



GABRIEL CASTANHEIRA GUIMARÃES

**ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO
PRÓXIMO PARA CLASSIFICAÇÃO DE
SEMENTES DE CAFÉ QUANTO À QUALIDADE,
ORIGEM E CULTIVAR**

LAVRAS – MG

2016

GABRIEL CASTANHEIRA GUIMARÃES

**ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO PARA
CLASSIFICAÇÃO DE SEMENTES DE CAFÉ QUANTO À
QUALIDADE, ORIGEM E CULTIVAR**

Tese 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 Doutor.

Dra. Sttela Dellyzete Veiga Franco da Rosa
Orientadora

Dr. Cleiton Antônio Nunes
Coorientador

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).**

Guimarães, Gabriel Castanheira.

Espectroscopia no infravermelho próximo para classificação de
sementes de café quanto à qualidade, origem e cultivar / Gabriel
Castanheira Guimarães. – Lavras: UFLA, 2016.

75 p.: il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2016.

Orientador (a): Sttela Dellyzete Veiga Franco da Rosa.

Bibliografia.

1. Quimiometria. 2. Espectro. 3. Microssatélite. I. Universidade
Federal de Lavras. II. Título.

GABRIEL CASTANHEIRA GUIMARÃES

**ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO PARA
CLASSIFICAÇÃO DE SEMENTES DE CAFÉ QUANTO À
QUALIDADE, ORIGEM E CULTIVAR**

Tese 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 Doutor.

APROVADA em 20 de julho de 2016.

Dr. Cleiton Antônio Nunes

UFLA

Dra. Milene Alves de Figueiredo Carvalho

EMBRAPA

Dr. Antônio Rodrigues Vieira

EPAMIG

Dr. Marcelo Ribeiro Malta

EPAMIG

Dra. Sttela Dellyzete Veiga Franco da Rosa

Orientadora

LAVRAS – MG

2016

*Aos meus pais, Renato e Heloisa, por sempre me guiarem na direção certa
com amor e compreensão.*

Aos meus irmãos, Nilson César e Renata pela força e companheirismo.

*A minha esposa Marina, por estar sempre ao meu lado, apoiando-me em
todos os momentos.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo o que acontece em minha vida.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Agricultura, por possibilitar a realização do doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela concessão da Bolsa de estudos.

À pesquisadora Sttela Dellyzete Veiga Franco da Rosa, pela orientação, pela confiança, pelos ensinamentos, paciência e por sempre acreditar em minha capacidade, incentivando-me.

Aos professores e pesquisadores do setor de sementes, João Almir Oliveira, Maria Laene Moreira de Carvalho, Antônio Rodrigues Vieira e Édila Vilela de Rezende Von Pinho, pelos ensinamentos, contribuições e amizade.

Aos funcionários do Laboratório Central de Sementes, pela disponibilidade e atenção durante a realização dos experimentos.

Aos bolsistas e a todos os estudantes de iniciação científica e estagiários pelo companheirismo e ajuda nos experimentos.

Aos amigos, pelos conselhos, carinho e por proporcionarem muitos momentos inesquecíveis.

A Marli, secretária do Programa de Pós em Fitotecnia, pelo auxílio nessa caminhada.

MUITO OBRIGADO!

RESUMO

É indiscutível a importância da cultura cafeeira para o nosso país, pela sua participação expressiva no contexto socioeconômico, gerando renda pela exportação e empregando mão de obra nas diferentes etapas do agronegócio, desde o cultivo até a comercialização. Um problema na produção de sementes é que a propagação das plantas ainda é feita por mudas originadas a partir da sementeira de sementes. Um grande empecilho desse método é que as sementes de café têm germinação lenta e desuniforme, além de baixo potencial de armazenamento. Outro problema é a caracterização de uma semente em relação ao seu cultivar, porque o método convencional requer muito tempo e conhecimento técnico sobre as estruturas da planta. A espectroscopia é o processo instrumental de medição baseado nas propriedades de absorção e emissão de energia eletromagnética em alguma região do espectro eletromagnético. Neste trabalho, foram utilizadas 200 sementes de 4 cultivares distintas oriundas de 3 diferentes regiões. Em uma segunda etapa, foram utilizados 9 lotes de sementes de café, 3 de alta qualidade, acima de 90% de germinação, 3 de média, com 60 a 90% de germinação e 3 lotes de baixa qualidade com germinação abaixo de 60%. Posteriormente, essas sementes foram submetidas à análise, por meio do infravermelho próximo com as faces planas voltadas para a fonte da onda eletromagnética e os espectros obtidos foram analisados com ajuda de métodos quimiométricos, para a classificação das diferentes cultivares e também foi realizado um estudo do genoma com marcadores de microssatélites. Assim, o objetivo, com este trabalho, foi utilizar a espectroscopia de infravermelho próximo e o estabelecimento de modelos quimiométricos para a estimativa do potencial germinativo e da pureza genética das sementes de café, a partir da comparação entre testes convencionais. Concluiu-se que é possível obter uma metodologia que seja viável em termos práticos e técnicos, para prever o potencial germinativo e a procedência das sementes de café, entretanto, essa metodologia não é eficiente para prever a pureza genética das sementes de café.

Palavras-Chave: Quimiometria; Espectro; Microssatélite.

ABSTRACT

There is no doubt about the importance of the coffee culture for our country, for its significant participation in the socio-economic context, creating income by exports and employing labor in the different stages of agribusiness, from cultivation to marketing. One problem in production is that the propagation of plants by cuttings made and still originated from sowing seeds. A major drawback of this method is that the coffee beans have slow and uneven germination, and low storage potential. Another problem is the characterization of a seed in relation to its cultivar because the conventional method requires much time and expertise on the seedling structures. Spectroscopy is the instrumental measurement process based on the properties of absorption and emission of electromagnetic energy in some region of the electromagnetic spectrum. In this study, we used 200 seeds of 4 different cultivars derived from three different regions. In a second step, we used 9 batches of coffee beans, 3 of high quality, with germination above 90%, 3 of medium quality, with germination between 60 and 90% and 3 batches of low quality with germination lower than 60%. Later these seeds were subjected to analysis by near infrared with the flat sides facing the source of the electromagnetic wave and the spectra obtained were analyzed with the help of chemometric methods for classification of different cultivars. A genome study with microsatellite markers was also performed. Thus, it is necessary to use the NIR and the establishment of chemometric models to predict the germination potential and the genetic purity of coffee beans, from the comparison between the conventional tests. Thus, it is possible to obtain a methodology that is viable in economic, practical and technical terms, to predict the germination potential and the origin of the coffee seeds, but is not effective to predict the genetic purity of coffee seeds.

Keywords: Chemometrics; Spectrum; Quality; SSR.

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 - Revisão geral.....	10
1	INTRODUÇÃO.....	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
2.1	Sementes de Café.....	13
2.1.1	Germinação de sementes de café.....	13
2.1.2	Testes para avaliação da qualidade de sementes de café.....	15
2.2	Identificação de cultivares de café.....	16
2.2.1	Características morfológicas.....	16
2.2.2	Regiões de origem.....	18
2.2.3	Identificação de cultivares de café por microssatélite.....	19
2.3	Espectroscopia de infravermelho.....	19
2.3.1	Técnica de infravermelho.....	19
2.3.2	Espectroscopia de infravermelho próximo.....	20
2.3.3	Métodos quimiométricos.....	22
	REFERÊNCIAS.....	25
	CAPÍTULO 2 – Classificação de cultivares de café por meio de espectrometria de infravermelho próximo.....	34
1	INTRODUÇÃO.....	37
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	39
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
4	CONCLUSÕES.....	58
	REFERÊNCIAS.....	58
	CAPÍTULO 3- Uso do infravermelho próximo para estimativa do potencial de germinação de sementes de café.....	61
1	INTRODUÇÃO.....	64
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	65
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	66
4	CONCLUSÃO.....	74
	REFERÊNCIAS.....	75

CAPÍTULO 1- Revisão Geral

1. INTRODUÇÃO

A cultura do cafeeiro é uma das atividades agrícolas mais importantes do Brasil. Além da participação histórica e significativa de parcela das receitas com exportação, tem importância social muito destacada, porque gera empregos em grande quantidade nas regiões polos de produção.

O Brasil é o maior produtor de café do mundo e a manutenção dessa posição de destaque requer frequentes expansões nas áreas de produção, bem como constante renovação das lavouras. Para isso, grande parte da formação de mudas para os cafezais tipo canéfora e a quase totalidade para os cafezais tipo arábica são oriundas de sementes. Nesse contexto, a produção de sementes de café de alta qualidade tem importância limitante para a formação de mudas saudáveis vigorosas e uniformes, atributos indispensáveis para a implantação de lavouras com estandes completos, plantas uniformes e produtivas.

As sementes de café, por terem caráter intermediário em relação a recalcitrância e também de longevidade curta, o que praticamente impede o armazenamento para utilização em ciclo de plantio subsequente, devem ser produzidas e utilizadas em curto período de tempo, de 3 a 4 meses. Entretanto, para que o produtor das mudas tenha segurança em investir na construção de um bom viveiro, é necessário que tenha certeza da qualidade física, fisiológica, genética e sanitária das sementes que vai utilizar. O uso de sementes de qualidade desconhecida pode acarretar no surgimento de mudas infectadas e desuniformes quanto à emergência e quanto à pureza genética e, por isso, causar grandes perdas financeiras.

É nesse sentido que a análise de sementes assume fundamental importância na cafeicultura e os analistas enfrentam dificuldades para responder às necessidades dos viveiristas, principalmente quando precisam informar dois atributos de qualidade das sementes de café, que são germinação e pureza genética. A germinação, no teste de germinação, deve ser avaliada, com 30 dias

segundo as prescrições das Regras para Análise de Sementes do Ministério de Agricultura e a pureza genética só é possível com rastreabilidade da origem das sementes, o que não está disponível no atual controle de produção. Essas dificuldades obrigam adoção de exceções no controle de qualidade de sementes de café, que são o teste de tetrazólio para a verificação da viabilidade das sementes e a declaração de pureza genética de lavouras matrizes pelos responsáveis técnicos pelos campos de produção.

O teste de tetrazólio bem como a declaração de pureza genética têm limitações inerentes à execução do primeiro e incertezas do segundo, por isso, várias pesquisas têm sido realizadas no sentido de garantir essas informações de forma segura e rápida.

A técnica de espectrometria no infravermelho próximo (NIR) tem potencial para ser empregada na solução dos dois problemas, ou seja, pode fornecer informações sobre a viabilidade das sementes e sobre a pureza genética da amostra. A análise espectral de amostras por NIR gera informações específicas bem características de cada conjunto de sementes.

Assim, utilizando-se de amostras com viabilidades conhecidas e determinadas com precisão por métodos convencionas e também de amostras de cultivares de interesse com pureza genética comprovada, seja por comparação de amostra de sementes dessas lavouras com amostras fornecidas pelos detentores das cultivares ou por meio de técnicas de análises do DNA, particularmente a identificação por microssatélites, pode-se criar banco de espectros que servirão de base para identificação dessas qualidades de forma rápida e segura.

No presente trabalho, o objetivo foi avaliar o uso da técnica de espectrometria de infravermelho próximo, para a determinação da viabilidade e da identidade genética de sementes de café.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Sementes de café

2.1.1. Germinação de sementes de café

Em tecnologia de sementes, a germinação é definida como a emergência e o desenvolvimento da plântula, a partir do embrião, sustentado pelas estruturas essenciais. Para o café, todas essas estruturas podem ser indicativos da capacidade da semente em produzir uma planta normal, sob condições favoráveis (ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS - AOSA, 1998).

Segundo Marcos Filho (2005), as seguintes fases poderiam ser descritas durante o processo de germinação de sementes: reidratação, aumento da respiração, formação de enzimas, digestão enzimática de reservas, mobilização e transporte de reservas, assimilação metabólica e crescimento e diferenciação dos tecidos.

Esse processo inicia-se pela absorção de água das sementes e termina com o alongamento do eixo embrionário, normalmente a radícula (BEWLEY; BLACK, 1994). Para a protrusão radicular acontecer, a força do embrião deve ser maior que a resistência mecânica das camadas exteriores de tecidos. Nas espécies em que o endosperma tem uma grande força de retenção, tem sido mostrado que um enfraquecimento por uma degradação hídrica nas paredes celulares vai facilitar a radícula a superar a força do endosperma (BEWLEY, 1997).

A lenta germinação de sementes de café (*Coffea arabica* L.) permanece não esclarecida, embora seja evidenciada em estudos sobre aspectos fisiológicos dessa espécie. Não se sabe ainda a verdadeira causa dessa lenta germinação, embora várias causas sejam apontadas, tais como a influência do endocarpo (pergaminho) (GUIMARÃES, 1995; RENA; MAESTRI, 1986; ROSA et al., 2007b; VÁLIO, 1976), a baixa absorção de água e O₂ (BENDAÑA, 1962;

VÁLIO, 1980), o balanço hormonal (SILVA et al., 2004; VÁLIO, 1976) e a presença de inibidores naturais (FRIEDMAN; WALLER, 1983a, 1983b; PEREIRA et al., 2002; ROSA et al., 2006, 2007a; WALLER et al., 1986).

Outro fator que influencia bastante na germinação é a temperatura, e a faixa ótima para a germinação de sementes de café é 25/35°C. Temperaturas acima de 35°C são prejudiciais, podendo até impedir o processo (BAUMANN; GABRIEL, 1984). Para a realização do teste de germinação em laboratório, recomenda-se a temperatura de 30°C, sendo necessários, aproximadamente, 30 dias para a obtenção do resultado. Em virtude do tempo exigido para realização desse teste, alguns inconvenientes como a predisposição ao ataque de patógenos, alterações do substrato e condições de umidade são passíveis de ocorrer dificultando, muitas vezes, a interpretação dos resultados, levando a dúvidas com relação ao verdadeiro estado fisiológico dessa semente (DIAS; SILVA, 1986).

