



Physiological quality in maize seeds using conventional methods and NIR spectroscopy

Qualidade fisiológica de sementes de milho por métodos convencionais e espectroscopia NIR

Richard Alcides Molina Alvarez*¹, Gabriel Castanheira Guimarães², Sandra Cátia Pereira Uchôa³, Daniel Augusto Schurt⁴, Sonicley da Silva Maia¹, Natalia Viera de Sousa⁵, Hilda Beatriz Quevedo Andino⁶

Abstract: Maize is one of the most important cereals, and stands out for its wide genetic diversity, adaptation to the most diverse climate conditions, and being, both directly and indirectly, the most basic food source of man. Globally, production is dependent on seed quality. Known methodologies for evaluating seed quality require improvement in developing technologies capable of achieving, in less time, results for the targets under evaluation. The aim of this study, therefore, was to compare conventional vigour testing with the ability of NIR technology to classify the physiological quality of maize seeds, cv. DKB-290-HS. For the experiment, which was conducted in a completely randomised design (CRD), six Batches of 200 seeds were used, with four replications. Conventional methods of evaluating seed vigour were used in the study. For the evaluation using the near-infrared (NIR) method, the seeds were placed with the embryo facing the source of electromagnetic waves. The resulting spectra were analysed by the Pirouette software using the PLS-DA method. The conventional methods for vigour, and the NIR technique both efficiently detected the levels of physiological quality. NIR also revealed the differences between Batches, classifying the physiological quality of maize seeds, cv. DKB-290-HS, into different levels quickly and efficiently.

Key words: Intact seed. Seed analysis. Vigour testing. *Zea mays*.

Resumo: O milho é um dos cereais mais importantes e se destaca por possuir ampla diversidade genética, adaptação às mais diversas condições climáticas, sendo a fonte alimentar mais básica, direta e indireta, do ser humano. A produção é dependente da qualidade das sementes ao nível global. As metodologias conhecidas para avaliar a qualidade das sementes exigem aprimoramento no desenvolvimento de tecnologias capazes de alcançar, em menor tempo, resultados dos alvos em avaliação. Assim, objetivou-se nesse estudo comparar os testes convencionais de vigor com a capacidade da tecnologia NIR para classificar a qualidade fisiológica de sementes de milho, cultivar cv. DKB-290-HS. Para o experimento, conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), foram empregados seis Lotes com 200 sementes, cada, e quatro repetições. Empregou-se no estudo os métodos convencionais para avaliação do vigor das sementes. Na avaliação pelo método do infravermelho próximo (NIR), as sementes foram colocadas com o embrião voltado à fonte de onda eletromagnética. Os espectros obtidos foram analisados pelo software Pirouette, utilizando o método PLS-DA. Os métodos convencionais de vigor e a técnica do NIR detectaram eficientemente os níveis de qualidade fisiológica. O NIR, também, revelou diferenças entre Lotes e classificou em diferentes níveis a qualidade fisiológica das sementes de milho, cv. DKB-290-HS, de modo rápido e eficiente.

Palavras-chave: Análise de sementes. Semente intacta. Testes de vigor. *Zea mays*.

*Corresponding author

Submitted for publication on 08/11/2022, approved on 20/03/2023 and published on 12/04/2023

¹Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, POSAGRO/UFRR, Boa Vista, RR, Brasil, 68.300-000. E-mail: richard.molina@ufrr.br

²UPesquisador Associado, Universidade Federal de Lavras, Departamento de Agricultura, Lavras, Minas Gerais, Brasil. E-mail: guimaraes.gabrielc@gmail.com

³Professora Titular da Universidade Federal de Roraima, POSAGRO/UFRR, Boa Vista, RR, Brasil. E-mail: sandra.uchoa@ufrr.br

⁴Eng. Agrônomo, Pesquisador da Embrapa, Boa Vista, RR. E-mail: daniel.schurt@embrapa.br

⁵Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, POSAGRO/UFRR, Boa Vista, RR, Brasil. E-mail: sony_maia@hotmail.com

⁶Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, POSAGRO/UFRR, Boa Vista, RR, Brasil. E-mail: nataliavieirasousa29@gmail.com

⁶Eng. Agrônoma. Sector San Felipe, Latacunga - Ecuador. E-mail: hilda.quevedo4627@utc.edu.ec

INTRODUCTION

By using quality seeds, it is possible to predict the course of any future crop throughout its cycle. Depending on the level of seed technology, the producer will have a crop of low, medium or high technological level. The adoption of high-technology seeds, together with proper plant management, has allowed Brazil to be ranked among the top three global producers and exporters of maize (PEREIRA FILHO; BORGHI, 2022).

