 18 de fevereiro de 2021.



Documento assinado eletronicamente por **Charline Zaratín Alves, Professor do Magisterio Superior**, em 18/02/2021, às 12:55, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Cicero Rafael Cena da Silva, Professor do Magisterio Superior**, em 18/02/2021, às 13:19, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniel Araujo Gonçalves, Usuário Externo**, em 18/02/2021, às 13:39, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site
[https://sei.ufms.br/sei/controlador_externo.php?](https://sei.ufms.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0)



[acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0](https://sei.ufms.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **2402712** e o código CRC **FA17CCB1**.

COLEGIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

Rod MS 306, Km 105, Caixa Postal 112

Fone: (67)3562-6351

CEP 79560-000 - Chapadão do Sul - MS

DEDICATÓRIA

Ao senhor Péricles, meu professor de ciências da 6ª série, por ter despertado em mim a curiosidade em aprender e não me conformar com respostas vazias. A influência de bons professores, ninguém consegue apagar.

AGRADECIMENTOS

Tenho o coração mole e muitas pessoas a agradecer.

À Deus por sempre usar a sutileza para mostrar o caminho que deveria ser seguido e o amor para desenvolver em mim, gentileza com os outros.

Aos meus pais, Joziel Francisco de Oliveira e Elaine Cristina de Oliveira por acreditarem na educação acima de tudo e mesmo ser ter condições financeiras para proporcionar as melhores oportunidades, sempre buscaram incentivar os estudos e ensinar que o conhecimento vale a pena, porque este ninguém pode roubar. Sou grata pelos pais que tenho e mais grata ainda por todo apoio para realizar este sonho.

As minhas irmãs, Gabriela Fabrícia de Oliveira e Ana Paula de Oliveira, o melhor presente que ganhei dos meus pais, por ficarem ao meu lado, sempre torcerem por mim e mesmo com toda a distância, estarem presentes. Sempre serão minha maior saudade e minha maior inspiração pra ser melhor a cada dia.

Ao meu namorado, Leonardo Cardoso Dalbosco, pelo apoio, paciência, segurança, amor e por ficar ao meu lado mesmo nos momentos difíceis. E ao meu gato Frederico, meu amigo peludo, que me ensinou sobre paciência e sobre ter o coração receptivo pras coisas boas da vida.

À minha amiga Silvia Elena Navarrete Thomé, que conheci no primeiro dia de aula e já sabia que seríamos amigas, por todas as madrugadas escrevendo, por todo apoio e incentivo durante a realização das atividades do Mestrado e em especial, pela amizade fora do câmpus. Você sempre será “a minha pessoa”.

As minhas amigas Camila Martins e Renata Cheida, por me lembrarem que a vida não é só estudar, que amigos são para todas as horas e que, as melhores histórias não se iniciam tomando toddynho.

A minha orientadora, professora Charline Zaratín Alves por cada ensinamento, por cada palavra de incentivo, confiança e atenção que tanto fizeram diferença na minha vida. Quando volto minha memória para 5 anos atrás, meu coração se enche de gratidão por ter acreditado em mim, abrindo as portas do laboratório para me ensinar muito mais que testes aplicados em sementes, mas sobre resiliência, coragem e dedicação. Sentirei saudade da sua orientação e da cadeira (vulgo divã), quando além de orientadora, precisa ser psicóloga, conselheira e amiga. Só tenho a agradecer por tudo, sempre irei te levar no coração. E sim, “fui eu que escrevi”.

A técnica de laboratório Ana Carina Cândido, por todos os ensinamentos e conselhos, mas também por todos os cafés, por toda amizade e gentileza. Mesmo que eu me mude para o

outro lado do mundo, nunca vou conseguir me esquecer de você e do quanto me ensinou como profissional, estudante e ser humano.

À psicóloga Bruna Diniz, por me ajudar a entender meus sentimentos, me encorajar a mergulhar no que gosto e saber pausar e descansar quando necessário. Vou levar cada sessão e conversa pra sempre no meu coração.

Ao Laboratório de Tecnologia de Sementes por tudo que vivi e aprendi ao longo de todo o período que fui aluna e orientada. E a todos os profissionais e colegas que conheci.

Ao Laboratório de Óptica e Fotônica por contribuir para a realização da pesquisa.

À Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, câmpus Chapadão do Sul, pelo acesso à educação.

À Fundação de Apoio à Pesquisa e Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa durante toda a realização do Mestrado.

A todos os professores que tive a honra de conhecer, por compartilharem seus conhecimentos e por incentivarem a valorização da ciência.

Ao professor Cícero Rafael Cena da Silva, por todo apoio na realização deste estudo, por todo incentivo e paciência, e principalmente, por se disponibilizar a ajudar. Sempre serei grata por tudo que aprendi, em especial que “olhar fora da caixa é sempre necessário”.

Ao professor Daniel Araújo Gonçalves pelo aceite em participar da banca e contribuir para a melhoria deste trabalho.

A todos os familiares, amigos, colegas de turma e pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho ou que estiveram comigo durante o Mestrado.

Ao mestrando Thiago França por toda ajuda, paciência para explicar e apoio na interpretação das análises deste trabalho.

E, ao Sci-Hub, por quebrar as barreiras da ciência.

Meu muito obrigada!

EPÍGRAFE

“Todos nós recebemos cartas aleatórias no início do jogo, alguns, cartas melhores. Embora seja fácil nos fixar no que está na mão e sentir que nos ferramos, na verdade *o jogo está nas escolhas que fazemos com as cartas, nos riscos que decidimos correr e com as consequências que escolhemos viver*. Quem de maneira consciente faz as melhores escolhas diante das situações que se apresentam, acaba ganhando no jogo, não necessariamente quem tem as melhores cartas, o mesmo ocorre com a vida”.

Mark Manson

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Espectros FTIR médios de sementes de *Brachiaria* cultivares Paiguás (Linha azul) e Marandu (Linha vermelha) de baixo vigor (PBV e MBV) e alto vigor (PAV e MAV).....20
- Figura 2.** Plotagem de pontuações 4000 a 700 cm^{-1} (a) Marandu e (b) Paiaguás; 1800 a 1600 cm^{-1} (c) Marandu e (d) Paiaguás.....22
- Figura 3.** Precisão dos métodos de aprendizagem de máquina para distinguir lotes de alto e baixo vigor de sementes de *Brachiaria* nas faixas espectrais 4000 a 600 cm^{-1} (a) Marandu e (b) Paiaguás e 1800 a 1600 cm^{-1} (c) Marandu e (d) Paiaguás.....23
- Figura 4.** Matriz de confusão relacionada ao método LDA + PCA, com precisão de 100% para distinguir lotes de alto e baixo vigor da (a) Marandu e (b) Paiaguás.....24