Silva (2002), estudando o mecanismo e a regulação da germinação de sementes de café, verificou que a protrusão da radícula sob condições ideais (30°C, no escuro), inicia em torno do quinto dia de embebição e que, no décimo dia de embebição, 50% das sementes já apresentam protrusão radicular e, no décimo quinto dia, a maioria das sementes germinam. Na germinação, os polissacarídeos (galacto-mananas) são degradados pela ação de enzimas, como endo- β -mananase, β -manosidase e galactosidase, resultando no enfraquecimento das paredes celulares do endosperma. O mesmo autor sugere que o processo de germinação de sementes de café segue um padrão bifásico. A primeira fase ocorre durante os primeiros cinco dias de embebição e inclui a hidratação completa da semente (até terceiro dia) e a segunda fase estende do quinto dia até a protrusão da radícula (décimo dia).

O conhecimento sobre a germinação de café é de extrema importância, para que possamos melhor entender seu desenvolvimento e suas peculiaridades.

2.1.2. Testes para avaliação da qualidade de sementes de café

A avaliação da qualidade fisiológica de sementes durante as etapas do processo produtivo é de fundamental importância e envolve testes de germinação e de vigor. O teste de germinação e a emissão de boletim de análise são atividades obrigatórias no Sistema Nacional de Produção de Sementes e Mudas (SNSM). No caso das sementes de café, as Regras para Análises de Sementes (RAS) estabelecem um período de 30 dias para a realização do teste de germinação, obtenção do resultado e a emissão do boletim de análise, sendo este necessário à comercialização das sementes aos produtores de mudas.

No entanto, esse período de 30 dias é considerado longo, tendo em vista que as sementes de café apresentam lenta germinação e a produção das mudas também é lenta, demandando um período mínimo de seis meses para a obtenção das mudas prontas para o plantio (ROSA et. al., 2010).

Testes que possam reduzir o tempo de avaliação do potencial fisiológico das sementes de café podem permitir a tomada de decisões antecipadas, durante as operações de colheita, recepção, beneficiamento, comercialização e formação de mudas, diminuindo riscos e prejuízos.

Uma alternativa para rápida determinação da viabilidade de sementes de café é o teste de tetrazólio, com obtenção de resultados em aproximadamente 48 horas, sendo que as sementes ficarão embebidas por 18 horas, quando os embriões serão removidos e colocados na solução de tetrazólio por 28 horas (CLEMENTE; CARVALHO; GUIMARÃES, 2012; DIAS; SILVA, 1986; VIEIRA et al., 1998). A utilização do teste de tetrazólio é autorizada pelo Ministério da Agricultura, no entanto, são observadas algumas limitações para a sua utilização. Uma delas é o procedimento de avaliação do teste que exige um treinamento especial do analista sobre as estruturas embrionárias da semente e

técnicas de interpretação do teste. Além disso, os resultados são estimativas do potencial germinativo da semente, e pode superestimar o valor germinativo do lote, por isso é considerado um teste complementar ao teste de germinação.

Com a mesma ideia de redução do tempo do teste de germinação pode-se obter essa informação, estudando estágios precoces das plântulas de café. Passados 16 dias após a semeadura, avaliando os estágios descritos por Rosa et al. (2010), no estágio S1 aos 16 dias já é possível obter resultados iguais aos dos testes de germinação descritos por Guimarães et al. (2013).

Outro teste alternativo para se obter a viabilidade de um lote de sementes de café é o teste feito por meio da análise dos exsudados das sementes. Considerando que o estudo dos exsudados se baseia na permeabilidade do sistema de membranas, esse teste é considerado uma alternativa promissora para a rápida avaliação das sementes de café. Para a realização do teste, as sementes são embebidas por 10 minutos para a retirada da película prateada e, em seguida, colocadas sobre papel toalha umedecido, disposto sobre uma tela de alumínio dentro de uma caixa tipo gerbox. Após 24 horas, é possível analisar a cor dos exsudatos e obter indicativos da viabilidade das sementes (HILST et al., 2012).

A redução do tempo do teste de germinação racionaliza os equipamentos, instalações e o trabalho pessoal nos laboratórios. No caso de sementes de café, é importante, particularmente, tendo em vista a lenta germinação das sementes, o que leva ao conseqüente atraso, para a comercialização das sementes e produção das mudas.

2.2 Identificação de cultivares de café

2.2.1 Características morfológicas

O gênero *Coffea* é representado por 103 espécies (DAVIS et al., 2006) sendo, *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* Pierre as de maior importância

econômica. A espécie *Coffea arabica* L., destacada, nesta pesquisa, é a mais comercializada mundialmente, em decorrência da sua superioridade na qualidade de bebida (NEBESNY; BUDRYN, 2006; SONDAHL; LAURITIS, 1992). No Brasil, a produção de café arábica em 2015 foi de 43,24 milhões de sacas, correspondendo a 74,1 % da produção brasileira (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2015).

Segundo Setotaw et al. (2013), as cultivares de *C. arabica* no Brasil foram obtidas a partir de poucos genitores o que causou uma baixa variabilidade entre as mesmas. Essa baixa variabilidade dificulta a distinção das cultivares que deve ser estabelecida por meio de distâncias mínimas dos caracteres que as diferenciam. Isso, normalmente, é fornecido por descritores morfológicos e fisiológicos, como tipo de fruto, formato de folha, altura da planta, resistência a enfermidades, cor da flor, etc (CAIXETA et al., 2007). A diferenciação de genótipos por meio dos descritores morfológicos pode, muitas vezes, apresentar dificuldades, em razão do número limitado e à interferência do ambiente na expressão destes. Essas dificuldades tendem a aumentar, na medida em que as cultivares de uma mesma espécie são geneticamente aparentadas e, portanto, fenotipicamente semelhantes. Como resultado, as distâncias mínimas necessárias para se estabelecer uma distinção entre elas são cada vez menores.

Observando a origem das cultivares estudadas Catuaí Vermelho IAC 144; Catuaí Vermelho IAC 99; Mundo Novo 376/4 e Catucaí Amarelo 2SL é possível confirmar como a base genética é estreita. A cultivar Catuaí Vermelho originou-se da recombinação de um cruzamento entre cafeeiros das cultivares Caturra Amarelo, IAC 476-11 e Mundo Novo IAC 374-19. Essa cultivar tem como características a susceptibilidade à ferrugem e aos nematoides, além do porte entre 2,0m a 2,4m e as inflorescências em número de 3 a 5 por axila foliar. Já, a cultivar Catucaí Amarelo é oriunda do aproveitamento do cruzamento natural das cultivares Icatu e Catuaí. Tem como características a resistência

moderada a ferrugem, porte baixo a médio e crescimento vegetativo vigoroso. Em relação a cultivar Mundo Novo sua origem corresponde a recombinação de um cruzamento natural das cultivares Sumatra e Bourbon Vermelho. As principais características são a susceptibilidade a ferrugem, o porte alto, com média de 3,4m e os ramos secundários são abundantes (CARVALHO, 2008).

A distinção de cultivares, realizada por características morfológicas, apresenta como desvantagem a necessidade de um grande número de descritores que são identificados em plantas inteiras ou adultas, sendo necessário mais tempo e recursos financeiro. Além disso, marcadores morfológicos podem ser influenciados pelo ambiente (PADILHA et al., 2002), são complexos na sua expressão (LOMBARD et al., 1999), podem ser modulados pelo efeito de um determinado patógeno, e fase fenológica da planta (NARVÁEZ et al., 2001).

2.2.2 Regiões de origem

A região Sudeste destaca-se dentre as demais regiões brasileiras graças a produtividade alcançada pelo estado de Minas Gerais, o maior produtor nacional responsável por grande parte da produção. Em razão disso, boa parte do desempenho nacional depende dos resultados alcançados por esse estado, sobretudo pela região sul.

As cultivares utilizadas neste trabalho foram obtidas de três diferentes cidades, Santo Antônio do Amparo, Três Pontas e Patrocínio. As sementes foram fornecidas por produtores inscritos no sistema oficial da produção de semente.

Essas três cidades estão em duas diferentes regiões do estado de Minas Gerais com características distintas, o que pode acarretar em sementes com composição diferente em cada região.

O município de Patrocínio está localizado em uma região de clima subquente, com médias térmicas variando de 19°C a 27°C e pluviosidade média em torno de 1500 mm/ano (SILVA; MALVINO, 2005).

O clima de Três Pontas e Santo Antônio do Amparo é úmido, com pequena deficiência de água, denominado mesotérmico, com uma evapotranspiração de 899 mm no ano, sendo que 31% dessa evapotranspiração ocorre no verão (DANTAS; CARVALHO; FERREIRA, 2007).

2.2.3 Identificação de cultivares de café por microssatélite

Como as cultivares de café têm baixa variabilidade genética e a descrição por características morfológicas demanda tempo, com isso há espaço para pesquisa genética no café. A técnica conhecida como *Simple Sequence Repeats* (SSRs), ou marcadores de microssatélite, é útil na identificação de cultivares dessa espécie, pois explora regiões do genoma com alta variabilidade entre indivíduos ou populações da mesma espécie.

Esse tipo de marcador, facilita a análise de variações presentes no DNA e pode ser usado para a identificação de variedades. Além disso, são independentes das variações ambientais e podem ser detectados em qualquer tecido da planta (ARENS et al., 1995; FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Usando marcadores desenvolvidos para *C. arabica*, Moncada e McCouth (2004) mostraram a importância do SSR na distinção de variedades próximas de café. O número de marcadores de microssatélites para café disponíveis no mercado continua limitado. Apenas 224 marcadores genômicos de SSR foram descritos para espécies do gênero do café (HENDRE et al., 2008). *Coffea arabica* é de extrema importância e existe uma certa urgência para a descrição de novos marcadores, para facilitar a identificação de cultivares próximas (VIEIRA et al., 2010).

2.3 Espectroscopia de infravermelho

2.3.1 Técnica de infravermelho

A espectroscopia é um processo de medição baseado na absorção e emissão de energia eletromagnética em alguma região do espectro eletromagnético.

A região do espectro eletromagnético conhecida como a região da radiação infravermelha, compreendida entre os comprimentos de onda de 700 a 1×10^6 , por sua vez é dividida em 3 diferentes regiões: infravermelho próximo que corresponde a 700 a 2500 nanômetros, médio a 2500 a 10000nm e infravermelho distante a 10000 a 1×10^6 . Cada região tem a sua importância, sendo a região do infravermelho médio a de maior importância para os químicos pois tem as bandas fundamentais. Já, o infravermelho próximo e distante, juntamente com técnicas de análises multivariadas apresentam várias aplicações tanto quantitativas quanto qualitativas (PASQUINI, 2003; REICH 2005; ROGGO et al., 2007).

A grande vantagem das análises utilizando a radiação infravermelha é que podem ser usadas para avaliar amostras em qualquer estado e, na maioria das vezes, não é necessário grande preparo da amostra, fazendo dela uma técnica rápida e não destrutiva.

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

2.3.2 Espectroscopia de infravermelho próximo

No setor de sementes, há a necessidade de se buscar metodologias que aprimorem aquelas utilizadas rotineiramente em outras áreas, em razão da necessidade de utilização de técnicas rápidas para detectar alterações na

qualidade. A detecção de componentes químicos pela espectroscopia de infravermelho próximo (*Near Infrared-NIR*) é uma alternativa possível.

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

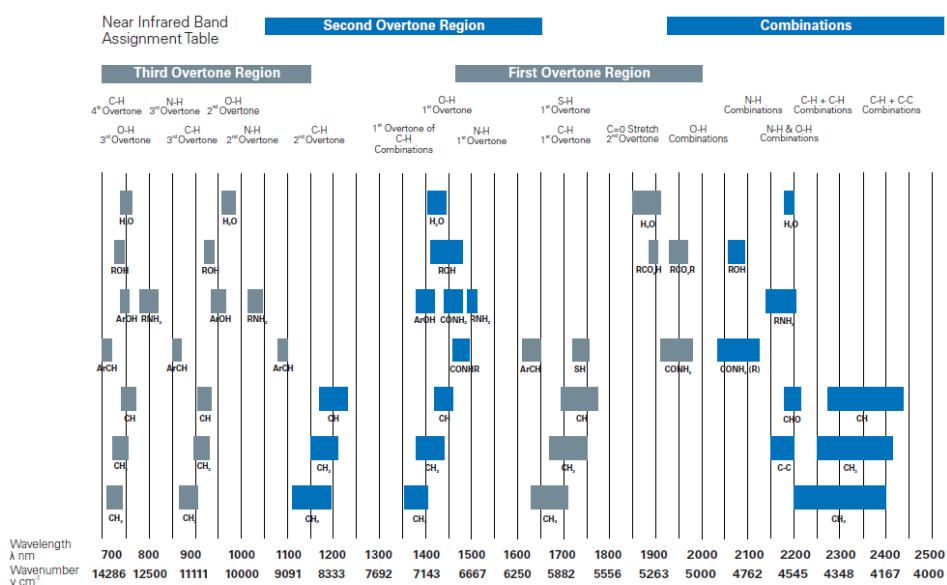


Figura 1. Grupos funcionais atribuídos aos seus respectivos comprimentos de onda/Numero de onda (Bruker®).

Fonte: Do autor (2016)

Com a técnica NIR é possível prever o conteúdo de muitos nutrientes de forma rápida, com bom grau de precisão e custo operacional relativamente

baixo. Contudo, os bons resultados dependem de calibração adequada.

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

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

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

2.3.3 Métodos Quimiométricos

A análise multivariada de dados químicos, conhecida como quimiometria, surgiu da necessidade de desenvolver técnicas de tratamento, do ponto de vista matemático e estatístico, para os dados considerados mais complexos (BEEBE; PELL; SEASHOLTZ, 1998; BRERETON, 2000;

FERREIRA et al., 1999; GELADI; KOWALSKI, 1986; GEMPERLINE, 2006; THOMAS, 1994; WOLD; ESBENSEN; GELADI, 1987). Assim, a quimiometria permite que a avaliação da influência das variáveis existentes na informação que se deseja extrair dos dados seja feita de forma global, sendo possível observar as correlações entre elas (BRERETON, 2000).

Atualmente, a utilização da quimiometria é de extrema importância, antes conhecida como ferramenta alternativa para o tratamento de dados químicos, passa a ser hoje parte essencial e indispensável do conhecimento de qualquer estudante ou pesquisador da área química e outras áreas da ciência.