The genetic potential of the seed defines the productivity of the plant, and is one of the areas available to small farmers (BEZERRA *et al.*, 2022). Many factors affect seed quality, such as the physical, physiological and phytosanitary, and express the vigour of a Batch of seeds. Raad *et al.* (2022) highlight the numerous factors that reduce the physiological quality of maize seeds, such as post-harvest mechanical damage, storage, pests and diseases, all of which seriously affect vigour.

Various tests are routinely used in the laboratory to evaluate seed vigour; however, some are complex and time consuming. Therefore, the focus of researchers is to respond to the most important demands of the seed sector, promoting promising methods of achieving the same results in less time (VIEIRA *et al.*, 2020).

Near infrared (NIR) technology, together with conventional tests that are internationally accepted by ISTA and AOSA, and adopted in the methodology of Krzyzanowskil *et al.* (1999), has sought to improve the collection of data that reveal the physiological quality of seeds. NIR is based on the absorption of energy by various bonds, such as C-H, C-C, C-N and O-H in the near-infrared spectral range (700-2500 nm). The mineral composition of an organic matrix can be estimated by NIR due to the association between minerals and organic functional groups, or the organic matrix itself (FASSIO *et al.*, 2015). The advantages of this technology are ease in preparing the samples, little operator training, speed in obtaining the data, low operating costs, and the possibility of preserving the sample intact allowing it to be used for other purposes, important in the case of seeds (AMBROSE *et al.*, 2016).

INTRODUÇÃO

A semente de qualidade consegue prever toda a trajetória da sua futura lavoura, durante todo o ciclo. Dependendo do nível de tecnologia da semente, o produtor terá uma lavoura de baixo, médio ou alto nível tecnológico. Portanto, a adoção de sementes de alta tecnologia, aliada ao manejo adequado das plantas, tem permitido classificar o Brasil entre os três primeiros produtores e exportadores globais de milho (PEREIRA FILHO; BORGHI, 2022).

O potencial genético da semente é definidor da produtividade da planta, sendo este um dos insumos que está ao alcance do pequeno agricultor (BEZERRA *et al.*, 2022). Há muitos fatores que afetam a qualidade das sementes, como físicos, fisiológicos e fitossanitários, expressando o vigor do Lote de semente. Raad *et al.* (2022) ressaltam os inúmeros fatores que reduzem a qualidade fisiológica das sementes de milho, como: dano mecânico, armazenamento, pragas e doenças, pós-colheita, que afetam seriamente o vigor.

Routineiramente, vários testes são utilizados no laboratório para avaliar o vigor das sementes, porém alguns são complexos e demorados. Logo, o foco dos pesquisadores é responder às mais altas exigências do setor sementeiro, promovendo métodos promissores para alcançar os mesmos resultados em menor tempo (VIEIRA *et al.*, 2020).

A tecnologia do infravermelho próximo (NIR), acompanhada por testes convencionais aceitos internacionalmente pela ISTA e AOSA, os quais são adotados na metodologia de Krzyzanowskil *et al.* (1999), tem buscado aprimorar a obtenção de dados que revelem a qualidade fisiológica de sementes. O NIR baseia-se na absorção de energia por várias ligações, tais como C-H, C-C, C-N e O-H. Na faixa espectral do infravermelho próximo (700-2500 nm). A composição mineral de uma matriz orgânica pode ser estimada por NIR devido à associação entre minerais e grupos funcionais orgânicos ou a própria matriz orgânica (FASSIO *et al.*, 2015). As vantagens dessa tecnologia são: facilidade na preparação das amostras, pouco treinamento do operário, rapidez na obtenção de dados, baixos custos de operação e capacidade de preservar a amostra intacta, importante no caso de sementes, permitindo utilizar para outros fins (AMBROSE *et al.*, 2016).

The NIR has been used in several studies as a tool to discriminate between maize kernels damaged by heat and frost, and define the ideal harvest time for hybrid maize seeds (GU *et al.*, 2017), and may be an option in species that demand high technology, such as those used in cotton production, where high-quality seeds are required to obtain satisfactory results in the field (GIRO *et al.*, 2020). NIR studies of the maize kernel have mainly focused on a quantitative analysis of the oil, protein and starch content. Other studies have focused on detecting seed viability (JIA *et al.*, 2016).

The use of NIR has proved to be efficient in relation to traditional techniques, but stands out for its speed in obtaining results and for preserving the seeds: very useful when carrying out studies with seeds of high genetic value, with species where it is difficult to obtain the seeds, or simply for reusing the material in other studies. The aim here, therefore, was to compare conventional vigour testing with the ability of NIR technology to classify the physiological quality of maize seeds, cv. DKB-290-HS.