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Primeira contagem de germinação (PCG), germinação (GERM), condutividade elétrica (CE), massa seca de raiz (MSR) e massa seca de parte aérea (MSPA) para lotes de sementes de *B. brizantha* cultivar Marandu e Paiaguás.....19
- Tabela 2.** Acurácia apresentada pelos métodos LDA, KNN e SNV para classificação de sementes de *Brachiaria* cultivar Marandu e Paiaguás.....25

RESUMO

O vigor de sementes é motivo de estudos por caracterizar a capacidade das sementes germinarem e gerarem plântulas rapidamente mesmo em condições adversas, resultado dos atributos genéticos, fisiológicos e agronômicos. Porém, os testes utilizados para mensurar o vigor das sementes são relativamente demorados, retardando a tomada de decisão em relação a lotes de sementes com maior probabilidade de sucesso em campo. A partir dos avanços tecnológicos e computacionais, técnicas espectroscópicas no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), associadas a métodos quimiométricos se apresentam como ferramenta para obtenção de informações sobre sementes de forma simples e rápida, acelerando a escolha dos melhores lotes de sementes a serem plantados. Para a formação de pastagens, há ampla utilização de *Brachiaria brizantha*, em especial as cultivares Marandu e Paiaguás, para a alimentação animal. Diante disso, objetivou-se com este estudo investigar a aplicabilidade de técnicas espectroscópicas FTIR associadas a métodos quimiométricos para avaliação do vigor de lotes de sementes de *Brachiaria*. Inicialmente as sementes foram submetidas a testes de germinação e vigor, para distinção da qualidade fisiológica dos lotes. Posteriormente, foram avaliadas a partir de análises espectroscópicas FTIR, no qual os dados obtidos foram analisados por estatística multivariada, com aplicação da análise de componentes principais (PCA) e Machine Learning. Os espectros gerados pelo FTIR permitiram a identificação das moléculas que podem ser as responsáveis pela diferenciação entre lotes de alto e baixo vigor, enquanto as análises estatísticas foram responsáveis por reduzir a dimensionalidade dos dados e evidenciar os principais pontos de interesse deste estudo. Através das análises realizadas, identificou-se que no intervalo do espectro que compreendem de 1800 a 1600 cm^{-1} , se encontram proteínas, lipídios e amins, podendo ser as principais moléculas responsáveis pela separação de lotes de alto e baixo vigor, tanto para cultivar Marandu, quanto para Paiaguás, de forma análoga às análises rotineiras feitas no laboratório de sementes. As informações obtidas neste trabalho são de suma importância para avaliação do vigor de sementes de *Brachiaria*, com precisão e em tempo muito menor que os testes padrões de laboratório. Assim, o uso de espectroscopia FTIR é promissora para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de *Brachiaria*.

Palavras-chave: FTIR. PCA. Qualidade fisiológica.

ABSTRACT

Seeds vigor is the reason for studies to characterize the ability of seeds to germinate and generate seedlings quickly even in adverse conditions, a result of genetic, physiological and agronomic attributes. However, the tests used to measure seed vigor are relatively time consuming, delaying decision making in relation to seed lots with greater probability of success in the field. Based on technological and computational advances, Fourier transform infrared spectroscopic techniques (FTIR), associated with chemometric methods, presents itself as a tool to obtain information about seeds in a simple and fast way, accelerating the choice of the best seed lots to be planted. For the formation of pastures, the wide use of *Brachiaria brizantha* in particular the cultivars Marandu and Paiaguas, for a fees animal. Therefore, the study was investigate the applicability of FTIR spectroscopic techniques associated whith chemometric methods to asses the vigor of *Brachiaria* seed lots. Initially the the seeds were submitted to germination and vigor tests, obtain information about the physiological quality. Subsequently, seeds were evaluated using FTIR spectroscopic analysis, where the data were obtained by multivariate statistics, with the application of principal component (PCA) and Machine Learning. The spectra generated by the FTIR allowed the identification of the main molecules responsible for the differentiation between high and low vigor batches, while the analyzes were responsible flor reducing the dimensionality of the data and highlighting the main points of interest in thes study. Through the analyzes carried out, it was identified that in the spectrum ranges from 1800 to 1600 cm^{-1} , proteins, lipids and amines were classified, being these as the main molecules responsables for the separation of lots of high and low vigor, both to cultivate Marandu, as for Paiaguás. The information obtained in this work is of paramount importance for assessing the vigor of *Brachiaria* seeds, with precision and in a much shorter time than standard laboratory tests. Thus, the use of FTIR spectroscopy is promising for assessing the physiological quality of *Brachiaria* seeds.

Keywords: FTIR. PCA. Physiological quality.

SUMÁRIO

RESUMO	13
ABSTRACT	13
INTRODUÇÃO	14
MATERIAL E MÉTODOS	16
Análise da qualidade fisiológica das sementes	16
Análise de espectroscopia óptica no infravermelho por transformada de Fourier - FTIR	17
RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
Avaliação da qualidade fisiológica.....	19
Infravermelho com transformada de Fourier - FTIR.....	20
CONCLUSÃO	26
REFERÊNCIAS	26

Espectroscopia óptica: uma nova ferramenta para avaliação do vigor de sementes de *Brachiaria*

RESUMO: O objetivo do trabalho foi investigar a aplicabilidade de espectroscopia infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e métodos quimiométricos para diferenciar e classificar lotes de sementes de *Brachiaria brizantha* em alto e baixo vigor, encontrando os principais elementos responsáveis pela diferenciação em relação à qualidade fisiológica. Quatro lotes comerciais de *Brachiaria brizantha*, dois lotes da cultivar Marandu e dois lotes da cultivar Paiaguás foram submetidas à testes de germinação e vigor (primeira contagem de germinação, condutividade elétrica e massa seca de plântulas), para distinção da qualidade fisiológica dos lotes. Posteriormente, 20 gramas de cada lote foram moídos e levados para o espectrômetro FTIR, que coletou espectros na faixa de 4000 a 700 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} e 5 varreduras. O uso de espectroscopia FTIR associada a ferramentas quimiométricas discriminou lotes de alto e baixo vigor de sementes de *B. brizantha*, tanto para a cultivar Marandu, quanto a Paiaguás, encontrando as principais moléculas que podem ser responsáveis pela discriminação, sendo elas proteínas, lipídios e amins. O método de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) associado a métodos quimiométricos foi eficiente na diferenciação de lotes de alto e baixo vigor de sementes de *Brachiaria brizantha* na faixa espectral compreendida entre 1800 a 1600 cm^{-1} , associada a presença de proteínas e lipídios. O método de aprendizagem de máquina linear discrimination analysis (LDA) foi 100% preciso na distinção de sementes de alto e baixo vigor de *Brachiaria brizantha*. Recomenda-se o uso de espectroscopia FTIR associado a métodos quimiométricos e análise multivariada para avaliação do vigor de sementes de *Brachiaria brizantha*.

Palavras-chave: Forrageira. FTIR. PCA. Potencial fisiológico.