Essa afirmação pode ser melhor compreendida quando se observa o crescente emprego e as inúmeras aplicações da análise multivariada em diversas áreas da química (BERRUETA; ALONSO-SALCES; HÉBERGER, 2007; RIBEIRO, 2009; TEÓFILO; MARTINS; FERREIRA, 2009).

A análise de componentes principais (PCA – *Principal Component Analysis*) é provavelmente o método quimiométrico mais amplamente difundido, sendo considerada por muitos como a base para a maioria dos tratamentos utilizados na análise multivariada dos dados (BRERETON, 2003; FERREIRA et al., 1999).

A PCA é um método de projeção de dados multivariados, cujo objetivo é reduzir a dimensão dos mesmos, permitindo a visualização das informações mais significativas em um número menor de novas variáveis, as então chamadas componentes principais (PCs – *Principal Components*). Em outras palavras, consiste numa manipulação da matriz de dados X com o objetivo de representar as informações apresentadas em muitas variáveis, por meio de um número menor de novas variáveis. Assim, as amostras são projetadas num novo sistema de eixos (PCs) de dimensão menor e, com isso, as informações mais significativas ou predominantes se tornam mais óbvias. Essa diminuição na dimensionalidade dos dados ocorre quando as variáveis (colunas j da matriz X)

são altamente correlacionadas (colineares), apresentando, assim, informações redundantes (RIBEIRO, 2009).

A regressão multivariada pode ser definida como uma série de operações que estabelecem uma relação (modelo estatístico) entre dois grupos de dados (X e y), em que X é o bloco dos dados experimentais contendo as variáveis instrumentais (espectros) e y formado pela(s) variável(s) dependente(s), que representam as respostas analíticas, tais como concentrações e porcentagem de germinação, por exemplo (MARTENS; NAES, 1989).

Os métodos multivariados de análise quantitativa empregados com maior frequência são os de regressão, sendo os mais conhecidos, a regressão linear múltipla (MLR - *Multiple Linear Regression*), regressão por componentes principais (PCR - *Principal Components Regression*) e regressão por quadrados mínimos parciais (PLS - *Partial Least Squares*) (BEEBE; PELL; SEASHOLTZ, 1998). Todos esses métodos são lineares, porque os seus modelos resultantes descrevem uma relação linear entre variáveis obtidas em um instrumento analítico, por exemplo, e certas respostas ou concentrações dos componentes das amostras estudadas (THOMAS, 1994).

O método de regressão multivariada a ser utilizado no tratamento dos dados desta pesquisa será o de regressão por quadrados mínimos parciais (PLS).

A regressão por PLS, usa dois blocos de predição do tipo PLS para modelar a relação entre duas matrizes X e Y . Ainda a regressão de PLS modela a estrutura de X e de Y o que fornece um resultado mais rico do que as múltiplas regressões que são comumente usadas (SVANT; SJÖSTRÖM; ERIKSSON, 2001).

A principal ideia deste método é encontrar as componentes principais (denominadas de variáveis latentes - VL) da matriz X que maximizem a covariância entre os escores de X e y . Desse modo, PLS modela X e y simultaneamente para encontrar as variáveis latentes em X . No método PLS, o

vetor de respostas y é utilizado inicialmente como vetor de escores, na decomposição de X , para gerar um vetor de pesos.

Na regressão por PLS-da (partial least squares – discriminant analysis), o objetivo é encontrar um modelo que separa os dados, levando em conta classes previamente conhecidas. Assim, modelos de PCA são calculados e encontram-se as direções no espaço multivariado que corresponde às maiores fontes de variação. Entretanto, não necessariamente, essas direções coincidem com aquelas entre as classes, podendo outras direções serem tomadas para melhor discriminá-las (WESTERHUIS et al., 2010).

Antes da aplicação do modelo construído, o mesmo deve ser validado com o objetivo de testar a sua capacidade preditiva. Essa validação consiste em testar o modelo prevendo valores de y de novas amostras. Isso é feito para estabelecer se elas, de fato, irão refletir o comportamento da resposta de interesse. Essa validação pode ser realizada de várias maneiras, entre as quais a validação cruzada e a validação externa são as mais comuns (LORBER; KOWALSKI, 1988).

Durante a aplicação da validação cruzada, uma (*leave one out*) ou algumas amostras do conjunto de calibração (blocos de amostras) são separadas, um modelo é construído com as amostras restantes e a previsão é feita para a(s) amostra(s) separada(s) inicialmente, ou seja, a(s) amostra(s) predita(s) são as mesmas usadas no conjunto de calibração, porém, não participaram da construção do modelo quando foram preditas. O processo é repetido até que todas as amostras tenham sido previstas uma vez e a raiz quadrada da soma dos quadrados dos erros de validação cruzada (RMSECV – *root mean square error of cross validation*) tenha sido computada para o modelo PLS com diferentes números de variáveis latentes (NAES et al., 2002). É por meio do RMSECV e do coeficiente de correlação da validação cruzada (Rcv), medido entre os valores

estimados e experimentais do método de referência, que o melhor modelo PLS pode ser determinado.

REFERÊNCIAS

ARENS, P. et al. Identification of tomato varieties using microsatellites. **Acta Horticulturae**, Oxford, v. 412, p. 49-57, 1995.

ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS. **Rules for testing seeds**. Las Cruces: AOSA, 1998. 888 p.

BARRATT, E. S. et al. Impulsive and premeditated aggression: a factor analysis of self-reported acts. **Psychiatry Research**, Amsterdam, v. 86, n. 2, p. 163-173, May 1999.

BAUMANN, T. W.; GABRIEL, H. Metabolism and excretion of caffeine during germination of *Coffea arabica* L. **Plant and Cell Physiology**, New York, v. 25, n. 8, p. 1431-1436, Aug. 1984.

BEEBE, K. R.; PELL, R. J.; SEASHOLTZ, M. B. **Chemometrics: a practical guide**. New York: John Wiley & Sons, 1998. 348 p.

BENDAÑA, F. E. Fisiología de las semillas de café: problemas relativos al almacenamiento, café. **Turrialba**, Turrialba, v. 4, n. 15, p. 99-106, 1962.

BERRUETA, L. A.; ALONSO-SALCES, R. M.; HÉBERGER, K. Supervised pattern recognition in food analysis. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1158, n. 1/2, p. 196-214, July 2007.

BEWLEY, J. D. Seed germination and dormancy. **The Plant Cell**, Rockville, v. 9, p. 1055-1066, July 1997.

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

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

BRERETON, R. G. **Chemometrics**: data analysis for the laboratory and chemical plant. Chichesster: John Wiley & Sons, 2003. 407 p.

BRERETON, R. G. Introduction to multivariate calibration in analytical chemistry. **Analyst**, London, v. 125, p. 2125-2154, Sept. 2000.

CAIXETA, E. T. et al. Características rastreáveis das cultivares de café. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Rastreabilidade para a cadeia produtiva do café**. Viçosa: Editora da UFV, 2007. Cap. 9, p. 248.

CAMARGO, R. **Condicionamento fisiológico de sementes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.)**. 1998. 108 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1998.

CARVALHO, C. H. S. **Cultivares de café**: origem, características e recomendações. Brasília: Embrapa Café, 2008. 334 p.

CLEMENTE, A. C. S.; CARVALHO, M. L. M. de; GUIMARÃES, R. M. Suitability of the tetrazolium test methodology for recently harvested and stored coffee seeds. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 36, n. 4, p. 415-423, jul./ago. 2012.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB.
Acompanhamento da safra brasileira: safra 2015. Brasília: Conab, 2015.
Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 12 abr. 2015.

CONCEIÇÃO, F. R.; MOREIRA, A. N.; BINSFELD, P. C. Detecção e quantificação de organismos geneticamente modificados em alimentos e ingredientes alimentares. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 1, p. 315-324, 2006.

DANTAS, A. A. A.; CARVALHO, L. G.; FERREIRA, E. Classificação e tendências climáticas em Lavras, MG. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 6, p. 1862-1866, nov./dez. 2007.

DAVIS, A. P. et al. An annotated taxonomic conspectus of the genus *Coffea* (Rubiaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 152, n. 4, p. 465-512, Dec. 2006.

DIAS, M. C. L. L.; SILVA, W. R. Determinação da viabilidade de sementes de café através do teste de tetrazólio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 11, p. 1139-1145, nov. 1986.

DUDLEY, J. W. et al. Near-infrared reflectance measurement of protein and oil concentration in corn, soybean, and oat seed. In: HILL, L. D. (Ed.). **Quality in world markets**. Saddle River: Corn Quality in World Markets, 1975. p. 205-210.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas**. 2. ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1998. 220 p.

FERREIRA, M. M. C. et al. Chemometrics I – multivariate calibration, a tutorial. **Química Nova**, São Paulo, v. 22, n. 5, p. 724-731, set./out. 1999.

FRIEDMAN, J.; WALLER, G. R. Caffeine hazards and their prevention in germinating seeds of coffee (*Coffea arabica* L.). **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 9, n. 8, p. 1099-1106, Aug. 1983a.

FRIEDMAN, J.; WALLER, G. R. Seeds as allelopathic agents. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 9, n. 8, p. 1107-1117, Aug. 1983b.

GELADI, P.; KOWALSKI, B. R. Partial least-squares regression- a tutorial. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 185, p. 1-17, 1986.

GEMPERLINE, P. **Practical guide to chemometrics**. 2. ed. New York: CRC Press, 2006. 552 p.

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

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

GUIMARÃES, C. G. et al. Minimum period to assess the potential of germination of coffee seeds. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 35, p. 347-352, 2013.

GUIMARÃES, R. J. **Formação de mudas de cafeeiro:** (*Coffea arabica* L.): efeitos de reguladores de crescimento e remoção do pergaminho na germinação de sementes e do uso de N e K em cobertura, no desenvolvimento de mudas. 1995. 133 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1995.

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

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.

HENDRE, P. S. et al. Development of new genomic microsatellite markers from robusta coffee (*Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner) showing broad cross-species transferability and utility in genetic studies. **BMC Plant Biology**, Oxford, v. 8, p. e51, Apr. 2008.

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

HILST, P. C. et al. Test of exudates color hues for evaluating the physiological potential of coffee (*Coffea arabica* L.) seeds. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 34, n. 2, p. 212-217, jun. 2012.

LOMBARD, V. et al. Potential use of AFLP markers for the distinction of rapeseed cultivars. In: INTERNATIONAL RAPESEED CONGRESS, 20., 1999, Canberra. **Anais...** Canberra: [s.n.], 1999.

LORBER, A.; KOWALSKI, B. R. Estimation of prediction error for multivariate calibration. **Journal of Chemometrics**, Chichester, v. 2, n. 2, p. 93-109, Apr. 1988.

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

MARTENS, H.; NAES, T. **Multivariate calibration**. New York: John Wiley & Sons, 1989. 419 p.

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

MONCADA, P.; MCCOUCH, S. Simple sequence repeat diversity in diploid and tetraploid *Coffea* species. **Genome**, Ottawa, v. 47, n. 3, p. 501-509, June 2004.

NAES, T. et al. **Multivariate calibration and classification**. Chichester: Nir Publications, 2002. 344 p.

NARVÁEZ, C. H. et al. Patrones genéticos de los cultivares de vides de vinificación más comúnmente usados en Chile basados en marcadores de microsatélites. **Agricultura Técnica**, Chile, v. 61, n. 3, p. 249-261, jul./set. 2001.

NEBESNY, E.; BUDRYN, G. Evaluation of sensory attributes of coffee brews from robusta coffee roasted under different conditions. **European Food Research Technology**, Berlin, v. 224, n. 2, p. 159-165, Dec. 2006.

PADILHA, L. et al. Microsatélites fluorescentes na diferenciação de linhagens de milho. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 24., 2002, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: Embrapa Milho e Sorgo, 2002. p. 15.

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

PEREIRA, C. E. et al. Determinação de inibidores da germinação no espermoderma de sementes de café. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 24, n. 1, p. 306-311, 2002.

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

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

RENA, A. B.; MAESTRI, M. Fisiologia do cafeeiro. In: SIMPÓSIO SOBRE FATORES QUE AFETAM A PRODUTIVIDADE DO CAFEIEIRO, 1986, Poços de Caldas. **Anais...** Piracicaba: POTAFÓS, 1986. p. 13-85.

RIBEIRO, J. S. **Previsão de diferentes atributos sensoriais ligados à qualidade do café arábica brasileiro utilizando-se métodos analíticos distintos e ferramentas quimiométricas.** 2009. 264 p. Tese (Doutorado em química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

ROGGO, S. et al. Screening and distinction of coffee brews based on headspace solid phase microextraction/gas chromatography/principal component analysis. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 84, p. 4351, 2007.

ROSA, S. D. V. F. da et al. Exogen caffeine inhibits in vitro development of *Coffea arabica* L. and *Coffea canephora* Pierre embryos. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 28, n. 3, p. 177-184, set. 2006.

ROSA, S. D. V. F. da et al. Formação de mudas de *Coffea arabica* L., cv Rubi, utilizando sementes e frutos em diferentes estádios de desenvolvimento. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 2, p. 349-356, mar./abr. 2007a.

ROSA, S. D. V. F. da et al. Pré-embebição acelera germinação e crescimento de plântulas e reduz cafeína exógena em sementes de café. **Coffee Science**, Lavras, v. 2, n. 1, p. 69-78, jan./jun. 2007b.

ROSA, S. D. V. F. et al. Staging coffee seedling growth: a rationale for shortening the coffee seed germination test. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 38, n. 2, p. 421-431, 2010.

SETOTAW, T. A. et al. Coefficient of parentage in coffee arabica L. cultivars grown in Brazil. **Crop Science**, Madison, v. 53, n. 4, p. 1237-1247, Apr. 2013.

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

SILVA, E. A. A. da et al. Abscisic acid controls embryo growth potential and endosperm cap weakening during coffee (*Coffea arabica* L. cv. Rubi) seed germination. **Planta**, New York, v. 220, n. 2, p. 251-261, Jan. 2004.

SILVA, E. A. A. da. **Coffe (*Coffea arábica* L. cv. Rubi) seed germination: mechanism and regulation.** 2002. 105 p. Thesis (Ph.D. in Crop Science) - Wageningen University, Wageningen, 2002.