MATERIAL AND METHODS

The research was carried out at the Central Laboratory for Seed Analysis at the Department of Agriculture of the Federal University of Lavras - UFLA, in Lavras, in the state of Minas Gerais, located at 21°13'33.3" S and 44°58'19.3" W. The vigour tests were studied under controlled conditions in the laboratory, in seedbeds and in a growth chamber.

Characterising the work sample

Simple hybrid maize seeds, cv. DKB 290-HS, were used, provided by the Central Laboratory for Seed Analysis of the Federal University of Lavras. The seeds were classified into six Batches, each Batch containing approximately 700 g of seeds, characterised for time, temperature and humidity, as described by Krzyzanowskil *et al.* (1999). In addition, the initial humidity was determined using the oven method at 105 ± 3 °C for 24 h (BRASIL, 2009).

O NIR vem sendo utilizado, em várias pesquisas, como ferramenta para discriminar grãos de milho com danos causados pelo calor e geada e definir época ideal de colheita para sementes de milho híbrido (GU *et al.*, 2017). Pode ser uma opção para espécies que demandam alta tecnologia, como a empregada na produção do algodão, que requer sementes de alta qualidade para obter resultados satisfatórios no campo (GIRO *et al.*, 2020). Estudos com NIR para grãos de milho concentraram-se, principalmente, em análises quantitativas de teor de óleo, proteína e amido. Outros estudos focaram na detecção de viabilidade de sementes (JIA *et al.*, 2016).

A técnica empregando NIR tem-se mostrado eficiente em relação às técnicas tradicionais, mas ela se destaca pela rapidez na obtenção de resultados e, ainda, preservação das sementes, muito útil quando se executam trabalhos com sementes de alto valor genético, espécies de difícil obtenção de sementes ou simplesmente por reaproveitar esse material para outros estudos. Assim, objetivou-se comparar os testes convencionais de vigor com a capacidade de tecnologia NIR para classificar a qualidade fisiológica de sementes de milho, cv. DKB-290-HS.

MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada no Laboratório Central de Análise de Sementes do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras - UFLA, em Lavras, Minas Gerais - MG, situado nas coordenadas 21°13'33.3"S e 44°58'19.3"W. Os testes de vigor foram estudados em condições controladas de laboratório, canteiros e câmara de crescimento vegetal.

Caraterização da amostra de trabalho

As sementes utilizadas foram de milho híbrido simples, cultivar DKB 290-HS, disponibilizadas pelo Laboratório Central de Análise de Sementes da Universidade Federal de Lavras. As sementes foram classificadas em seis Lotes, contendo cada Lote aproximadamente 700 g de semente, caracterizadas em função do tempo, temperatura e umidade, conforme descrito por Krzyzanowskil *et al.* (1999). Além disso, determinou-se a umidade inicial, pelo método da estufa a 105 ± 3 °C por 24 h (BRASIL, 2009).

Conventional vigour testing

The following tests were carried out as per the methodology proposed by Krzyzanowski *et al.* (1999): First germination count (FGC), using 50 seeds and four replications, employing the standard germination test, with the count taking place on the fourth day after setting up the test; Germination (G), using 50 seeds and four replications, with the count taking place on the seventh day - this test is usually evaluated after the FGC; Accelerated ageing (AA), using approximately 400 seeds placed in a single layer on a stainless steel screen in a Gerbox containing 75 mL of water, for 48 h at 43 °C, followed by evaluation on the seventh day using the standard germination test; Cold test (CT), using four replications of 50 seeds placed in trays containing a 1:2 substrate (soil and sand) and water at field capacity, for seven days at 10°C, then placed in a growth chamber at 25°C, with emergence evaluated after seven days; Field emergence (FE), using four replications of 50 seeds placed in seedbeds and evaluated after 15 days; Speed of emergence (SEI) was also studied, taking advantage of the field emergence test, and recording the number of emerged plants daily up to the 15th day. The speed of emergence index (SEI) and field emergence (FE) were calculated based on the formula proposed by Maguire (1962).

Near-Infrared Spectroscopy (NIR)

Equipment from the Bruker® company was used to evaluate the seeds by near-infrared spectroscopy (NIR). The seeds were placed with the embryo directed towards the light beam, by means of which the vibrational spectra of the C-H, N-H, O-H and S-H bonds were captured in the spectral range of 10,000 to 4,000 cm⁻¹ (PANERO *et al.*, 2022) with the aid of an integrating sphere. The reading was obtained at a resolution of 4 cm⁻¹ with 64 replications per seed.