ABSTRACT: The objective of the work was to investigate the applicability of Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy and chemometric methods to differentiate and classify *Brachiaria brizantha* seed lots in high and low vigor, finding the main elements responsible for the differentiation in relation to physiological quality. Four commercial lots of *Brachiaria brizantha*, two lots cultivar Marandu and two lots cultivar Paraguás the seeds were submitted to germination tests and vigor (first germination count, electrical conductivity and seedling dry mass), distinguish the physiological quality of the lots. Subsequently were ground and taken to the spectrometer FTIR, collecting spectra in the range of 4000 to 700 cm^{-1}

¹ with a resolution of 4 cm⁻¹ and 5 scans, the measurements being performed in duplicate. For classification, the average gross FTIR spectra of 40 samples were investigated by unsupervised and supervised multivariate analysis. The use of FTIR spectroscopy associated with chemometric tools discriminated high and low vigor lots of seeds of *B. brizantha*, both for the cultivar Marandu and Paiaguás, where the main molecules responsible for discrimination were proteins, lipids and mines. The Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) method associated with chemometric methods was efficient in differentiating high and low vigor lots of *Brachiaria brizantha* seeds in the spectral range between 1800 to 1600 cm⁻¹, associated with the presence of proteins and lipids. The linear discrimination analysis (LDA) machine learning method was 100% accurate in distinguishing high and low seeds from *Brachiaria brizantha*. It is recommended to use FTIR spectroscopy associated with chemometric methods and multivariate analysis to assess the vigor of *Brachiaria brizantha* seeds.

Keywords: Forage. FTIR. PCA. Physiological potential.

INTRODUÇÃO

A utilização sementes de qualidade é de suma importância para expressão do potencial produtivo, resultado de seus atributos físicos, genéticos, sanitários e fisiológicos. Dentre os atributos referentes à qualidade fisiológica, o vigor se destaca por sua relevância, relacionando-se a taxas e uniformidade de germinação, emergência e crescimento de plântulas no campo, influenciando por consequência, o rendimento e produtividade das culturas (ROSSI et al., 2017).

O vigor pode ser definido como a soma de atributos que confere às sementes o potencial de germinar e gerar plântulas normais rapidamente, ou seja, impulsionar a germinação, crescimento e desenvolvimento de plântulas mesmo em condições ambientais adversas (MARCOS FILHO, 2013). A importância do conhecimento sobre o vigor de sementes se encontra na detecção de diferenças entre os lotes e consequentemente, na obtenção de informações sobre quais lotes apresentam maior probabilidade de sucesso no estabelecimento do estande (FRANÇA-NETO et al., 2016).

A aquisição de informações sobre o vigor das sementes ocorre a partir da realização de testes de vigor, porém, estes demoram alguns dias para a obtenção de resultados, evidenciando a necessidade de novas técnicas que avaliem o vigor de maneira rápida e eficiente. O aumento de estudos voltados para a compreensão do vigor tem estimulado a

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

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

A técnicas FTIR vêm sendo aplicadas a diferentes estudos agronômicos com sucesso. Larios et al. (2020) concluíram que o uso de espectroscopia FTIR associada a ferramentas quimiométricas foi eficiente para discriminar lotes de sementes de soja em alto e baixo vigor. Andrade et al. (2020) utilizaram espectroscopia ATR-FTIR associada a análises multivariadas para identificar alterações bioquímicas em tecidos de sementes de alto e baixo vigor (embrião e endosperma), obtendo base teórica para o melhoramento genético de cultivares de milho que visam maior qualidade fisiológica. Basnet et al. (2016) utilizaram espectroscopia ATR-FTIR para investigar os potenciais locais de ligação com metais na casca, farelo e tecidos do endosperma em arroz, alcançando resultados satisfatórios em relação aos principais locais de acúmulo. Apesar dos estudos de investigação da aplicabilidade de FTIR sobre plantas da família Poaceae, pouco se sabe sobre sua aplicabilidade na distinção de lotes de diferentes cultivares sementes de *Brachiaria*.

O capim braquiária ou braquiarão (*Brachiaria brizantha*) é uma planta forrageira com grande importância na formação de pastagens melhoradas e no sistema de integração lavoura-pecuária. O Brasil se destaca no cenário mundial pelas extensões de áreas cultivadas com pastagens, onde, 80% destas, ocupadas por genótipos de *Brachiaria*, são utilizadas como forma econômica e menos onerosa para atender a demanda nutricional de rebanhos (MÁCEDO et al., 2018; HOFFMANN et al., 2014).

Por sua notoriedade, a *Brachiaria* é motivo de estudos relacionados ao conhecimento da qualidade fisiológica de suas sementes, bem como o ajuste de metodologias de testes para sua avaliação, porém, mostram-se necessárias técnicas que apresentem rapidez na preparação de amostras e facilidade na obtenção de resultados, como a aplicação de espectroscopia óptica.

Assim, o objetivo do trabalho foi investigar a aplicabilidade de espectroscopia FTIR e métodos quimiométricos para diferenciar e classificar lotes de sementes de *Brachiaria brizantha* em alto e baixo vigor, encontrando os principais elementos responsáveis pela diferenciação em relação à qualidade fisiológica.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado em duas etapas, no qual a primeira foi realizada no Laboratório de Tecnologia de Sementes da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Câmpus de Chapadão do Sul, com a finalidade de distinguir a qualidade fisiológica dos lotes de sementes. A segunda etapa foi realizada no Laboratório de Óptica e Fotônica da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campus de Campo Grande, aplicando-se a técnica LIBS para distinção dos lotes.

Análise da qualidade fisiológica das sementes

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e quatro repetições por tratamento. Para compor as amostras, utilizou-se quatro lotes comerciais de *Brachiaria brizantha*, dois lotes da cultivar Marandu e dois lotes da cultivar Paiaguás. Para a diferenciação dos lotes, as sementes foram submetidas aos testes de germinação e vigor (primeira contagem de germinação, condutividade elétrica e massa seca de plântulas).

Inicialmente, as sementes de *B. brizantha* foram submetidas à determinação do teor de água, conforme recomendações de Brasil (2009). Para o teste de germinação, foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes distribuídas sobre uma folha de papel mata-borrão umedecido 2,5 vezes a massa do substrato não hidratado, acondicionadas em caixas gerbox e levadas a B.O.D., com temperatura alternada de 15-35 °C (BRASIL, 2009). A primeira contagem de germinação foi realizada juntamente com o teste de germinação, computando-se a porcentagem de plântulas normais após sete dias de instalação do teste para primeira contagem de germinação e contagem final aos 21 dias, para o teste de germinação (BRASIL, 2009).

Para o teste de condutividade elétrica utilizou-se o método de condutividade de massa, onde 50 sementes foram pesadas e colocadas em copos plásticos com 75 mL de água destilada, mantidos a 25 °C durante 24 horas (KRZYZANOWSKI et al., 1999). Após esse período, os recipientes foram levemente agitados e com o auxílio do condutivímetro (MS

Tecnopon[®] – mCA150) foi efetuada a medição das leituras de condutividade elétrica da solução, com valores expressos em $\mu\text{S cm}^{-1} \text{ g}^{-1}$.