SILVA, E. M.; MALVINO, S. S. A. B. Análise climática do município de Patrocínio (MG). **Caminhos de Geografia**, Uberlândia, v. 10, n. 16, p. 93-108, out. 2005.

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

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

SONDAHL, M. R.; LAURITIS, J. A. Coffee. In: HAMMERSCHLAG, F. A.; LITZ, R. E. (Ed.). **Biotechnology of perennial fruit crops**. Cambridge: C.A.B. International, 1992. p. 401-420.

SVANTE, W.; SJÖSTRÖM, M.; ERIKSSON, L. PLS-regression: a basic tool of chemometrics. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, Amsterdam, v. 58, n. 2, p. 109-130, Oct. 2001.

TEÓFILO, R. F.; MARTINS, J. P. A.; FERREIRA, M. M. C. Sorting variables by using informative vectors as a strategy for featuring selection in multivariate regression. **Journal of Chemometrics**, Chichester, v. 23, n. 1, p. 32-41, Jan. 2009.

THOMAS, E. V. A primer on multivariate calibration. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 66, n. 15, p. 795-804, Aug. 1994.

VALIO, I. F. M. Germination of coffee seeds (*Coffea arabica* L.), cv. Mundo Novo. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 27, n. 100, p. 983-991, Oct. 1976.

VALIO, I. F. M. Inhibition of germination of coffee seeds (*Coffea arabica* L. cv. Mundo Novo) by the endocarp. **Journal of Seed Technology**, East Lansing, v. 5, n. 1, p. 32-39, 1980.

VIEIRA, E. S. N. et al. Development of microsatellite markers for identifying Brazilian *Coffea arabica* varieties. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v. 33, n. 3, p. 507-514, jun. 2010.

VIEIRA, M. G. G. C. et al. **Testes rápidos para determinação da viabilidade e da incidência de danos mecânicos em sementes de cafeeiro**. Lavras: UFLA, 1998. 34 p. (Boletim Agropecuário, 26).

- WALLER, G. R. et al. Caffeine autotoxicity in *coffea arabica* L. In: FRIEDMAN, N.; CHOU, C. H. **The science of allelopathy**. New York: John Wiley & Sons, 1986. p. 243-263.
- WELDSCHOLTE, C. M.; KROONENBERG, P. M.; ANTONIDES, G. Three-mode analysis of perceptions of economic activities in Eastern and Western Europe. **Journal of Economic Psychology**, Amsterdam, v. 19, n. 3, p. 321-351, June 1998.
- WESTERHUIS, J. A. et al. Multivariate paired data analysis: multilevel PLSDA versus OPLSDA. **Metabolomics**, London, v. 6, n. 1, p. 119-128, Mar. 2010.
- WILLIAMS, P. C. The application of the Neotec grain quality analyzer to the analyses of cereal grains and oilseeds I: preliminary observations. **Cereal Science Today**, Minneapolis, v. 18, p. 284, 1973.
- WILSON, J. M.; KRAMER, A.; BEN-JERA, I. Quantitative determination of fat, protein and carbohydrates of soy products with infrared attenuated total reflectance. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 38, n. 1, p. 14-17, Jan. 1973.
- WOLD, S.; ESBENSEN, K.; GELADI, P. Principal component analysis. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, Amsterdam, v. 2, p. 37-52, 1987.

CAPÍTULO 2- Classificação de regiões produtoras e cultivares de café por meio de espectrometria de infravermelho próximo e microssatélites

RESUMO

A cultura do café é de grande importância socioeconômica para o Brasil, gerando renda e emprego durante toda a produção. Uma das dificuldades na produção de sementes dessa espécie é a distinção de cultivares, que é realizada por características morfológicas, com desvantagem de necessitar de um grande número de descritores em plantas inteiras ou adultas e, portanto, de mais tempo e recursos financeiro. Assim, objetivou-se, neste trabalho, avaliar a utilização do infravermelho próximo com o estabelecimento de modelos quimiométricos para a classificação de sementes de café, a partir de grupos funcionais característicos de cada cultivar e região, comparando com técnicas moleculares já estabelecidas. Neste trabalho, foram utilizadas 200 sementes de 4 cultivares distintas (Mundo Novo, Catuaí Amarelo, Catuaí Amarelo, Catuaí Vermelho), todas oriundas de 3 diferentes cidades (Patrocínio, Santo Antônio do Amparo e Três Pontas). Essas sementes foram submetidas à análise, por meio de infravermelho próximo, com as faces planas voltadas para a fonte da onda eletromagnética, e também ao estudo do genoma das plantas por microssatélites. Posteriormente, os espectros obtidos foram analisados, usando regressão por PLS-da. Quando os lotes foram comparados em relação às cultivares, não foi possível classificá-los, a partir dos espectros obtidos. Já quando comparadas em relação a sua região de origem, a técnica utilizando o infravermelho se mostrou eficiente, classificando corretamente os lotes testados oriundos de Patrocínio. Assim, é possível concluir, que a técnica, utilizando o infravermelho próximo não foi capaz de classificar as sementes quanto a sua cultivar.

Palavras-Chave: NIR; Quimiometria; Sementes; microssatélite.

ABSTRACT

The coffee culture is of great socio-economic importance to Brazil generating income and employment throughout the production. One of the problems is the distinction of varieties, which is performed by morphological characteristics. The disadvantage is the need of a large number of descriptors that are identified in adult plants, requiring more time and financial resources. Thus, the aim in this study was to evaluate the near infrared with chemometrics tools to access the genetic purity of coffee seeds and their origin, from characteristic functional groups, when compared to traditional molecular tests. In this study, we used 200 seeds of four different cultivars (Mundo Novo, Catuaí Amarelo, Catuaí Amarelo, Catuaí Vermelho), all from three different regions (Patrocínio, Santo Antônio do Amparo and Três Pontas). These seeds were subjected to analysis by near infrared with the flat sides facing the source of the electromagnetic, and by a study of their genome by markers of a Single Sequence Repeat. After that then the spectra were analyzed by PLS-DA and PCA. It was observed that when the lots were compared regarding cultivars, it was not possible to classify them from the spectra obtained. However, when compared in relation to their origin, the technique using infrared has proved efficient sorting the lots from Patrocínio properly. Thus, we conclude that the technique using near infrared was not able to classify coffee seeds regarding their cultivar.

Keywords: NIR; Chemometrics; Seeds;

1. INTRODUÇÃO

É indiscutível a importância da cultura cafeeira para o nosso país, pela sua participação expressiva no contexto socioeconômico, gerando renda pela exportação e empregando mão de obra nas diferentes etapas do agronegócio, desde o cultivo até a comercialização.

O cafeeiro é uma planta da família *Rubiacea* e do gênero *Coffea*, originado na Etiópia onde os períodos de seca duram de 4 a 5 meses com temperaturas extremas de 4 °C a 31 °C. Existem várias espécies de café no mundo, mas apenas duas são economicamente importantes, *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* Pierre. O Brasil é o maior produtor de café contribuindo com 30% da produção mundial, sendo que 74% da produção brasileira é de *Coffea arabica* L., uma das culturas mais importantes para a economia do país e para a sociedade brasileira.

Um grande problema na cultura do café é que a identificação das cultivares não é possível por visualização direta das sementes, nem por técnicas mais avançadas como análise do DNA, em parte, em decorrência da base genética ser estreita e parte em razão do tempo demandado para se obter marcadores morfológicos da cultivar na planta, demanda muito tempo.

Obter informações sobre a variabilidade genética é de grande importância, pois permite o conhecimento direto de sequências do genoma sem a interferência do ambiente (FERRÃO et. al. 2007). Assim, foi utilizada, neste trabalho, a técnica de marcadores de microssatélites para se obter informações sobre o material genético das sementes. Essa técnica já mostrou um grande potencial para evidenciar diferenças genéticas em espécies nativas (MISSIO et al., 2010).

A espectroscopia é o processo instrumental de medição baseado nas propriedades de absorção e emissão de energia eletromagnética em alguma

região do espectro eletromagnético. A faixa espectral do infravermelho próximo (NIR) é fixada entre 700 a 2500 nm ou 12800 a 4000 cm^{-1} .

As regiões do infravermelho próximo, juntamente com técnicas multivariadas de análise, apresentam diversas aplicações em análises quantitativas e qualitativas de diversos produtos (ROGGO et al., 2007).

Quando se fala na utilização da espectroscopia na região do infravermelho, as principais vantagens descritas são: o estudo de amostras pode ser realizado na fase sólida, líquida ou gasosa; na grande maioria das vezes, não requer grande preparo de amostra, é rápida e, dependendo da técnica utilizada para a análise, esta pode ser não destrutiva.

O principal objetivo da espectroscopia na região do infravermelho é a determinação dos grupos funcionais de um dado material. Isso é possível porque cada grupo funcional absorve em frequência característica de radiação dessa região (SILVERSTEIN; WEBSTER, 1998). A técnica de espectroscopia no infravermelho, tem tido, recentemente, grandes avanços em diversas aplicações, principalmente na área de ciência de alimentos e produtos agrícolas (CEN; HE, 2007; CHEN et al., 2006; ESTEBAN-DÍEZ; GONZALEZ-SAIZ; PIZARRO, 2004; SMALL, 2006;) e quando acoplada a ferramentas quimiométricas, pode ser considerada uma alternativa rápida e confiável de controle de processos (XIE et al., 2007).

Assim, objetivou-se, neste trabalho, avaliar a utilização do infravermelho próximo (NIR) com o estabelecimento de modelos quimiométricos, para a classificação de sementes de café, a partir de grupos funcionais característicos de cada cultivar e de diferentes regiões de origem. Avaliando também a capacidade de marcadores moleculares de microssatélites em classificar sementes de diferentes cultivares. Dessa forma, visa a estabelecer metodologia que seja viável em termos econômicos, práticos e técnicos, para a identificação de cultivares utilizando sementes de café.

2. MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi conduzida parte no Laboratório de Análise de Sementes do Departamento de Agricultura na Universidade Federal de Lavras em Lavras, Minas Gerais e parte no departamento de Horticulture and Crop Science da Ohio State University, em Columbus, Ohio, EUA.

Obtenção das sementes

Foram obtidos 12 lotes de sementes de café de quatro cultivares distintas, oriundas de três diferentes regiões. As cultivares escolhidas estão entre as mais produzidas no Brasil sendo elas: Catuaí Vermelho IAC 144; Catuaí Vermelho IAC 99; Mundo Novo 379/4 e Catucaí Amarelo 25S, das regiões de Santo Antônio do Amparo, Três Pontas e Patrocínio. Em cada região, foram selecionados quatro lotes. As sementes foram fornecidas por produtores inscritos no sistema oficial da produção de semente.

A qualidade de todos os lotes utilizados estava dentro dos padrões estabelecidos pelo Ministério da Agricultura para a comercialização de sementes de café, tendo apresentado porcentagem de germinação acima de 70%.

Adequação de metodologia

Considerando a escassez de estudos referentes à aplicação da técnica de espectrometria no infravermelho próximo em sementes de café, testes foram previamente realizados com o objetivo de verificar a melhor forma e melhor calibração para se obter um espectro confiável das sementes.

O primeiro passo foi definir a melhor posição das sementes para se obter os espectros. Por meio de trabalhos prévios, foi definido que, quando as sementes eram colocadas com a face plana voltada para a fonte do infravermelho a exposição à luz era maior e a dispersão dos raios menor.

Em relação à calibração do aparelho, após testes, verificou-se que com a resolução de quatro cm^{-1} e 64 varreduras obteve-se a maior velocidade e precisão.

Com isso, pode-se analisar as sementes de café com confiança de que seriam obtidos espectros representativos das características de cada tratamento considerado neste trabalho.

Espectroscopia do infravermelho próximo (NIR)

Para a avaliação pelo NIR, 200 sementes de cada um dos lotes identificadas quanto à genética e à região de origem, foram submetidas à análise por espectrometria de infravermelho próximo, (Excalibur), sendo posicionadas com a sua face plana voltada para o feixe de luz.

Os espectros foram obtidos por reflectância total atenuada (RTA) a 45° com cristal de seleneto de zinco na região espectral de 10.000 a 4.000 cm^{-1} .

As leituras foram feitas com uma resolução de quatro cm^{-1} e com 64 varreduras obtidas por amostra.

Análise Quimiométrica

As sementes das cultivares consideradas geneticamente iguais foram agrupadas independentemente da região, para que a classificação fosse feita apenas quanto a sua característica genética e não quanto à região de origem.

Paralelamente, as mesmas sementes foram agrupadas quanto a sua região independentemente de suas características genéticas para que fossem classificadas em relação ao seu local de origem.

Os espectros passaram por pré-processamento, utilizando-se a Correção Multiplicativa de Sinais e a Derivada de segunda ordem. A classificação das amostras, quanto a sua cultivar e região, foi obtida a partir da calibração multivariada, por meio da Análise dos Componentes Principais (principal

componente analysis – PCA) e da Análise de Regressão por mínimos quadrados parciais - análise discriminante (Partial Least Squares – Discriminant Analysis, PLS-DA), utilizando-se 3/4 das amostras para calibração e 1/4 para teste. Foi otimizado um modelo por validação cruzada, e os cálculos foram realizados no software PIROUETTE®.

Análise molecular por SSR

Extração de DNA - O DNA de cada cultivar foi extraído utilizando-se 50 plântulas inteiras. Estas foram maceradas em nitrogênio líquido com a adição do antioxidante polivinil pirrolidona (PVP). Após a maceração, uma pequena quantidade de material de cada amostra, aproximadamente 100mg, foi transferida para um microtubo com a adição de 350µl de tampão CTAB 2% (CTAB 2%; 1M Tris-HCl pH 7,5; 0,5M EDTA pH 8; 5M NaCl e 2% de β-mercaptoetanol) e 1,56µl de proteinase K a 20ng/µl, vortexada vigorosamente por 20 segundos. Os microtubos foram incubados a 65°C por 1 hora, sendo homogeneizados a cada 15 minutos. Posteriormente, foram adicionados 350µl de solução clorofórmio: álcool isoamílico na proporção 24:1 com o objetivo de separar os ácidos nucleicos (sobrenadante) das proteínas (precipitado). As amostras foram homogeneizadas por 25 minutos em agitador por inversão e centrifugadas a 14000 rpm por 10 minutos. Retirou-se o sobrenadante o qual foi transferido para um novo microtubo, contendo 250µl de álcool isopropílico refrigerado para a precipitação dos ácidos nucleicos. As amostras foram homogeneizadas 5 vezes por inversão e incubadas a -4°C por no mínimo 1 hora e centrifugadas a 14000 rpm por 10 minutos. Descartou-se o sobrenadante.