Some data were eliminated from the spectral region at the start and end of the NIR bands, with the aim of purifying any atypical data generated while reading the samples. The Batches were then compared by the PLS-DA method, using the prediction of both the model (NIR-M) and the validation (NIR-V).

Testes convencionais de vigor

Conforme a metodologia proposta por Krzyzanowski *et al.* (1999), foram realizados os seguintes testes: Primeira contagem de germinação (PCG), empregando-se 50 sementes e 4 repetições, utilizando o teste padrão de germinação e contagem ao quarto dia após montagem do teste; Germinação (G), foram empregadas 50 sementes e 4 repetições, a contagem decorre ao sétimo dia, esse teste é avaliado geralmente após a PCG; Envelhecimento acelerado (EA), empregando-se 400 sementes, aproximadamente, colocadas em camada única sobre tela inox, e caixa gerbox com 75 mL de água por 48 h e 43 °C, em seguida, avaliou-se pelo teste padrão de germinação ao sétimo dia; Teste de frio (TF), empregando-se 50 sementes e 4 repetições, montadas em bandejas com substrato 1:2 (solo e areia), com água a capacidade de campo, por 7 dias a 10 °C, em seguida, foram montadas em câmara de crescimento a 25 °C e avaliação da emergência aos 7 dias; Emergência em campo (EC), empregando-se 50 sementes e 4 repetições, montado em canteiros e avaliado aos 15 dias; Velocidade de emergência (IVE). Aproveitando ao teste de emergência em campo, foi estudado o IVE, anotando-se diariamente o número de plantas emergidas, até 15 dias. O índice de velocidade de emergência (IVE) e emergência em campo (EC) foi calculado empregando-se o princípio da fórmula proposta por Maguire (1962).

Espectroscopia do infravermelho próximo (NIR)

A avaliação da semente por meio da espectroscopia de infravermelho próximo (NIR) empregou o equipamento da marca Bruker®. As sementes foram colocadas com o embrião direcionado ao feixe de luz, mediante a qual se capturou os espectros vibracionais das ligações C-H, N-H, O-H e S-H, na faixa espectral de 10.000 a 4.000 cm⁻¹ (PANERO *et al.*, 2022), com o auxílio de esfera de integração. A leitura foi obtida com resolução de 4 cm⁻¹ e 64 repetições por semente.

Alguns dados foram eliminados da região espectral no começo e no final das bandas NIR, com o propósito de purificar os dados atípicos gerados durante o processo de leitura das amostras, em seguida, procedeu-se à comparação dos Lotes pelo método PLS-DA, utilizando predição tanto pelo modelo (NIR-M) quanto pela validação (NIR-V).

Experiment

The experiment was carried out in a completely randomised design (CRD), with six treatments (seed Batches) and four replications. To estimate the physiological quality of the maize seeds, a model (M) was used with data from the spectra of 150 seeds, and validated (V) with data from the spectra of 50 seeds, to give a total of 200 seeds, a quantity which was also used in all the conventional vigour tests.

Statistical analysis

The results of the seed quality tests were submitted to analysis of variance (ANOVA), and the mean values grouped by the Scott-Knott test, both at 5% probability. The data obtained from the NIR were analysed by PLS-DA multivariate regression, with the aid of the Pirouette® software (HULIANG *et al.*, 2016; BORILLE *et al.*, 2017). The aim was to determine the correlation between the treatments and the variables under analysis; for this purpose, principal component multivariate analysis was applied using the Infostat® statistical package (DI-RIENZO, 2008).

RESULTS AND DISCUSSION

Physiological quality in maize seeds

The conventional variables used to analyse the physiological potential of the seeds, as well as the PLS-DA method, allowed the data obtained using NIR to be predicted, distinguishing between the levels of vigour of the six Batches of maize seeds, cv. DKB-290-HS used in the present research (Table 1).

As with the data obtained using NIR for the Batches of maize seeds, similar distributions were found in terms of their spectra (Figure 1). The attempt to validate the prediction by reserving the spectral data of a known number of seeds (50) resulted in the same trend as the results expressed by the predictive model, resembling the values obtained in each of the physiological tests, thereby demonstrating that NIR spectroscopy was also able to detect differences in the physiological quality of maize seeds. Similar research suggests applying this method to study seeds by NIR, using PLS-DA (GIRO *et al.*, 2020).

Experimento

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com seis tratamentos (Lotes de sementes) e quatro repetições. Para estimar a qualidade fisiológica das sementes de milho, utilizou-se um modelo (M) com os dados dos espectros obtidos de 150 sementes e validados (V) com os dados dos espectros obtidos de 50 sementes, completando um total de 200 sementes, quantidade que também se utilizou para todos os testes de vigor convencionais.