Para a massa seca de plântulas, 20 sementes foram distribuídas sobre duas folhas de papel germitest, umedecido 2,5 vezes a massa do substrato não hidratado, acondicionadas em sacos plásticos levados ao germinador em temperatura alternada de 15-35, durante sete dias (BRASIL, 2009). Após esse período, as plântulas foram divididas, separando-se raiz e parte aérea, acondicionando em sacos de papel identificados e levadas a estufa de circulação de ar a 65 °C, até a obtenção de massa constante, com resultados expressos em mg^{-1} .

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância comparando-se as médias pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Análise de espectroscopia óptica no infravermelho por transformada de Fourier - FTIR

Após a realização dos testes para avaliação da qualidade fisiológica, foram retiradas aproximadamente 20 gramas de amostras de cada lote de sementes de alto e baixo vigor de cada uma das cultivares. Essas amostras foram moídas e passadas por peneira granulométrica de malha 25 com abertura de 710 μm e levadas para o espectrômetro óptico.

Os espectros de infravermelho médio foram obtidos a partir de um espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) (Spectrum 100, Perkin Elmer) com uma reflectância total atenuada. Os espectros foram coletados na faixa de 4000 a 700 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e 5 varreduras, sendo as medições realizadas em duplicata. A análise dos dados obtidos foi realizada com o objetivo de discriminar os lotes de alto e baixo vigor de cada cultivar. Inicialmente obteve-se um conjunto de 80 amostras, 40 amostras para a cultivar Marandu e 40 amostras para a cultivar Paiaguás, de modo que de cada lote, retirou-se 20 amostras.

Para a classificação, os espectros FTIR brutos médios de 40 amostras foram investigados por análise multivariada não supervisionada e supervisionada com o auxílio do software MATLAB R2018a. Inicialmente foi realizado o pré-tratamento dos dados aplicando-se a padronização Standard Normal Variate (SNV), com a finalidade de nivelar os dados, deixando-os com a mesma importância e eliminando problemas de descolamento, ou seja, diminuindo a distância entre os espectros que estão sendo analisados.

Aplicou-se então a análise de componentes principais (PCA), técnica matemática utilizada para reduzir a dimensionalidade dos dados através da transformação do conjunto de dados originais em um novo conjunto, onde o primeiro componente principal detém a variável

que causou maior variabilidade no conjunto de dados, o segundo componente principal detém a segunda variável responsável por causar maior variabilidade nos dados, e assim sucessivamente (KANNO; KANEKO, 2019). Através dos resultados obtidos pelo PCA, houve a seleção de novo intervalo espectral, sendo reduzido de 4000-700 cm^{-1} para 1800-1600 cm^{-1} , por ser observado que nesse intervalo existe diferenças evidentes entre as transmitâncias.

A técnica de aprendizagem de máquina (Machine Learning) foi aplicada para os dados brutos (4000-700 cm^{-1}) e para o novo intervalo espectro obtido por PCA, por este último produzir melhores resultados, por funcionar com quantidade semelhante de informações e menos variáveis. Empregou-se algoritmos de aprendizado de máquina como métodos supervisionados, sendo eles Linear Discriminant Analysis (LDA), K-nearest neighbors (KNN) e Support Vector Machine (SVM). O algoritmo LDA utiliza uma técnica matemática para reduzir a dimensão, maximizando a variância, por acreditar existir uma fronteira linear entre os dados e apesar de não ser um método tendencioso, necessita de outros métodos para comprovação de resultados. O algoritmo KNN baseia-se na distribuição espacial dos dados e classifica a mostra com base no número de vizinhos próximos, sendo essa classificação realizada diretamente contando um número específico de vizinhos (fino= 1, médio= 10 e grosso= 100) ou usando pesos de distâncias, onde o mais próximo apresenta maior peso (DIETTERICH, 2000). Já o algoritmo SVM organiza as variáveis para obter uma separação espacial dos grupos através de hiperplanos (linear, quadrático e cúbico) (GREDILLA et al., 2016).

Todos os métodos foram comparados e os resultados resumidos em conformidade. Para o processo de validação, empregou-se a validação cruzada (LOO-CV), onde uma amostra é retirada do conjunto de treinamento e usada para testar o poder preditivo da modelagem, sendo esse processo repetido, alternando a amostra retirada para testar todos os conjuntos da amostra. A partir do processo de validação, a classificação da amostra é realizada, adotando-se os algoritmos de aprendizagem de máquina adequados, onde cada amostra foi testada e atribuída a seu grupo correspondente (alto ou baixo vigor). As amostras são classificadas como verdadeiras quando a Classe Predita, da classificação de aprendizagem de máquina corresponde a Classe Verdadeira, identificada a partir do método padrão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação da qualidade fisiológica

As sementes de *B. brizantha* apresentavam teor de água variando entre 9,21 e 9,68%. Os testes de germinação e vigor aplicados aos lotes foram eficientes na distinção de alto e baixo vigor. Essa distinção é resultado do comportamento das sementes em relação às condições de ambiente que se encontram, como a rápida germinação, uniformidade de plântulas geradas e a capacidade de expressar suas funções vitais mesmo em condições desfavoráveis (MARCOS-FILHO, 2015).

Os lotes da cultivar Marandu apresentaram distinção para todas as variáveis estudadas, no qual o Lote 1 foi caracterizado como de alto vigor por se destacar do Lote 2 em relação à sua qualidade fisiológica, ou seja, rapidez para germinar, maior porcentagem de plântulas normais germinadas, menor valor de condutividade elétrica e maior peso de massa seca (Tabela 1). Já o Lotes 1 da cultivar Paiaguás apresentou os melhores resultados para todas as variáveis estudadas, com exceção da massa seca de parte aérea (MSPA) que não apresentou diferença estatística entre os lotes, diferindo estatisticamente do Lote 2 (Tabela 1).

Tabela 1. Primeira contagem de germinação (PCG), germinação (GERM), condutividade elétrica (CE), massa seca de raiz (MSR) e massa seca de parte aérea (MSPA) para lotes de sementes de *B. brizantha* cultivar Marandu e Paiaguás.

Cultivar		Marandu			
Lote	PCG (%)	GERM (%)	CE ($\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$)	MSR (g)	MSPA (g)
1	55 a	84 a	247,50 a	0,60 a	2,04 a
2	37 b	65 b	575,00 b	0,43 b	1,67 b
F	0,01*	0,01*	0,00*	0,02*	0,03*
CV (%)	20,99	14,45	10,84	15,64	11,14
Cultivar		Paiaguás			
Lote	PCG (%)	GERM (%)	CE ($\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$)	MSR (g)	MSPA (g)
1	46 a	77 a	648,75 a	0,45 a	1,82
2	23 b	63 b	457,75 b	0,32 b	1,88
F	0,02*	0,02*	0,01*	0,01*	0,12 ^{ns}
CV (%)	29,34	10,83	15,96	58,63	8,93

* significativo e ^{ns} não significativo pelo teste F ao nível 5% de probabilidade. Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Scott-knott ao nível 5% de probabilidade.