Ao precipitado, foram adicionados 140µl de álcool etílico 70% a -20°C, que foi homogeneizado e centrifugado a 14000 rpm por 10 minutos para a limpeza. Descartou-se o sobrenadante. Para a limpeza final, foram utilizados 140µl de álcool etílico 95%. O sobrenadante foi descartado com o auxílio de

uma pipeta. Os microtubos foram colocados abertos em capela de exaustão em temperatura ambiente, para a secagem do precipitado formado, pellet. Em cada microtubo, foram adicionados 50µl de TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8, 1 mM EDTA), contendo 0,2µl de RNase (10mg/ml) para ressuspensão do DNA. As amostras foram incubadas a 37°C por 30 minutos em banho-maria e acondicionadas a -4°C.

Quantificação e diluição do DNA - Para a quantificação e análise da qualidade do DNA extraído foram utilizados o espectrofotômetro NanoVue da marca GE Healthcare e gel de agarose a 0,8%. As amostras apresentaram concentrações diversas, variando de 200ng/µl a 500ng/µl, e ótima qualidade, com as relações A260/280 de aproximadamente 1,8. Em amostras de DNA livres de contaminação por proteínas, o valor da relação A260/A280 igual a 1,8, sendo que valores abaixo sugerem contaminação proteica e acima, contaminação por RNA (BRITO et al., 2004; ZAHA, 1996). O DNA extraído apresentou-se semelhante ao padrão Lambda DNA (INVITROGEN Life Technologies), sem degradação aparente. Após a quantificação, o DNA foi diluído para a concentração de trabalho de 10ng/µL.

Amplificação - Para as análises moleculares, foram feitas reações em cadeia de polimerase (PCR), utilizando marcadores moleculares de microssatélites (SSR) em um termociclador marca Labnet Modelo TC9600-G, em um meio com volume final de 25µl, contendo 3µl da solução de DNA genômico (10ng/µL), 0,75µl de cada primer (10µM de primer forward, 10µM de primer reverse), juntamente com um mix composto de: 15,55µl de água ultrapura; 2,5µl de tampão 10X (INVITROGEN Life Technologies); 1,0µl de MgCl₂ 25mM (INVITROGEN Life Technologies); 1,25µl de DNTP 10mM (INVITROGEN Life Technologies); 0,2µl de Platinum® Taq DNA Polimerase

5U/ μ l (INVITROGEN Life Technologies). Em seguida, procedeu-se a amplificação e a corrida eletroforética a 120V por 2 horas em gel de poliacrilamida e a visualização após a revelação.

O programa de amplificação consistiu de 94°C de temperatura inicial por 5 minutos, 5 ciclos de amplificação a 94°C por 30 segundos, 57°C por 30 segundos. Nessa etapa, foi adaptado um Toch Down, reduzindo-se 0,5°C a cada ciclo, 72°C por 30 segundos. Seguido de mais 25 ciclos, iniciados à 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos. A extensão foi feita a 72°C por 5 minutos. Após as reações, os produtos da amplificação do DNA foram armazenados em freezer à 4°C.

Primers microssatélites (SSR) - Foram testados 37 pares de primers específicos para a espécie. Para o cálculo da temperatura de melting (TM) dos primers foi utilizado o aplicativo web: Temperatura de Melting: Um Estudo Comparativo (ARRUDA JÚNIOR, 2010). A TM utilizada foi a temperatura média fornecida pelo aplicativo, e o cálculo foi realizado para cada par de primers.

Eletroforese e visualização dos géis - Em cada microtubo contendo 25 μ l de DNA amplificado foram adicionados 5 μ l de corante stop solution. Dessa mistura, 10 μ l foram aplicados nas canaletas do gel de poliacrilamida 10% submetidos à eletroforese em tampão TBE 1X a 120 volts por 2 horas utilizando uma fonte de eletroforese marca PWSys modelo PW300. Esses géis foram constituídos de 10% de acrilamida:bis-acrilamida 30:1, TBE 1X, 0,1% de persulfato de amônio e 0,06% de TEMED. Para efeito de comparação do tamanho dos fragmentos, foi utilizado como padrão o 100 pb DNA Ladder (INVITROGEN Life Technologies).

Para a revelação dos géis utilizou-se o método de coloração com nitrato de prata. Após a eletroforese, as placas foram separadas e os géis foram imersos em solução fixadora (10% de etanol e 0,5% ácido acético 0,5%) e mantido sob lenta agitação por 15 minutos. Em seguida, o gel foi submerso em 1 litro de solução de nitrato de prata (AgNO₃), na concentração de 0,2%, sob agitação lenta por 15 minutos. O gel, então, foi lavado com água corrente e mantido sob agitação lenta em solução de revelação (NaOH 3%, formaldeído 0,5%) até a obtenção de bandas de forma nítida e visualizado no transiluminador da marca Hoefer MacroVue modelo Vis-45.

Após a caracterização molecular e posterior avaliação, foram selecionados aqueles primers que apresentaram polimorfismo entre as cultivares avaliadas.

Diversidade genética - Os produtos da amplificação, visualizados no gel, produzidos pelos primers, foram utilizados na elaboração de uma matriz de similaridade genética, por meio do registro da presença (1) e da ausência (0) de bandas no perfil eletroforético de cada cultivar.

As matrizes binárias foram usadas para a obtenção das estimativas de similaridades genéticas (S_{gij}), com o auxílio do programa NTSYSpc (EXETER SOFTWARE®, Versão 2.11), empregando-se o coeficiente de Jaccard (1901), para os genótipos conforme abaixo:

$$S_{gij} = \frac{a}{a + b + c}$$

Em que:

a = presença de bandas em ambos os genótipos i e j;

b = presença de banda no primeiro genótipo i e ausência no segundo j;

c = presença no segundo j e ausência no primeiro i;

Com base na matriz de similaridade genética Jaccard, foi realizado o agrupamento dos genótipos, utilizando o método de médias não ponderadas das similaridades (UPGMA - Unweighted Pair-Group Method), por meio do programa NTSYSpc (EXETER SOFTWARE ®, Versão 2.11).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise por espectroscopia no infravermelho próximo

Pela observação dos espectros, quando as sementes de café das diversas cultivares foram analisadas pelo infravermelho próximo, as bandas foram semelhantes (Figura 1). Da mesma forma, quando comparados os espectros das sementes em relação à sua região de origem (Figura 2), também foi obtido um padrão semelhante das bandas.

As bandas observadas nos espectros referentes às sementes de café nos dois estudos estavam presentes nos comprimentos de onda de 5750 cm^{-1} , característica de estiramento vibracional de S-H, em -SH, em 7000 cm^{-1} , característica de estiramento vibracional de N-H de CONH_2 e em 9000 cm^{-1} , característica de C-H de compostos aromáticos, relações observadas segundo Siesler et al. (2002).

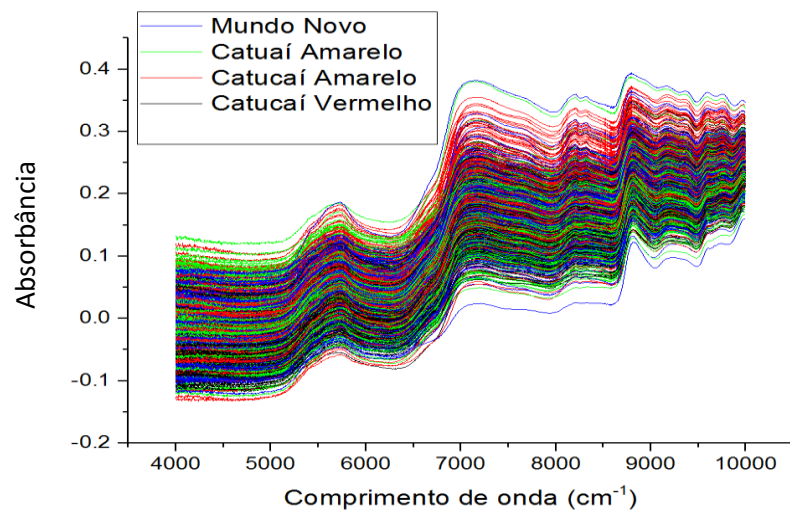


Figura 1. Espectros NIR das sementes de café das quatro diferentes cultivares

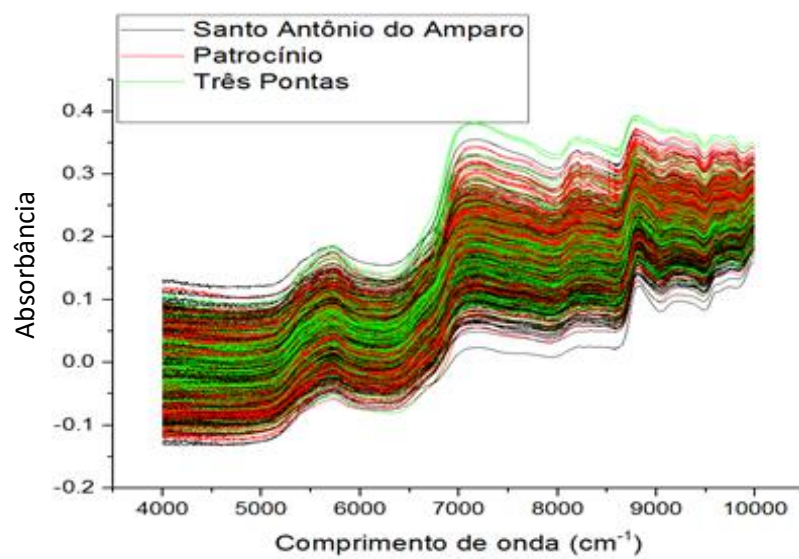


Figura 2. Espectros NIR das sementes de café obtidas das três diferentes regiões

Por meio dessa observação, pode-se inferir que a composição química observada entre todas as sementes é semelhante, já que a forma dos espectros não foi discrepante entre as sementes analisadas. Estudando diferentes cultivares de mamona, Santos et al. (2014) também não encontraram discrepância entre os espectros, mas conseguiram identificar diferenças com uso de outras ferramentas, como PCA e PLS-DA, para se obter mais informações sobre o espectro.

Discriminação das amostras por PCA

Nos gráficos de escores (Figuras 3 e 4), estão representadas as duas componentes principais de cada estudo. Na Figura 3, que representa os escores das sementes classificadas segundo a cultivar, as duas primeiras componentes principais representam 98% da variabilidade dos dados, sendo que 77,8% foi explicado pela primeira componente principal e 20,2% pela segunda. Já, na Figura 4, onde estão representados os escores das sementes agrupadas quanto à sua região de origem, as duas primeiras componentes principais explicaram 98,2% da variabilidade dos dados, sendo que a primeira componente principal explicou 78,2% da variabilidade e a segunda 20%.

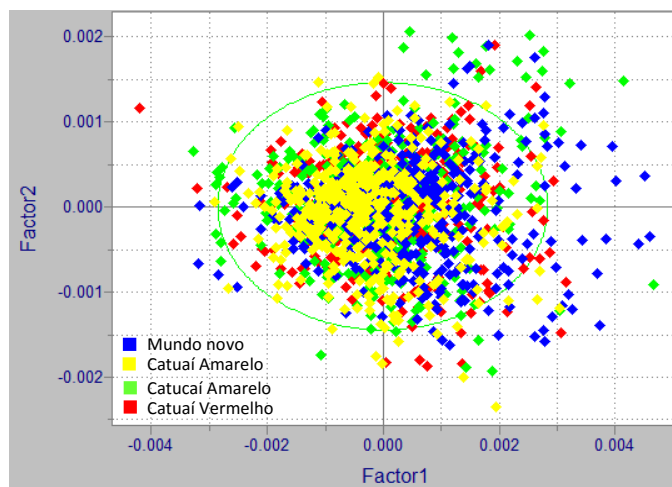


Figura 3. Gráfico de escores obtidos por PCA dos espectros de infravermelho das sementes de café coloridas por cultivar.

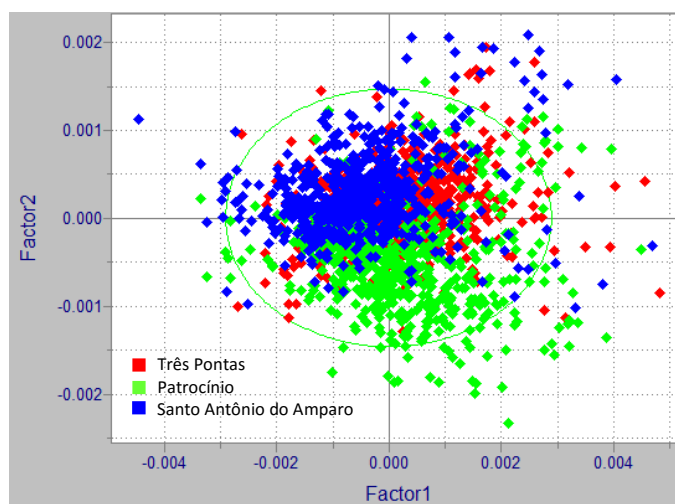


Figura 4. Gráfico de escores obtidos por PCA dos espectros de infravermelho das sementes de café coloridas de acordo com sua região de origem.

Na Figura 3, em relação à discriminação das sementes quanto a cultivar, observa-se que não houve uma separação das diferentes cultivares, sendo que

todas as cores que representam cada classe estão agrupadas na mesma região. Em relação a Figura 4, observa-se que as sementes representadas pela cor verde, correspondentes às sementes da região de Patrocínio, estão localizadas mais na região inferior do gráfico, sendo possível alguma discriminação. A análise de componentes principais é uma importante ferramenta para a avaliação da composição química do café. Alguns trabalhos recentes mostraram como essa técnica pode ser importante. Tavares et al. (2012), trabalhando na detecção de adulteração do café torrado por adição de cascas conseguiu diferenciar cafés sem adulteração de cafés adulterados com até 0,5% de casca. Em outro trabalho, onde foi avaliada a composição volátil dos defeitos intrínsecos do café (preto, verde e ardido) foi possível identificar marcadores dos defeitos em relação aos grãos sadios (BANDEIRA et al., 2009).