Análise Estatística

Os resultados dos testes de qualidade de sementes foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e as médias agrupadas pelo teste de Scott-Knott, ambos a 5% de probabilidade. Os dados obtidos do NIR foram analisados por regressão multivariada PLS-DA, com o auxílio do software Pirouette® (HULIANG *et al.*, 2016; BORILLE *et al.*, 2017). Buscou-se determinar a correlação entre os tratamentos e as variáveis analisadas, para tanto, aplicou-se a análise multivariada de componentes principais, com auxílio do pacote estatístico Infostat® (DI-RIENZO, 2008).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Qualidade fisiológica de sementes de milho

As variáveis convencionais utilizadas para analisar o potencial fisiológico da semente, assim como o método PLS-DA permitiu fazer predições dos dados obtidos pelo NIR, distinguindo os níveis de vigor entre os seis Lotes de sementes de milho, cv. DKB-290-HS, utilizados na presente pesquisa (Tabela 1).

Conforme os dados obtidos pelo NIR, para os Lotes de sementes de milho, verificam-se distribuições semelhantes quanto aos seus espectros (Figura 1). A tentativa de validação da predição com a metodologia de reservar os dados espectrais de uma quantidade conhecida de sementes (50 sementes) apresentou como resultado a mesma tendência dos resultados expressos na predição pelo modelo, assemelhando os valores obtidos em todos os testes fisiológicos, demonstrando assim que a espectroscopia NIR também conseguiu detectar as diferenças quanto à qualidade fisiológica de sementes de milho. Trabalhos similares sugerem a aplicação desse método para estudar sementes pelo NIR, utilizando PLS-DA (GIRO *et al.*, 2020).

Table 1 - Physiological quality in six Batches of maize seeds, cv. DKB-290-HS, using different vigour tests and near-infrared spectroscopy (NIR)

Tabela 1 - Qualidade fisiológica de seis Lotes de sementes de milho, cv. DKB-290-HS, por diferentes testes de vigor e espectroscopia do infravermelho próximo (NIR)

Batch	HMD%	FGC	G	AA	CT	FE	SEI	NIR-M	NIR-V
		(%)							
Batch 1	8.0	72.5	98.5	88.0	94.5	97.0	72.73	68.0	78.0
Batch 2	6.5	63.0	97.5	83.0	90.5	96.5	70.73	32.7	12.0
Batch 3	7.0	58.0	93.5	73.5	88.0	94.5	70.67	22.7	18.0
Batch 4	7.0	47.0	91.5	59.0	82.0	90.0	64.00	46.7	22.0
Batch 5	7.1	37.5	70.0	42.5	62.0	68.0	47.87	35.3	22.0
Batch 6	7.0	27.5	64.5	29.5	50.5	49.5	35.27	40.0	34.0
CV%		9.5	6.8	12.83	11.42	5.51	6.17	-	-

Physiological quality of maize seeds, cv. DKB-290-HS, expressed in percentages of vigour and viability, both in conventional tests and by the NIR method.

Qualidade fisiológica de sementes de milho, cv. DKB-290-HS, expressadas em percentagens de vigor e viabilidade, tanto em testes convencionais, quanto o método NIR.

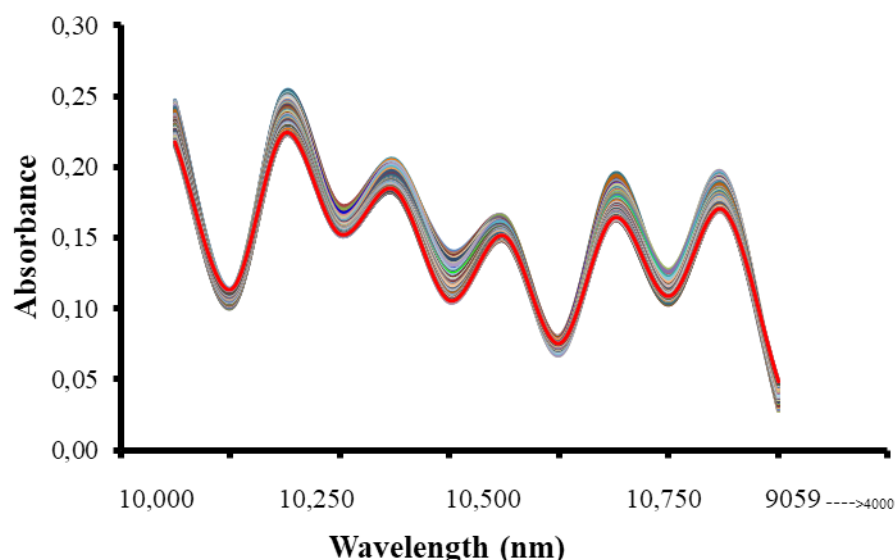


Figure 1 - Spectra of six Batches of maize seeds, cv. DKB-290-HS, submitted to near-infrared spectroscopy.