Os testes de vigor apresentam dentre os principais objetivos a capacidade de prever e selecionar lotes de sementes que tenham melhor qualidade, tanto antes do processamento e

armazenamento, quanto para a semeadura em campo (MARCOS-FILHO, 2015). Os lotes classificados como alto vigor foram aquelas que apresentaram os melhores resultados nos testes realizados, apresentando rápida germinação, maior peso de massa seca e membranas bem estruturadas, resultando em baixos valores no teste de condutividade elétrica pelo menor extravasamento de líquido celular.

O vigor envolve a biossíntese de energia e compostos metabólicos, tais como proteínas, ácidos nucleicos, carboidratos e lipídios, que são associadas a atividades que ocorrem nas células, de forma que, quando maior o teor de reservas de determinados compostos químicos nas sementes, maior será o vigor das plântulas originadas (HENNING et al., 2010).

Infravermelho com transformada de Fourier - FTIR

O espectrômetro óptico utilizado compreendeu uma faixa do infravermelho na região de 4000 cm^{-1} até 700 cm^{-1} . A partir do espectro gerado foi possível identificar os principais elementos químicos presentes nos lotes de cada cultivar (Figura 1), podendo ser atribuídos a lipídios, proteínas, carboidratos e moléculas de amina I e II (LARIOS et al., 2020).

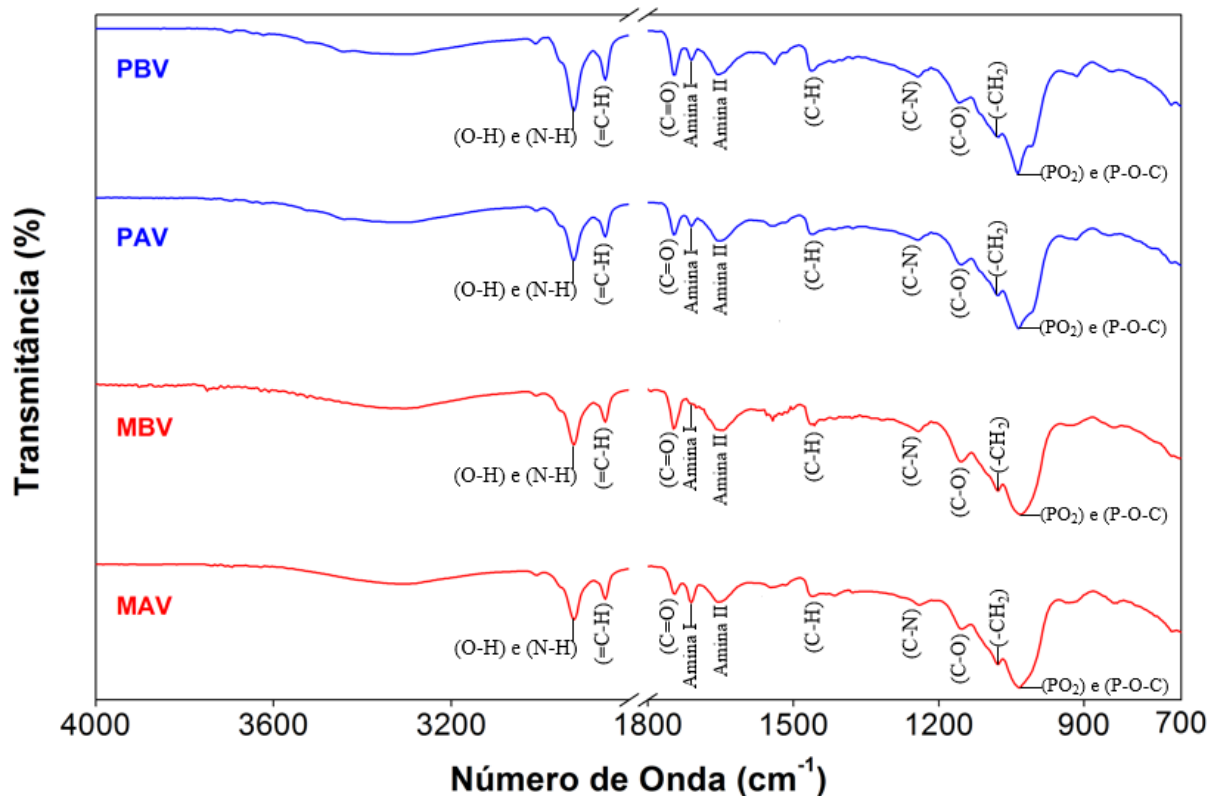


Figura 1. Espectros FTIR médios de sementes de *Brachiaria* cultivar Paiguás (Linha azul) e Marandu (Linha vermelha) de baixo vigor (PBV e MBV) e alto vigor (PAV e MAV).

Os espectros de FTIR evidenciaram a presença de fosfolipídios (PO₂ e P-O-C) na banda de 1043 cm⁻¹, ácidos graxos (-CH₂ e -C-O) na banda de 1158 cm⁻¹ e banda de alongamento C-N de proteínas (1253 cm⁻¹) (ALCÂNTARA et al., 2010; ANDRADE et al., 2020; LARIOS et al., 2020). Na banda correspondente ao intervalo de 1500 a 1800 cm⁻¹, observou-se a presença de ésteres lipídicos, na banda 1741 cm⁻¹ (C=O) (CAIRES et al., 2008; LIU et al., 2020), enquanto na banda de 1633 e 1540 cm⁻¹ (Amina I e Amina II), indicam a presença de proteínas (CAIRES et al., 2008; LARIOS et al., 2020). Na faixa compreendida em 3008 cm⁻¹, observou-se a banda de alongamento =C-H, relacionada a lipídios insaturados, enquanto a faixa de 2840 cm⁻¹ (O-H e N-H), pode ser associada a presença de ésteres de lipídios (CAIRES et al., 2008; LIU et al., 2020).

Após o tratamento dos dados por normalização (SNV), aplicou-se a análise de componentes principais (PCA) para os dados de FTIR (4000-700 cm⁻¹) de ambas cultivares (Marandu e Paiaguás), com a finalidade de revelar tendências na formação de grupos, ou seja, componentes que se encontram de forma heterogênea ao longo de cada eixo do PCA (Figura 2a e 2b). A partir de observações aos dados espectrais, foi possível verificar uma tendência de aglomeração na faixa espectral compreendida entre 1800 e 1600 cm⁻¹ para cultivar Marandu (Figura 2c), que não ocorreu para a cultivar Paiaguás (Figura 2d), evidenciando a necessidade de maiores investigações para essa cultivar.