Classificação por PLS-DA

Analisando os resultados obtidos, verifica-se a comparação das cultivares estudadas e a classificação feita pela técnica de infravermelho próximo com base nos grupos funcionais presentes nas amostras (Tabela 1).

Observa-se que o resultado das classificações não teve alto índice de acerto. Na cultivar Mundo Novo, composta por sementes de três diferentes regiões (Patrocínio, Santo Antônio do Amparo e Três Pontas), foi possível identificar apenas 143 sementes classificadas corretamente, dentre as 450 utilizadas. As outras sementes dessa cultivar ou foram classificadas como outras cultivares ou, como no caso de 262 sementes, foram classificadas como sementes totalmente diferentes dos materiais estudados.

Para as outras cultivares também não foi possível a classificação eficiente, sendo que algumas sementes foram identificadas como outras cultivares ou mesmo como material estranho ao grupo estudado. No caso da cultivar Catuaí Amarelo apenas 87 sementes classificadas corretamente das 450

e 299 não classificadas. Já, para a cultivar Catucaí Amarelo, apenas 22 corretas das 450 e 332 não classificadas e para a cultivar Catucaí Vermelho 52 corretas das 450 e 332 não classificadas.

Tabela 1. Sementes das cultivares de café em estudo, classificadas quanto sua cultivar, por meio da técnica de infravermelho próximo com o auxílio da PLS-DA.

	Classificação				Não classificadas/ Total
	Mundo Novo	Catuaí Amarelo	Catucaí Amarelo	Catuaí Vermelho	
Cultivares Mundo Novo	143	31	7	7	262/450
Catuaí Amarelo	33	87	5	26	299/450
Catucaí Amarelo	45	25	22	26	332/450
Catuaí Vermelho	32	29	5	52	332/450

Fonte: Do autor (2016)

A tentativa de validação do modelo, por meio de sementes reservadas em amostras de cada uma das cultivares (Tabela 2), confirma os resultados observados na Tabela 1, porque, na sua maioria, elas não foram classificadas corretamente ou nem mesmo classificadas entre as cultivares estudadas.

Para as sementes da cultivar Mundo Novo, a validação seguiu o mesmo padrão do modelo ajustado, das 150 sementes testadas, 57 sementes foram classificadas corretamente como Mundo Novo; dentre as 93 demais, 16 foram classificadas como Catuaí Amarelo, 7 como Catucaí Amarelo, 2 como Catucaí Vermelho e outras 68 que foram classificadas como sementes diferentes do material estudado. Para as outras cultivares, a classificação também não foi correta. Para a cultivar Catucaí Amarelo apenas 30 sementes foram validadas

corretamente. Das 120 restantes, 13 foram classificadas como Mundo Novo, 1 como Catuaí Amarelo, 3 como Catuaí Vermelho e 103 não foram classificadas como sementes do material estudado. Para a cultivar Catucaí Amarelo, apenas 11 foram classificadas corretamente, sendo as outras 139, classificadas como Mundo Novo, 17, Catuaí Amarelo, 9, Catuaí Vermelho, 3, e como material diferente 110. Por fim, a cultivar Catuaí Vermelho teve apenas 17 sementes classificadas corretamente, outras 12 classificadas como mundo novo, 17 como Catuaí Amarelo, 1 como Catucaí Amarelo e 103 classificadas como material desconhecido.

Tabela 2. Sementes usadas para validação do modelo das sementes classificadas quanto a cultivar.

	Classificação				Não classificadas/ Total
	Mundo Novo	Catuaí Amarelo	Catucaí Amarelo	Catuaí Vermelho	
Cultivares Mundo Novo	57	16	7	2	68/150
Catuaí Amarelo	13	30	1	3	103/150
Catucaí Amarelo	17	9	11	3	110/150
Catuaí Vermelho	12	17	1	17	103/150

Fonte: Do autor (2016)

Também pode-se observar como os pesos, ou seja, a contribuição dos comprimentos de onda para diferenciar/classificar cada cultivar (Figura 5), não se mostraram muito definidos. Para cultivar Mundo Novo (Figura 5a), o principal comprimento de onda com alto peso para essa cultivar foi o de 6150 cm^{-1} , que corresponde a $=\text{CH}_2$. Na cultivar Catuaí Amarelo (Figura 5b), o mesmo comprimento de onda foi observado como tendo uma alta contribuição

para essa cultivar. Já, para as cultivares Catucaí Amarelo e Catucaí Vermelho (Figuras 5c e 5d) o comprimento de onda 5275 cm^{-1} , que corresponde ao amido, foi observado como tendo alto peso para essas cultivares.

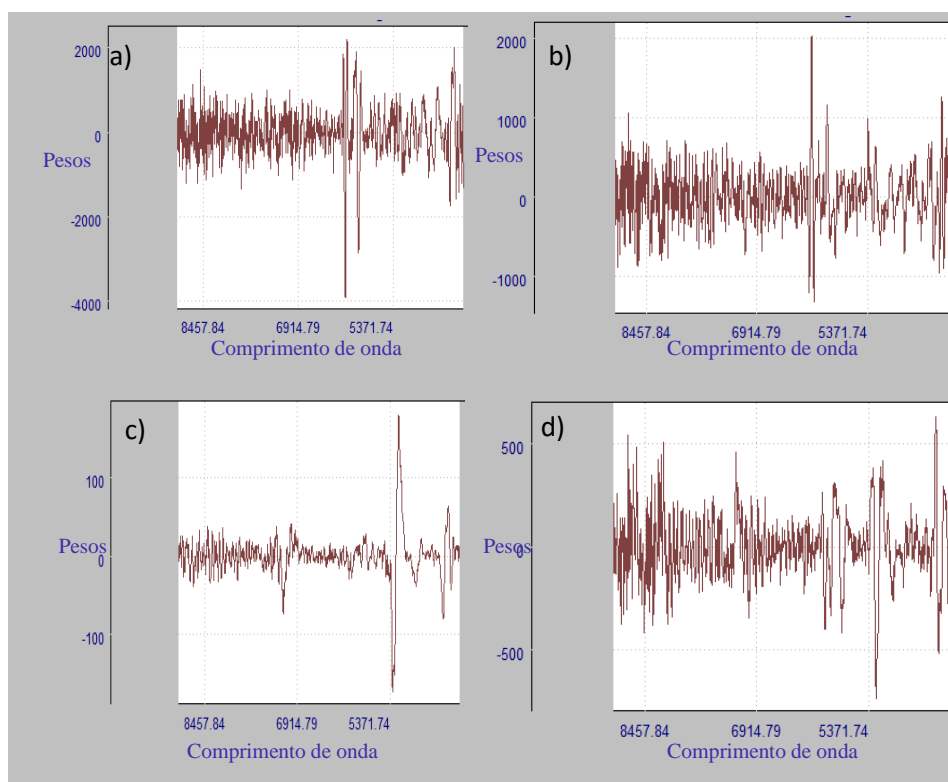


Figura 5. Pesos dos comprimentos de onda (cm^{-1}) referentes as cultivares estudadas, a) Cultivar Mundo Novo, b) Cultivar Catucaí Amarelo, c) Catucaí Amarelo e d) Catucaí Vermelho.

Fonte: Do autor (2016)

As metodologias utilizadas neste trabalho para a identificação das cultivares por meio da técnica de infravermelho próximo não foram eficientes,

provavelmente pela estreita base genética das cultivares testadas. Todas elas têm a cultivar Mundo Novo como ancestral comum. As cultivares de Catuai Vermelho são oriundas do cruzamento de Mundo Novo com Caturra Amarelo, já a cultivar Catucaí Amarelo surgiu do cruzamento de Catucaí com Icatu, ou seja todas elas estão aparentadas de alguma forma (CARVALHO, 2008). Provavelmente, por meio de outras metodologias para captura dos espectros nas sementes ou usando uma diferente região do espectro como, por exemplo, o infravermelho médio, a hipótese adotada para esse trabalho poderá ser confirmada.

Quando as sementes foram classificadas de acordo com a sua região de origem, pode-se observar que a técnica de infravermelho próximo foi eficiente para classificar os lotes oriundos da região de Patrocínio (Tabela 3).

A região de Santo Antônio do Amparo e a região de Três Pontas foram algumas vezes confundidas sendo uma classificada como a outra e vice versa. Já as sementes oriundas da região de Patrocínio foram classificadas corretamente em quase 100%.

Das 600 sementes analisadas para região de Santo Antônio do Amparo 403 foram classificadas corretamente, 4 foram classificadas como da região de Patrocínio, 116 da região de Três Pontas e 76 classificadas como diferentes das regiões estudadas. Já, para região de Patrocínio das 600 sementes estudadas 597 foram classificadas corretamente e apenas 3 sementes como da região de Três Pontas. Para a região de Três Pontas das 600 sementes 130 foram classificadas como da Região de Santo Antônio do Amparo, 403 corretamente como da região de Três Pontas e 68 classificadas como uma região diferente das estudadas.

Tabela 3. Sementes de café oriundas de diferentes regiões classificadas pela técnica de infravermelho próximo segundo sua composição química.

	Classificação			Não classificadas/ Total
	S. A. Amparo	Patrocínio	Três Pontas	
Regiões S. A. Amparo	403	4	116	76/600
Patrocínio	0	597	3	0/600
Três Pontas	130	0	403	68/600

Fonte: Do autor (2016)

Para validação do modelo utilizado para classificar as sementes quanto à sua região de origem (Tabela 4), observa-se o mesmo padrão de classificação do modelo. As cultivares oriundas da região de Patrocínio foram muito bem classificadas, sendo que das 200 sementes utilizadas apenas uma semente foi classificada como da região de Três Pontas, todas as outras 199 sementes foram corretamente classificadas. Já, nas sementes da região de Santo Antônio do Amparo, das 200 sementes utilizadas 119 foram classificadas corretamente, 47 como da região de Três Pontas e 34 como um material diferente do estudado. Das 200 sementes oriundas da região de Três Pontas, 145 foram corretamente classificadas, 38 classificadas como da região de Santo Antônio do Amparo e 17 como material diferente do estudado.

Essa separação das sementes da região de Patrocínio indica que como Patrocínio está em uma região com o clima subquente, com médias térmicas variando de 19°C a 27°C e pluviosidade média em torno de 1500 mm/ano (SILVA; MALVINO, 2005).

Já, o clima da região Três Pontas e Santo Antônio do Amparo, que são duas cidades próximas, é úmido, com pequena deficiência de água, denominado mesotérmico, com uma evapotranspiração de 899 mm no ano, sendo que 31% dessa evapotranspiração ocorre no verão (DANTAS et al., 2007).

Tabela 4. Sementes usadas na validação do modelo criado a partir das regiões estudadas.

	Classificação			Não classificadas/ Total	
	S. A. Amparo	Patrocínio	Três Pontas		
Regiões	S. A. Amparo	119	0	47	34/200
	Patrocínio	0	199	1	0/200
	Três Pontas	38	0	145	17/200

Fonte: Do autor (2016)

Na Figura 6, observam-se os comprimentos de onda mais importantes para classificar cada região. Na região de Santo Antônio do Amparo (Figura 6a), o comprimento de onda com maior peso para a sua classificação, foi de 7022 cm^{-1} , que corresponde a R-OH. Na região de Patrocínio (Figura 6b), o mesmo comprimento de onda teve o maior peso para a região de Três Pontas como foi observado (Figuras 1b e 1c), ambas obtiveram o comprimento de onda 7110 cm^{-1} que corresponde a Ar-OH com maior peso para essas cultivares.

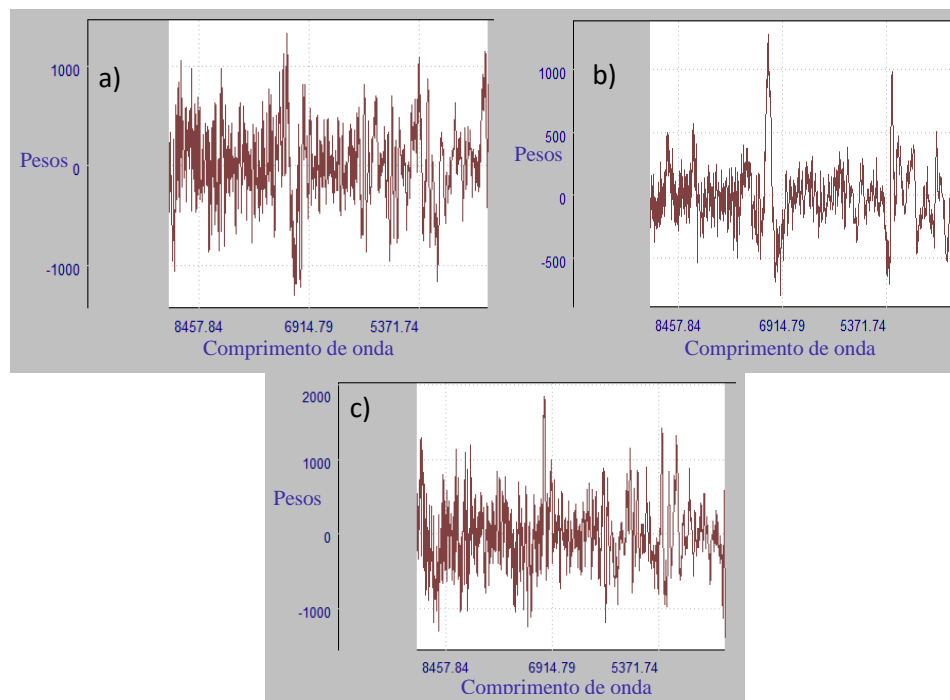


Figura 6. Pesos dos comprimentos de onda (cm^{-1}) referentes as regiões estudadas, a) Santo Antônio do Amparo, b) Patrocínio e c) Três Pontas.