Figura 1 - Espectros de seis Lotes de sementes de milho, cv. DKB-290-HS, submetidas ao infravermelho próximo.

From the principal component analysis (Figure 2), it can be seen that the variables considered efficient and responsive are found in the first quadrant, presenting above-average values for the two Cartesian axes, showing high efficiency for the vigour tests, and highlighting the variables NIR-V, NIR-M and FGC influenced by Batch 1.

Para análise de componentes principais (Figura 2), verifica-se que no primeiro quadrante estão presentes as variáveis consideradas eficientes e responsivas, as quais apresentaram valores acima da média para os dois eixos cartesianos, com alta eficiência para os testes de vigor, destacando as variáveis NIR-V, NIR-M e PCG, com influência do Lote 1.

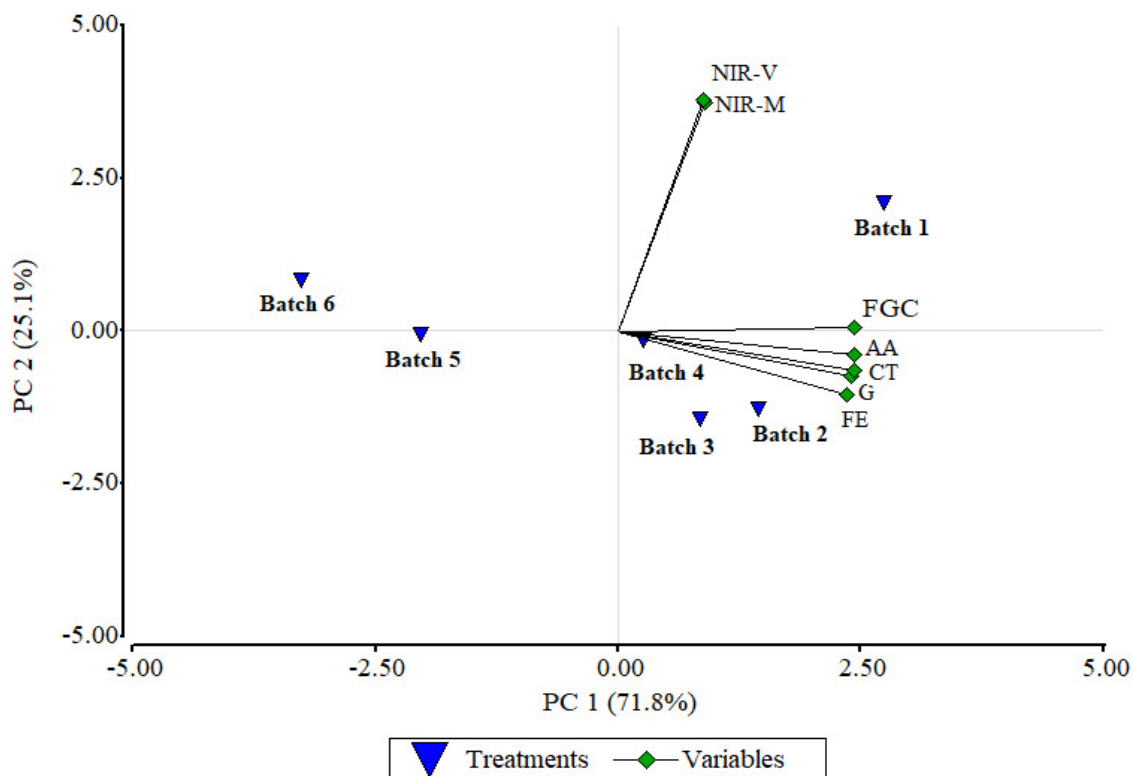


Figure 2 - Principal component analysis of the variables as a function of six Batches of maize seeds, cv. DKB-290-HS, using the NIR method and seed vigour testing.

* FGC - first germination count, G - germination, AA - accelerated ageing, CT - cold test, FE - seedling field emergence, SEI - speed of emergence.

Figura 2 - Análise de componentes principais das variáveis em função de seis Lotes de sementes de milho, cv. DKB-290-HS, pelo método NIR e testes de vigor de sementes.

* PCG - primeira contagem de germinação, G - germinação, EA - envelhecimento acelerado, TF - teste de frio, EC - emergência de plântulas em campo, IVE - velocidade de emergência.