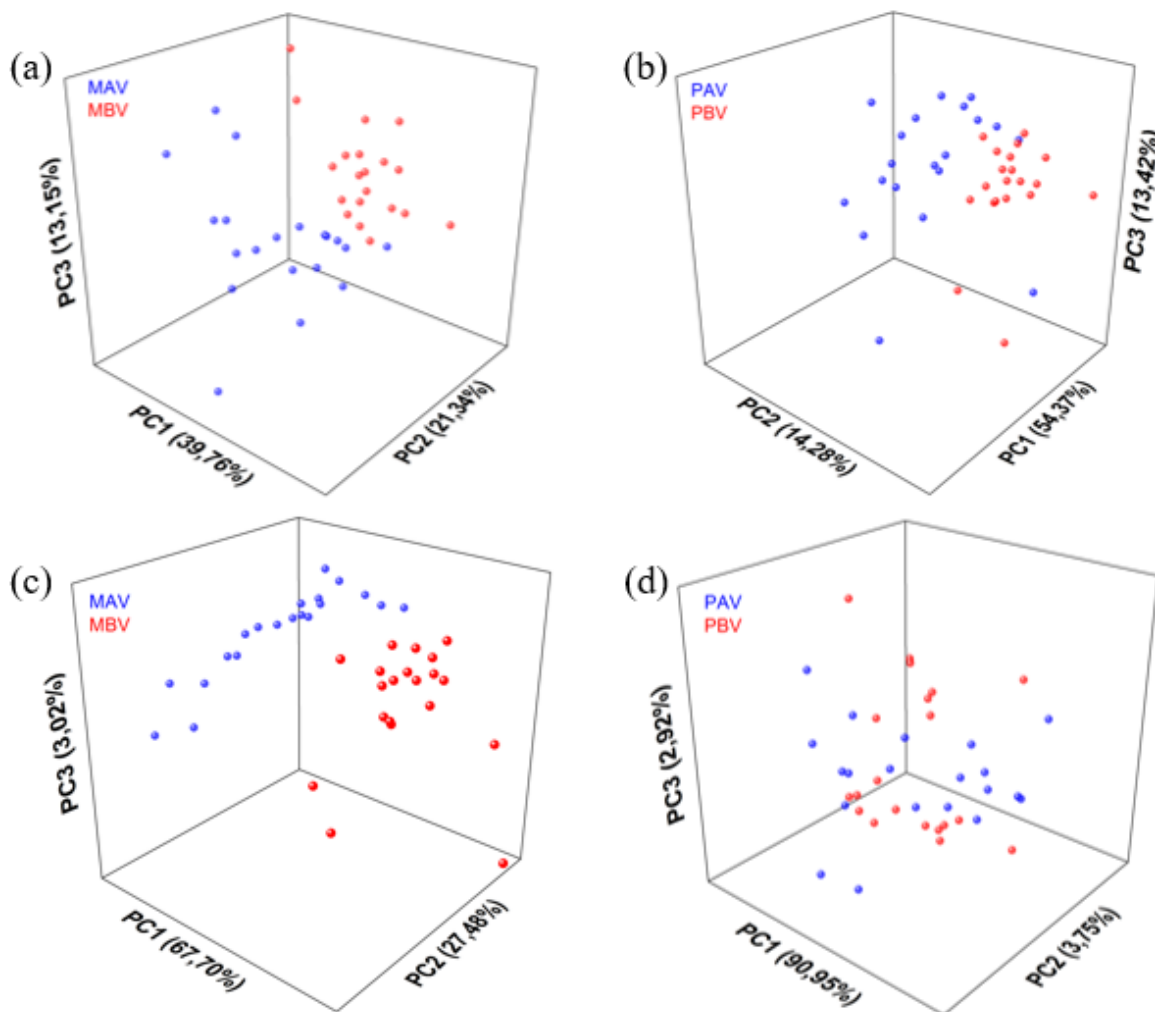


Figura 2. Plotagem de pontuações 4000 a 700 cm^{-1} (a) Marandu e (b) Paiaguás; 1800 a 1600 cm^{-1} (c) Marandu e (d) Paiaguás.

Na Figura 2c observou-se que ao diminuir a dimensionalidade dos dados para a banda de 1800 a 1600 cm^{-1} , os dois primeiros componentes principais (PC1+PC2) foram responsáveis por mais de 80% da variação em ambas as cultivares, indicando homogeneidade na separação dos componentes mais importantes. A região do espectro que varia entre 1800 e 1600 cm^{-1} está relacionada a lipídios, proteínas e moléculas de amina (CAIRES et al., 2008). A mobilização de reservas em embriões de sementes são as responsáveis pela germinação e formação de componentes estruturais durante o crescimento da plântula (HENNING et al., 2010).

Segundo Ziegler (1995), carboidratos, lipídios e proteínas que se encontram armazenados nas sementes influenciam o vigor das sementes e consequentemente, a velocidade de germinação, taxas de crescimento e produtividade. Assim, a presença de

proteínas e lipídios como observado neste trabalho pode estar relacionada ao ponto de separação entre sementes de alto e baixo vigor.

A partir dos dados obtidos por FTIR e pelos dados de dimensionalidade reduzida pela análise de componentes principais, aplicando-se métodos supervisionados, LDA, SVM e KNN. A precisão de cada método aplicado para cada cultivar pode ser observada na Figura 3.