Fonte: Do autor (2016)

Análise molecular

Pelo dendrograma apresentado na figura 7, verifica-se que as diferenças significativas observadas em coeficientes de similaridade superiores à linha indicativa (linha de corte), não constituem agrupamentos de modo a identificar todas as cultivares, considerando o conjunto de primers utilizados nesse ensaio. Embora o índice de similaridade máxima não seja muito alto (0,64), apenas as cultivares Catucaí Amarelo e a cultivar Catuaí Vermelho IAC 99 da região de Três Pontas não constituem grupos similares com as outras, que foram

agrupadas entre si. Provavelmente, as diferenças entre os genomas dessas cultivares sejam raras, em razão da estreita base genética entre elas, e os locais do DNA acessados não continham as diferenças expressas no fenótipo. Esse resultado é coerente com aqueles observados quando utilizou-se a técnica do infravermelho próximo, já que as diferenças captadas nos espectros do NIR também não foram suficientes para garantir a diferenciação das cultivares. Entretanto, a hipótese de que a técnica de SSR pode ser útil na diferenciação de cultivares não deve ser descartada, porque o uso de um número maior de “primers” que flanqueiam outras regiões do DNA pode ser eficiente.

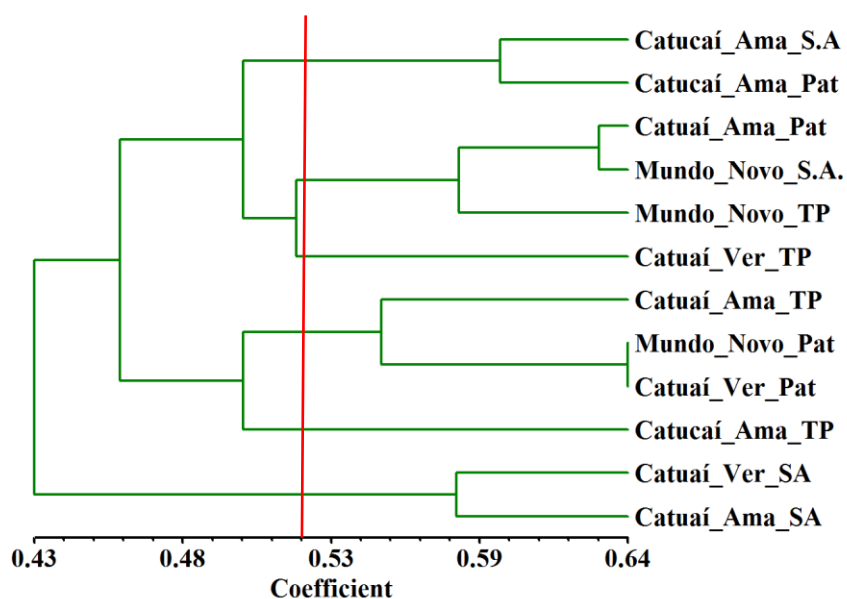


Figura 7. Diagrama de similaridade das cultivares de café classificadas utilizando SSR.
Fonte: Do autor (2016)

Pinto, Maluf e Guerreiro-Filho (2007), estudando marcadores de microssatélites associados à resistência ao bicho-mineiro em sementes de café,

também não identificou alelos que classificassem as sementes segundo essas características.

4. CONCLUSÕES

A técnica, utilizando o infravermelho próximo não foi capaz de classificar sementes de diferentes cultivares.

Quanto à região de origem, a técnica, utilizando o infravermelho classificou com quase 100% de precisão sementes oriundas da região de Patrocínio.

Pela técnica de análise do DNA por SSR, foi possível identificar apenas a cultivar Catucaí em relação as cultivares Mundo Novo e Catuaí que não foram diferenciadas entre si.

REFERÊNCIAS

ARRUDA JÚNIOR, R. G. de. **Temperatura de melting**: um estudo comparativo. 2010. 47 p. Monografia (Trabalho de Conclusão em Computação) - Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2010.

BANDEIRA, R. D. C. C. et al. Composição volátil dos defeitos intrínsecos do café por CG/EM-headspace. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 2, p. 309-314, 2009.

BRITO, L. G. et al. Avaliação de diferentes protocolos de extração de DNA celular a partir de adultos de *Haematobia irritans* (Linnaeus, 1758) (Diptera: Muscidae). **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 26, n. 4, p. 168-172, 2004.

CARVALHO, C. H. S. **Cultivares de café**: origem, características e recomendações. Brasília: Embrapa Café, 2008. 334 p.

CEN, H.; HE, Y. Theory and application of near infrared reflectance spectroscopy in determination of food quality. **Trends in Food Science Technology**, Cambridge, v. 18, n. 2, p. 72-83, Feb. 2007.

CHEN, Q. et al. Feasibility study on qualitative and quantitative analysis in tea by near infrared spectroscopy with multivariate calibration. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 572, n. 1, p. 77-84, July 2006.

DANTAS, A. A. A.; CARVALHO, L. G.; FERREIRA, E. Classificação e tendências climáticas em Lavras, MG. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 6, p. 1862-1866, nov./dez. 2007.

ESTEBAN-DÍEZ, I.; GONZALEZ-SAIZ, J. M.; PIZARRO, C. Prediction of roasting colour and other quality parameters of roasted coffee samples by near infrared spectroscopy: a feasibility study. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, Sussex, v. 12, n. 1, p. 287-297, Dec. 2004.

FERRÃO, M. A. G. et al. Origem, dispersão geográfica, taxonomia e diversidade genética de *Coffea canephora*. In: _____ (Ed.). **Café conilon**. Vitória: Incaper, 2007. p. 66-91.

JACCARD, P. Étude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et des Jura. **Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles**, Lancaster, v. 37, p. 547-579, 1901.

MISSIO, R. F. et al. Polymorphic information content of SSR markers for *Coffea* spp. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, [S.l.], v. 10, p. 89-94, 2010.

PINTO, F. O.; MALUF, M. P.; GUERREIRO-FILHO, O. Study of simple sequence repeat markers from coffee expressed sequences associated to leaf miner resistance. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 3, p. 377-384, mar. 2007.

ROGGO, S. et al. Screening and distinction of coffee brews based on headspace solid phase microextraction/gas chromatography/principal component analysis. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 84, n. 1, p. 43-51, 2007.

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

SIESLER, H. W. et al. **Near-infrared spectroscopy: principles, instruments, applications**. Weinheim: Wiley-VCH Verlage, 2002. 349 p.

SILVA, E. M.; MALVINO, S. S. A. B. Análise climática do município de Patrocínio (MG). **Caminhos de Geografia**, Uberlândia, v. 10, n. 16, p. 93-108, 2005.

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

SMALL, G. W. Chemometrics and near-infrared spectroscopy: avoiding the pitfalls. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 25, n. 11, p. 1057-1066, 2006.

TAVARES, K. M. et al. Espectroscopia no infravermelho médio e análise sensorial aplicada à detecção de adulteração de café torrado por adição de cascas de café. **Química Nova**, São Paulo, v. 35, n. 6, p. 1164-1168, 2012.

XIE, L. et al. Discrimination of transgenic tomatoes based on visible/near-infrared spectra. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 584, n. 2, p. 379-384, Feb. 2007.

ZAHA, A. (Coord.). **Biologia molecular básica**. Porto Alegre: Mercado Aberto, 1996. 336 p.

CAPÍTULO 3- Uso do infravermelho próximo para a estimativa do potencial de germinação de sementes de café

RESUMO

O café é uma das maiores fontes de renda para o Brasil, em razão de seu grande volume de exportação e também aos empregos associados à cultura. Um dos problemas da cadeia produtiva de sementes de café é o tempo necessário para que os resultados dos testes de germinação sejam concluídos, atrasando assim toda a sua distribuição. Sendo a semente de café semirrecalcitrante, muitas vezes os resultados quando obtidos já não expressam a qualidade atual do lote. Com isso, objetivou-se, neste trabalho, avaliar o potencial do infravermelho próximo (NIR), para prever a germinação de lotes de sementes de café. Neste trabalho, foram utilizados 9 lotes de sementes de café, 3 de alta qualidade, acima de 90% de germinação, 3 de média, com 60 a 90% de germinação e 3 lotes de baixa qualidade com germinação abaixo de 60%. As sementes foram obtidas de produtores da região de Lavras, analisadas no Laboratório de Análise de Sementes da UFPA. Posteriormente, essas sementes foram submetidas à análise, por meio da espectroscopia no infravermelho próximo com as faces planas voltadas para a fonte da onda eletromagnética e os espectros obtidos foram analisados por meio das análises multivariadas PCA e PLA-DA. Quando comparados os espectros, foi possível observar que as sementes de alta qualidade tinham diferenças marcantes em sua composição, suficientes para serem separadas das demais com precisão pelo método de infravermelho próximo. Já, as sementes de média e baixa qualidade não tinham diferenças marcantes suficientes para separação. Assim, pode-se concluir que a técnica utilizando o infravermelho próximo foi eficiente para classificar apenas as sementes de café de alta qualidade.

Palavras-Chave: NIR; Quimiometria; Qualidade;

ABSTRACT

Coffee is a major source of income for Brazil due to its large volume of exports and the jobs associated with the crop. One of the problems in the production chain of coffee seeds problems is the time that the results of the germination tests take to be completed, thus delaying the entire distribution. Being coffee seeds recalcitrant, in many cases the results obtained does not represent the actual quality of the lot. Therefore, the aim of this study was to evaluate the potential of the near infrared to predict the germination of coffee seeds. In this study, we used 9 lots of coffee seeds, 3 of high quality, above 90% of germination 3 of medium quality, with 60 to 90% germination and 3 lots of low quality seeds, with germination below 60%. The seeds were obtained from producers in the region and from the Laboratory of Seed Analysis of UFLA. Later these seeds were subjected to analysis by near infrared with the flat sides facing the source of the electromagnetic wave and the spectra obtained were analyzed by multivariate analysis PLS-DA and PCA. When the spectra was compared was observed that high quality seeds had differences in its composition sufficient to be separated from the others precisely by the near infrared technique. As for the medium and low quality seeds these differences were not enough to separate them. Thus, it can be concluded that the technique using near infrared was efficient to sort only the high quality coffee beans.

Keywords: NIR; Chemometrics; Quality;

1. INTRODUÇÃO

A cadeia produtora de café é de suma importância para o Brasil. Entretanto, na implantação das lavouras, ainda verificam-se limitações, em relação à obtenção de sementes de qualidade. As sementes de café têm germinação lenta e desuniforme, além de baixo potencial de armazenamento, o que dificulta a obtenção de mudas com desejável padrão de qualidade, no momento do plantio, além de dificultar a avaliação da viabilidade e do vigor das sementes, em razão do longo período necessário para a obtenção do resultado dos testes.

A germinação de sementes de café é alvo de vários estudos (BRAZ; ROSSETTO, 2008; SALES et al., 2003), pois o período requerido para sua avaliação, 30 dias, é considerado longo, pois quando os resultados são informados já houve variação na qualidade de sementes.

Com o objetivo de reduzir o tempo do teste de germinação, foram obtidas informações para definir estádios precoces de plântulas de café. Aos 16 dias após semeadura, a avaliação de plântulas em estágio S1 descrito por Rosa et al. (2010) permite obter resultados iguais aos do teste de germinação de café (GUIMARÃES et al., 2013).

Uma alternativa interessante para ajudar na cadeia produtiva é a espectroscopia no infravermelho, uma técnica de análise do espectro, rápida e acessível, que fornece informações tanto qualitativas como quantitativas e que cada vez mais vem sendo utilizada na análise de sementes.

A espectrometria de infravermelho próximo (NIR) é a medição de comprimento de onda e intensidade da absorção de luz infravermelha próxima realizada pela amostra. A luz infravermelha próxima se estende em uma faixa de 800 nm - 2.5 μ m (12,500 - 4000 cm^{-1}) e tem energia suficiente para excitar sobretons e combinações de vibrações moleculares a altos níveis de energia. A

espectroscopia NIR é tipicamente usada na medição quantitativa de grupos funcionais orgânicos, especialmente O-H, N-H, e C=O.

Diante do exposto, objetivou-se, neste trabalho, avaliar o potencial do infravermelho próximo (NIR), para prever a germinação de lotes de sementes de café informando esses resultados de uma maneira mais rápida, não subjetiva e não destrutiva.

2. MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi conduzida parte na Universidade Federal de Lavras em Lavras, Minas Gerais e parte na Ohio State University, em Columbus, Ohio. Foram utilizados na pesquisa três lotes de sementes de café de três níveis diferentes de qualidade, acima de 90%, entre 60 e 90% e abaixo de 60%.

Teste de germinação

Para avaliar a capacidade de germinação, foram utilizadas 200 sementes de cada um dos 3 tratamentos.

O teste de germinação foi conduzido, com a semeadura entre papel toalha umedecido com água destilada na proporção de 2,5 ml.g⁻¹ de papel. As sementes permaneceram no germinador regulado para 30°C e as avaliações das plântulas normais foram efetuadas no trigésimo dia após a semeadura, segundo recomendações das Regras para a Análise de Sementes (BRASIL, 2009). Os resultados foram expressos em porcentagem média de plântulas normais, sendo essa considerada semente germinada.

Análises da espectroscopia do infravermelho próximo (NIR)

As 70 sementes de cada lote foram submetidas à análise por espectrometria no infravermelho próximo, marca Excalibur®, sendo posicionadas com a sua face plana voltada para o feixe de luz.

Os espectros foram obtidos por reflectância total atenuada (RTA) a 45° com cristal de seleneto de zinco na região espectral de 10.000 a 4.000 cm⁻¹.

Análise Quimiométrica

As sementes dos três tratamentos foram agrupadas quanto à porcentagem de germinação em 3 classes sendo com germinação alta (acima de 90%) média (entre 60 e 90%) e baixa (abaixo de 60%).

Os espectros passaram por pré-processamento, utilizando-se a correção multiplicativa de sinais e a derivada de segunda ordem. A classificação das amostras quanto à qualidade, foi obtida a partir da calibração multivariada, por meio da Análise dos Componentes Principais (principal component analysis – PCA) e da Análise de Regressão por mínimos quadrados Parciais - Análise Discriminante (Partial Least Squares – Discriminant Analysis, PLS-DA), utilizando-se aproximadamente 4/5 das amostras para calibração e 1/5 para teste. Foi otimizado um modelo por validação cruzada, e os cálculos foram realizados no software PIROUETTE®.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização dos lotes estudados

Na tabela 1, pode-se observar o perfil dos lotes dos diferentes grupos de qualidade usados neste trabalho. Os lotes um, dois e três, com germinação abaixo de 60% fizeram parte do grupo de sementes de baixa qualidade. Sementes dos lotes quatro, cinco, e seis, com germinação entre 60% e 90% fizeram parte do grupo de sementes de qualidade média. Finalmente, os lotes sete, oito e nove foram utilizados como sementes do grupo de alta qualidade, acima de 90%.