In the second quadrant, variables AA, CT, G and FE, influenced by Batches 2, 3 and 4, are classified as non-efficient or responsive, i.e. with values below average for the abscissa and above average for the ordinate axis, showing low usage efficiency.

No segundo quadrante, as variáveis EA, TF, G e EC, influenciadas pelos Lotes 2, 3 e 4, são classificadas como não-eficiente e responsiva, ou seja, possui valores abaixo da média para o eixo das abscissas e acima para o eixo das ordenadas, apresentando baixa eficiência de utilização.

Physiological quality using NIR and the first germination count test (FGC)

The first germination count (FGC) is considered a vigour test that affords a quick idea of the quality of the seed Batch based on the force that triggers seed germination (MARCOS-FILHO *et al.*, 2015). It can be seen that when the Batches were submitted to this test, only Batch 1 was shown to be more vigorous (72.5%), the other Batches being inferior. Using the NIR method, the model (M) is capable of accurate predictions, following the trend of the germination test (Figure 3).

Qualidade fisiológica pelo NIR e teste da primeira contagem de germinação (PCG)

O teste de primeira contagem de germinação (PCG) é considerado um teste de vigor que fornece rápida percepção da qualidade do Lote de semente, baseado na força de arranque na germinação das sementes (MARCOS-FILHO *et al.*, 2015), assim, pode-se observar que quando os Lotes foram submetidos a esse teste, somente o Lote 1 é mostrado como mais vigoroso (72,5%), os demais Lotes apresentam inferioridade. Pelo método NIR, o modelo (M) consegue prever com precisão, acompanhando a tendência do teste de germinação (Figura 3).

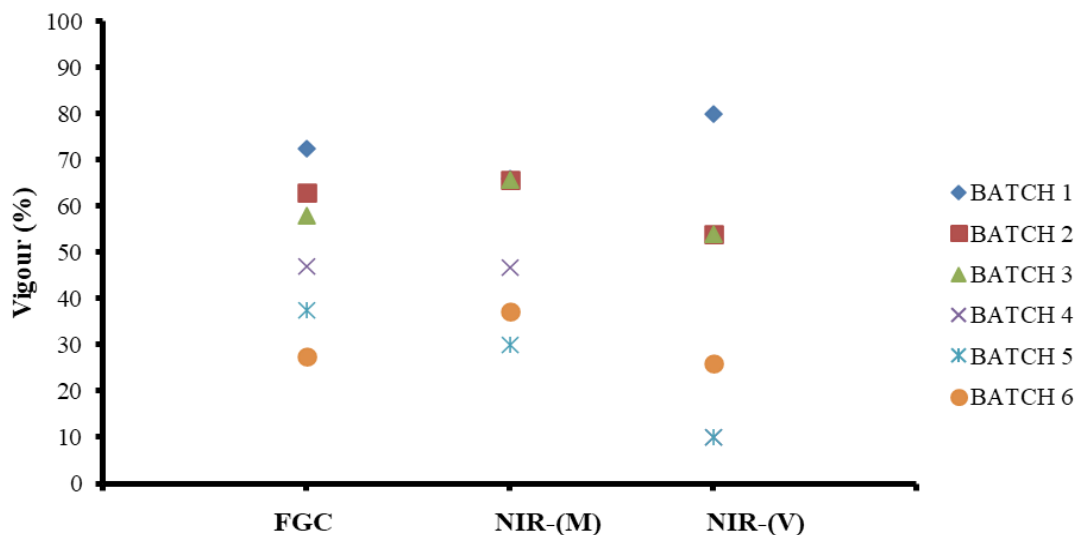


Figure 3 - Physiological quality in Batches of maize seeds, cv. DKB-290-HS, evaluated using the PLS-DA model from NIR data based on the first germination count test (FGC).

Figura 3 - Qualidade fisiológica de Lotes de sementes de milho, cv. DKB-290-HS, avaliadas pelo modelo PLS-DA dos dados NIR com base no teste de primeira contagem de germinação (PCG).

On average, the NIR method, using the prediction of the model (M), follows the trend of the FGC test; on the other hand, compared to the conventional FGC test, the validation (V) overestimated vigour in the control (Batch 1) by 80% and underestimated it in Batch 5 by 10%.

O método NIR, utilizando a predição pelo modelo (M), em média, segue tendência do teste (PCG), por outro lado, a validação (V) superestimou (80%) o vigor na testemunha (Lote 1) e subestimou (10%) no Lote 5, quando comparado ao teste convencional (PCG).