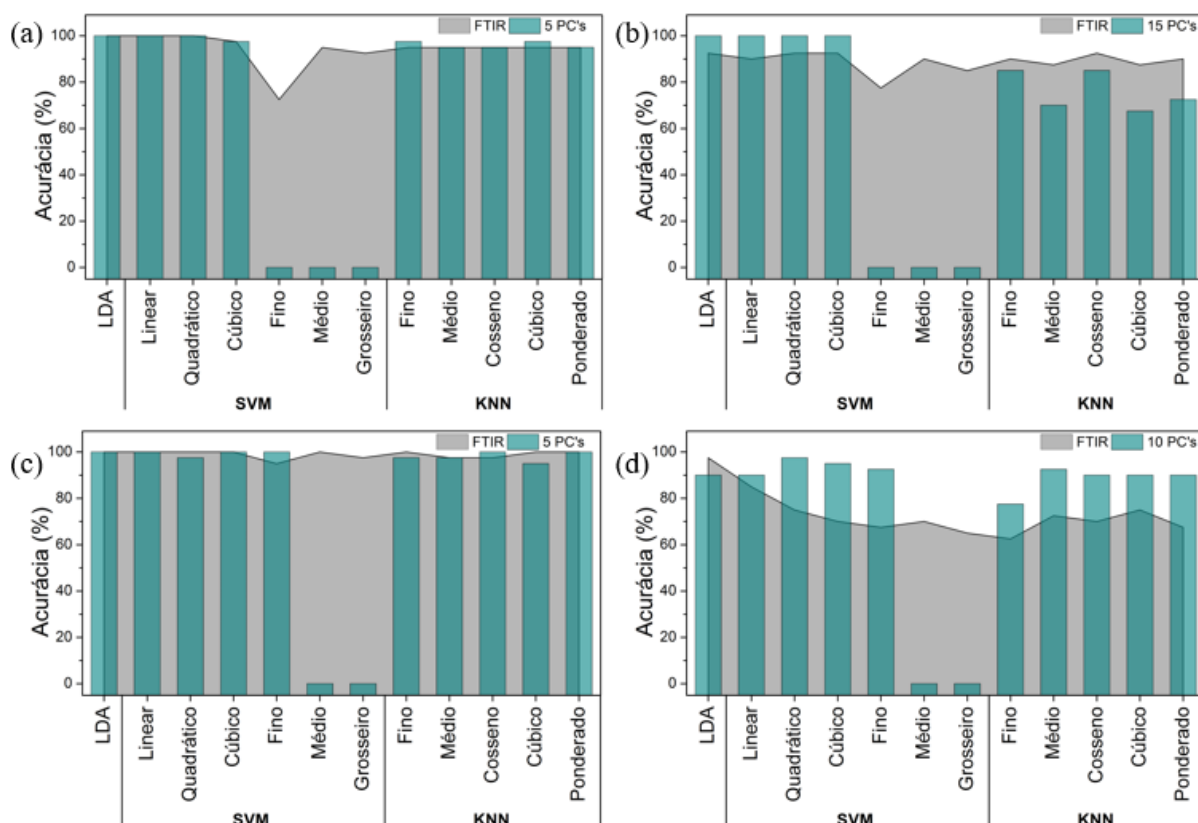


Figura 3. Precisão dos métodos de aprendizagem de máquina para distinguir lotes de alto e baixo vigor de sementes de *Brachiaria* nas faixas espectrais 4000 a 700 cm^{-1} (a) Marandu e (b) Paiaguás e 1800 a 1600 cm^{-1} (c) Marandu e (d) Paiaguás.

Os algoritmos utilizados para classificação apresentam diferentes configurações, no qual, comparam a acurácia de cada componente principal (PC) de maneira diferente. Os melhores resultados de classificação foram obtidos na faixa espectral de 1800 a 1600 cm^{-1} , pelo fato de o PCA apresentar as variáveis mais importantes. As barras verdes observadas na Figura 3 indicam a precisão alcançada quanto à análise de componentes principais (PCA) e é utilizado para traçar os dados espectrais, enquanto a área cinza indica a precisão calculada sem PCA. Essas informações são utilizadas para ensinar ao classificador o que é cada

amostra, sendo necessário testar os classificadores por meio da validação cruzada, tendo como resultado a matriz de confusão.

Na Figura 4 verifica-se as matrizes de confusão obtidas a partir do teste de validação cruzada, adotando a faixa de infravermelho de 2000 a 700 cm^{-1} , evidenciando a taxa de sucesso e a porcentagem de verdadeiros negativos e falsos positivos encontrados. Observou-se que foi possível classificar corretamente 100% dos lotes de alto e baixo vigor da cultivar Marandu pelo método LDA + 5 PC's, e da cultivar Paiaguás pelo método LDA + 15 PC's (Figura 4).

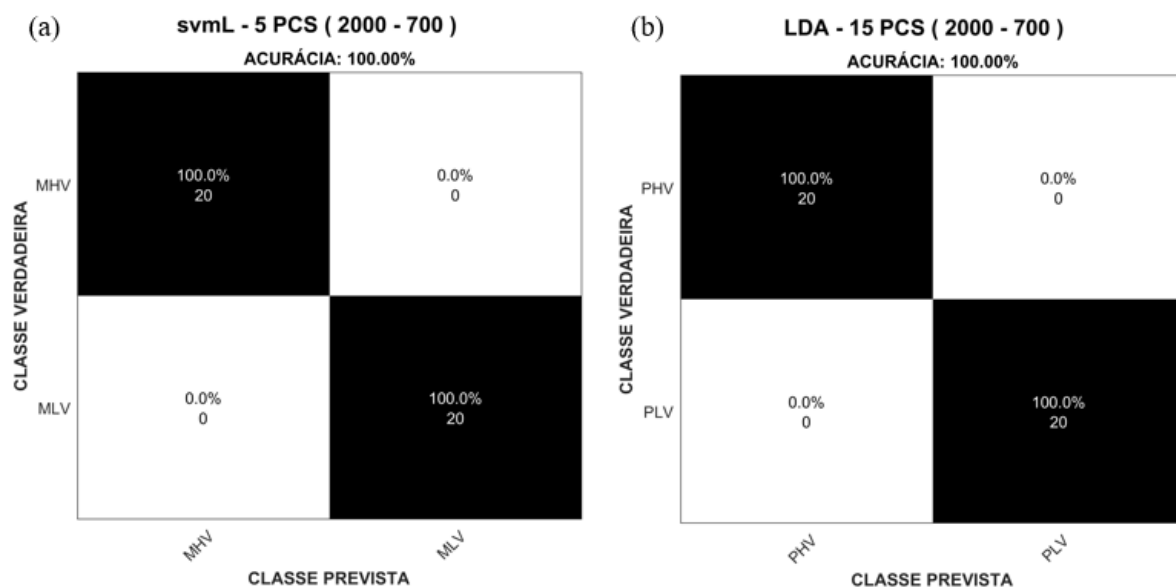


Figura 4. Matriz de confusão relacionada ao método LDA + PCA, com precisão de 100% para distinguir lotes de alto e baixo vigor da cultivar (a) Marandu e (b) Paiaguás.

A Tabela 2 apresenta os métodos de classificação LDA, KNN e SVN pra os intervalos espectrais estudados e a acurácia de cada método. Observou-se que os métodos apresentaram acurácia na validação externa acima de 90% para a cultivar Marandu e para cultivar Paiaguás os métodos apresentaram acurácia na validação externa maior que 80%, com exceção do método SVM Cúbico com 55% e do KNN Fino com 50% (Tabela 2).

Tabela 2. Acurácia apresentada pelos métodos LDA, KNN e SVN para classificação de sementes de *Brachiaria* cultivar Marandu e Paiaguás.