Tabela 1. Porcentagem de germinação dos lotes que compõem os grupos de diferentes níveis de qualidade.

Lotes	Germinação (%)
1	18%
2	57%
3	18%
4	86%
5	68%
6	77%
7	97%
8	98%
9	95%

Fonte: Do autor (2016)

Análise por espectroscopia no infravermelho próximo

Observando os espectros referentes às sementes de café de diferentes níveis de qualidades, todos os lotes obtiveram um padrão do espectro semelhante.

Os espectros referentes às sementes de café com diferentes níveis de qualidades fisiológica apresentaram bandas em 5750 cm^{-1} , característica de estiramento vibracional de S-H de álcoois, em -SH, em 7000 cm^{-1} , característica de estiramento vibracional de N-H de CONH_2 e em 9000 cm^{-1} , característica de C-H de compostos aromáticos (SIESLER et al., 2002). No geral, não foi possível observar diferença significativa entre os diferentes níveis de qualidades das sementes analisando apenas o espectro.

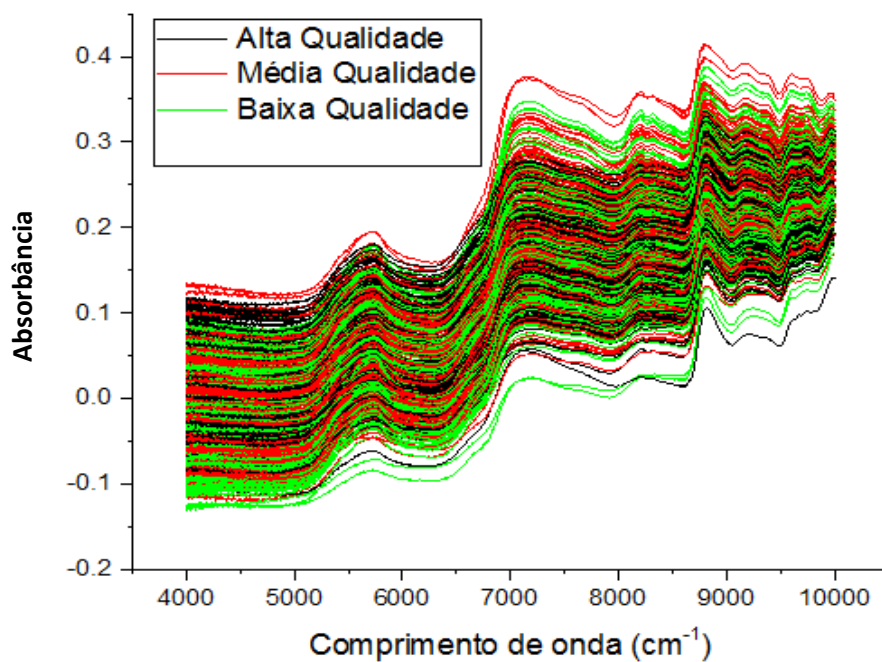


Figura 1. Espectros no infravermelho próximo das sementes de café dos três diferentes níveis de qualidade fisiológica.

Fonte: Do autor (2016)

Entretanto, pela observação visual da representação dos espectros, normalmente não é possível avaliar diferenças mais sutis entre as sementes avaliadas, sendo necessária a utilização de ferramentas quimiométricas, como PCA e PLS-DA.

Discriminação das amostras por PCA

No gráfico de escores (Figura 2), estão representadas as duas componentes principais que juntas representam 97,55% da variabilidade dos dados sendo que 83,49% foi explicado pela primeira componente principal e 14,06% pela segunda.

Pode-se observar que os lotes de alta qualidade representados na figura pelos quadrados azuis obtiveram uma tendência diferente dos outros dois níveis de qualidade (quadrados verdes e vermelhos), dispostos de forma dispersa e confundidas entre si. Por meio desses resultados, verifica-se que sementes de café de alta qualidade, com germinação acima de 90%, podem ser separadas daquelas com qualidade inferior. Embora o padrão oficial de qualidade para sementes de café (MAPA) estabeleça germinação mínima de 70%, essa técnica é promissora para a realização de separação de lotes com alta qualidade. É importante também ressaltar que outros experimentos com a técnica devem ser implementados no sentido de avaliar novas metodologias para separar sementes a partir dos limites do padrão oficial.

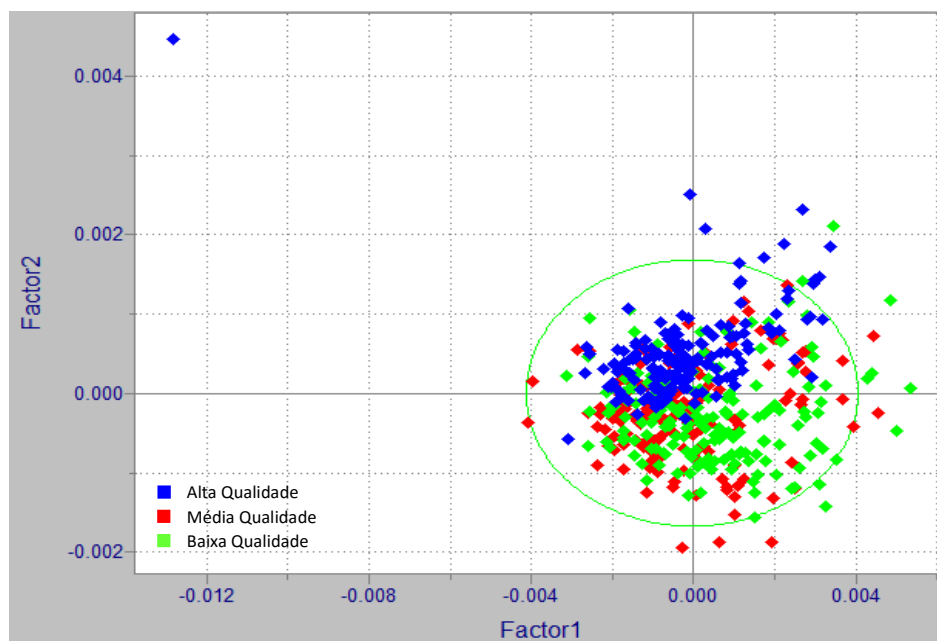


Figura 2. Gráfico de escores obtidos por PCA dos espectros de infravermelho das sementes de café agrupadas pela sua qualidade fisiológica
Fonte: Do autor (2016)

Em diferentes trabalhos, verifica-se a utilização desse método na avaliação da composição química do café. Essa técnica foi utilizada na discriminação de amostras de café torrado obtidas de frutos de diferentes estádios de maturação e tipos de processamentos pós-colheita, por meio de sua composição volátil (ARRUDA; HOVELL; REZENDE, 2011).

Classificação por PLS-DA

Analisando-se os resultados das classes, observa-se que as sementes com alta germinação foram classificadas corretamente em quase 100% dos casos. Das 170 sementes de alta qualidade fisiológica, 167 foram classificadas corretamente, apenas 1 classificada como de baixa qualidade fisiológica e 2 como material diferente do estudado. Já, para sementes de qualidade intermediária, a classificação não foi precisa, sendo que das 170 sementes analisadas no modelo apenas 86 foram corretamente classificadas, 44 foram classificadas como de baixa qualidade e 40 como um material diferente do estudado. Assim como as sementes de qualidade intermediária, as sementes de baixa qualidade não foram precisamente classificadas, sendo que das 170 sementes utilizadas no teste apenas 42 foram corretamente classificadas, 62 foram classificadas como de qualidade intermediária e outras 66 como material diferente do estudado.

Tabela 2. Sementes das cultivares de café, classificadas quanto ao nível de qualidade fisiológica, por meio da PLS-da, com o auxílio da técnica de infravermelho próximo.

	Lotes utilizados	Classificação realizada			Não classificadas/ Total
		Alta	Média	Baixa	
Qualidade	Alta	167	0	1	2/170
	Media	0	86	44	40/170
	Baixa	0	62	42	66/170

Fonte: Do autor (2016)

Na validação do modelo onde foram utilizadas 40 sementes de cada nível de qualidade (Tabela 3), apenas as sementes de alta qualidade foram classificadas corretamente. Em relação às sementes de alta qualidade, as 40 sementes usadas para validação foram classificadas corretamente e o teste teve 100% de acerto. Já, para as sementes de qualidade intermediária, das 40 sementes testadas 28 sementes foram classificadas corretamente, 5 como de baixa qualidade e 7 como material diferente do estudado. Para validação das sementes de baixa qualidade o teste não foi preciso sendo que apenas 6 sementes foram classificadas corretamente, outras 19 foram classificadas como de qualidade intermediária e 15 como material diferente do estudado.

Tabela 3. Número de sementes utilizadas e classificadas para validação do modelo de classificação das sementes quanto ao nível de qualidade fisiológica.

	Lotes utilizados	Classificação realizada			Não classificadas/ Total
		Alta	Média	Baixa	
Qualidade	Alta	40	0	0	0/40
	Media	0	28	5	7/40
	Baixa	0	19	6	15/40

Fonte: Do autor (2016)

Para sementes com alta qualidade fisiológica (Figura 3a), a região do espectro com maior peso na classificação é a região de 7025 cm^{-1} , que corresponde ao Ar-OH. Já os comprimentos de onda com maior peso referentes às sementes de qualidade intermediária (Figura 3b), o comprimento de onda com maior peso para sua classificação foi de 8641 cm^{-1} , que corresponde ao CH_3 , e as sementes de baixa qualidade (Figura 3c) obtiveram o comprimento de onda com maior peso o de 7150 cm^{-1} , que corresponde a CH_2 relações entre comprimento de onda e componente principal observadas segundo Siesler et al. (2002).

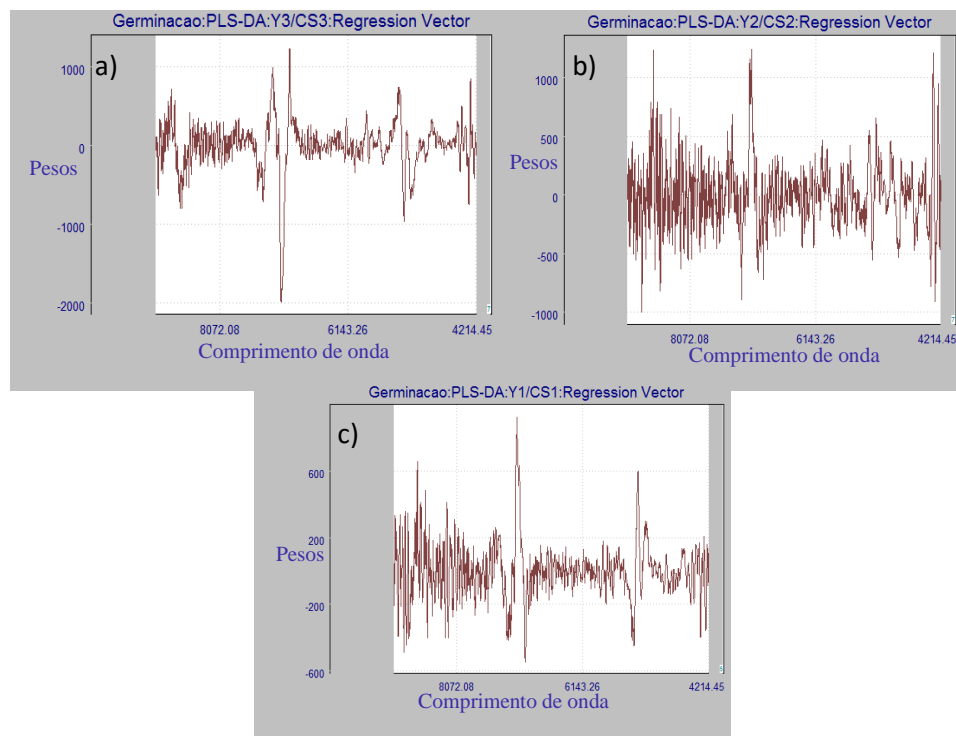


Figura 3. Pesos dos comprimentos de onda (cm^{-1}) referentes aos diferentes níveis de qualidades fisiologica estudada. a) alta qualidade, b) qualidade média e c) baixa qualidade

Fonte: Do autor (2016)

Essas discriminações dos comprimentos de onda com maior peso para cada grupo, podem servir de referencial para a distinção do nível de qualidade de sementes de café, por meio de análise química, considerando o composto identificado no espectro.

4. CONCLUSÃO

Utilizando as análises quimiométricas e o infravermelho próximo, é possível separar sementes de café com nível de qualidade superior a 90%, das sementes com qualidade inferior.

REFERÊNCIAS

ARRUDA, N. P.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Discriminação entre estádios de maturação e tipos de processamento de pós-colheita de cafés arábica por microextração em fase sólida e análise de componentes principais. **Química Nova**, São Paulo, v. 34, n. 5, p. 819-824, set. 2011.

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

BRAZ, M. R. S.; ROSSETTO, C. A. V. **Condicionamento fisiológico na germinação e no vigor de sementes armazenadas de café**. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 7, p. 1849-1856, 2008.

GUIMARÃES, C. G. et al. Minimum period to assess the potential of germination of coffee seeds. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 35, n. 3, p. 347-352, 2013.

ROSA, S. D. V. F. et al. Staging coffee seedling growth: a rationale for shortening the coffee seed germination test. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 38, n. 2, p. 421-431, 2010.

SALES, J. F. et al. Germinação de sementes de café (*Coffea arabica* L.) submetidas a diferentes concentrações e tempos de embebição em celulase. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 3, p. 557-564, 2003.

SIESLER, H. W. et al. **Near-infrared spectroscopy: principles, instruments, applications**. Weinheim: Wiley-VCH Verlag, 2002. 349 p.