CULTIVAR MARANDU					
Intervalo (cm ⁻¹)	Dados	Matriz	Classificador	Acurácia (LOOCV)	Acurácia (ValExt)
4000-700	FTIR	40x6601	SVM Linear	100%	100%
3000-2800	FTIR	40x401	LDA	95%	95%
2000-700	FTIR	40x2601	LDA	100%	100%
1800-1600	FTIR	40x401	LDA	100%	100%
4000-700	PCA	40x39	LDA – 5 PC's	100%	100%
3000-2800	PCA	40x39	SVM Quadrático – 10 PC's	100%	100%
2000-700	PCA	40x39	SVM Linear – 5 PC's	100%	100%
1800-1600	PCA	40x39	LDA – 5 PC's	100%	100%
CULTIVAR PAIAGUÁS					
4000-700	FTIR	40x6601	KNN Fino	90%	50%
3000-2800	FTIR	40x401	SVM Linear	95%	95%
2000-700	FTIR	40x2601	LDA	100%	100%
1800-1600	FTIR	40x401	SVM Cúbico	70%	55%
4000-700	PCA	40x39	LDA – 15 PC's	100%	100%
3000-2800	PCA	40x39	LDA – 10 PC's	100%	100%
2000-700	PCA	40x39	LDA – 15 PC's	100%	100%
1800-1600	PCA	40x39	SVM Quadrático – 10 PC's	97,5%	80%

A identificação dos elementos e grupos químicos presentes nas sementes das cultivares de *Brachiaria* permitiram a observação das similaridades entre os lotes, assim como a faixa espectral responsável pela distinção entre lotes de alto e baixo vigor. O intervalo espectral de 1800 a 1600 cm⁻¹ pode estar associado a presença de proteínas e lipídios, compostos metabólicos que diferem sementes de alto e baixo vigor, por serem responsáveis pela força motriz que impulsiona a semente a germinar rapidamente, utilizar suas reservas e originar plântulas de maneira rápida e uniforme (ZIEGLER, 1995; HENNING et al., 2010).

O desenvolvimento de novos conhecimentos e tecnologias inovadoras para otimizar a tomada de decisão em relação aos lotes de sementes apresenta grande importância, principalmente pela possibilidade da análise de macro e micronutrientes, com a aquisição rápida de informações. A crescente demanda por informações multi-elementares evidencia a necessidade de técnicas sensíveis, capazes de detectar os principais elementos presentes e seus traços com boa precisão e exatidão (SEZER et al., 2017).

O uso de espectroscopia FTIR associada a ferramentas quimiométricas discriminou lotes de alto e baixo vigor de sementes de *B. brizantha*, tanto para a cultivar Marandu, quanto para a cultivar Paiaguás. A faixa espectral compreendida entre 1800 a 1600 cm^{-1} , pode estar associada as principais moléculas responsáveis pela discriminação, sendo elas proteínas, lipídios e aminas, que são moléculas responsáveis pela distinção entre sementes de alto e baixo vigor. Essas informações são de suma importância para a avaliação do vigor de sementes de *Brachiaria*, já que a classificação em alto e baixo vigor foi realizada com precisão e em um tempo muito menor que os testes padrões de laboratório.

CONCLUSÃO

O método de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) associado a métodos quimiométricos foi eficiente na diferenciação de lotes de alto e baixo vigor de sementes de *Brachiaria brizantha* na faixa espectral compreendida entre 1800 a 1600 cm^{-1} , associada a presença de proteínas e lipídios. O método de aprendizagem de máquina linear discrimination analysis (LDA) foi 100% preciso na distinção de sementes de alto e baixo vigor de *Brachiaria brizantha*. Recomenda-se o uso de espectroscopia FTIR associado a métodos quimiométricos e análise multivariada para avaliação do vigor de sementes de *Brachiaria brizantha*.

REFERÊNCIAS

ALCANTARA, G. B. et al. Assessment of genetically modified soybean crops and different cultivars by Fourier transform infrared spectroscopy and chemometric analysis, **Orbital – The Electronic Journal of Chemical**, v. 2, n. 1, p. 41-52, 2010.

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

BASNET, P. et al. Investigation of tissue level distribution of functional groups and associates trace metals in rice seeds (*Oryza sativa* L.) using FTIR and LA-ICP-MS. **Microchemical Journal**, v. 127, n. 1, p. 152-159, 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**, Brasília, 2009. 395 p.

CAIRES, A. R. L. et al. Discrimination of transgenic and conventional soybean seeds by Fourier transform infrared photoacoustic spectroscopy. **Applied Spectroscopy**, v. 62, p. 1044-1047, 2008.

DIETTERICH, T. C. **Ensemble methods in machine learning, multiple classifier systems**. Lecture Notes in Computer Science, vol. 1857, Springer, Berlin, Heidelberg, 2000, pp. 1-15.

FRANÇA-NETO, J. B. et al. **Tecnologia da produção de sementes de soja de alta qualidade**. Londrina: Embrapa Soja, 2016. 82 p.

GREDILLA, A. et al. Non-destructive spectroscopy combined with chemometrics as a tool for green chemical analysis of environmental samples: A review. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 76, n. 1, p. 30-39, 2016.

GUARDIA, M.; GARRIGUES, S. **Handbook of mineral elements in food**. 1. ed. Oxford, UK: Wiley Blackwell. 2015. 749 p.

HENNING, F. A. et al. Composição química e mobilização de reservas em sementes de soja de alto e baixo vigor. **Bragantia**, Campinas, v. 69, n. 3, p. 727-734, 2010.

HOFFMANN, A. et al. Produção de bovinos de corte no sistema de pasto-suplemento no período da seca. **Nativa**, Sinop, v. 2, n. 2, p. 119-130, 2014.

KANNO; Y.; KANEKO, H. Improvement of predictive accuracy in semi-supervised regression analysis by selecting unlabeled chemical structures. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 191, n. 1, p. 82-87, 2019.

KRZYŻANOWSKI, F. C. et al. **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Associação Brasileira de Tecnologia de Sementes, Comitê de Vigor de Sementes, Londrina: ABRATES, 1999. p.218.

LARIOS, G. S. et al. Soybean seed vigor discrimination by infrared spectroscopy and machine learning algorithms. **Analytical Methods**, v. 12, n. 1, p. 4303-4309, 2020.

LEI, W. Q. et al. Comparative measurements of mineral elements in milk powders with laser-induced breakdown spectroscopy and inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 400, n. 10, p. 3303-3313, 2011.

LIU, H. et al. FT-IR and Raman spectroscopy data fusion with chemometrics for simultaneous determination of chemical quality indices of edible oils during thermal oxidation. **LWT - Food Science and Technology**, v. 119, n. 1, p. 108906, 2020.

MÂCEDO, A. J. S. et al. Adubação orgânica em pastagens tropicais: Revisão. **Revista Eletrônica de Veterinária**, Garça, v. 19, n. 3, p. 1-19, 2018.

MARCOS-FILHO, J. Importância do potencial fisiológico da semente de soja. **Informativo Abrates**, Londrina, v. 23, n. 1, p. 21-24, 2013.

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

ROSSI, R. F.; CAVARIANI, C.; FRANÇA-NETO, J. B. Vigor de sementes, população de plantas e desempenho agrônomo de soja. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 60, n. 3, p. 215-222, 2017.

SEZER, B.; BILGE, G.; BOYACI, I. H. Capabilities and limitations of LIBS in food analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 97, n. 1, p. 345-353, 2017.

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

ZIEGLER, P. Carbohydrate degradation during germination. In: KIGEL, J.; GALILI, G. **Seed development and germination**. New York: Marcel Dekker, 1995. P. 447-474.