Physiological quality using the NIR method and the germination test

Using the values from the germination test, PLS-DA was carried out using the NIRS spectra to predict the classification of the samples based on their physiological quality (Figure 4).

Seed Batches with the same germination but different levels of vigour will often produce equal emergence under field conditions; however, high-vigour Batches have an advantage when conditions are less than ideal. On the other hand, the germination test cannot provide data related to seed vigour (DIAS *et al.*, 2015).

The NIR method has been used to determine viability in maize seeds and to apply predictive models to accurately identify viable and non-viable seeds so as to predict from 27.5% germination to 96%, 100% and 80%, depending on the model applied (JIA *et al.*, 2016).

Qualidade fisiológica pelo método NIR e teste de germinação

Utilizando os valores do teste de germinação, realizou-se a PLS-DA dos espectros NIRS para prever a classificação das amostras quanto a sua qualidade fisiológica (Figura 4).

Os Lotes de sementes com a mesma germinação, mas em diferentes níveis de vigor, muitas vezes produzirá igual emergência em condições de campo, mas os Lotes de alto vigor terão vantagem quando as condições forem inferiores ao ideal. Por outro lado, o teste de germinação não consegue fornecer dados relacionados ao vigor das sementes (DIAS *et al.*, 2015).

O método NIR tem sido utilizado para determinar a viabilidade de sementes de milho e aplicar modelos preditivos para identificar sementes viáveis e não viáveis com precisão que pode prever de 27,5% de germinação para 96; 100 e 80%, dependendo do modelo aplicado (JIA *et al.*, 2016).

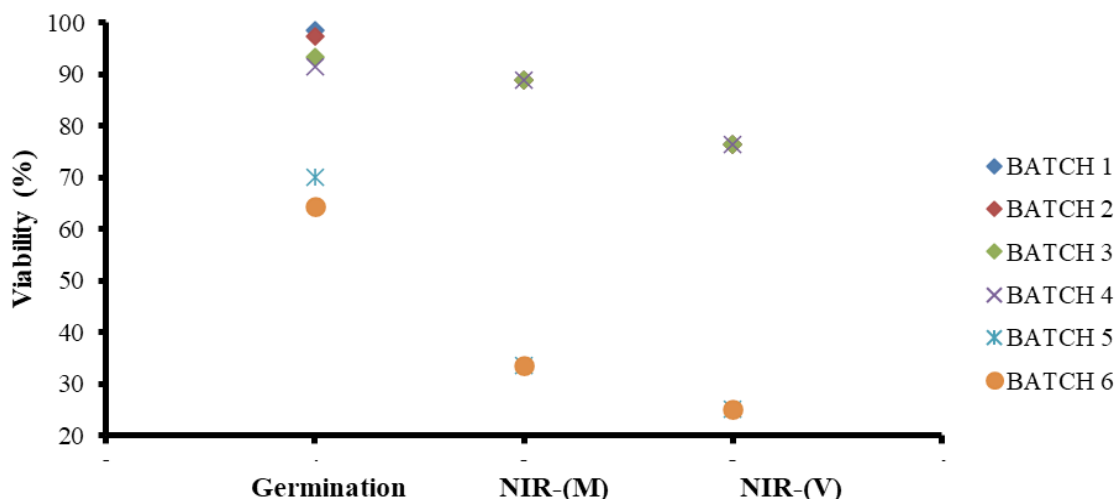


Figure 4 - Physiological quality in Batches of maize seeds, cv. DKB-290-HS, evaluated using the PLS-DA model from NIR data based on the germination test (G).

Figura 4 - Qualidade fisiológica de Lotes de sementes de milho, cv. DKB-290-HS, avaliadas pelo modelo PLS-DA dos dados NIR, com base no teste de germinação (CFG).

Physiological quality using the NIR method and the accelerated ageing test (AA)

High-vigour seeds ensure better establishment in the field, with the developed plants having a greater advantage; generally, the purpose of vigour testing is to determine the degree of physiological quality of seeds obtained under different conditions (OMURA *et al.*, 2020). Evaluating vigour, considered fundamental and sensitive in maize seeds, is generally employed using the accelerated ageing test for this crop. (VIEIRA *et al.*, 2020).

In Figure 5, the AA test is able to detect with high precision the physiological potential shown by the six Batches of maize seeds, fully agreeing with the other tests; while NIR, used in applying the prediction of the model, follows the trend of the conventional test, despite the different data.

In research developed by Sena *et al.*, (2017) to evaluate the physiological quality of maize seeds using the AA test (accelerated ageing), they detected only one batch (L1) with Better performance, classified two Batches as intermediate, and one batch (L20) as having the worst performance, similar to the results obtained in the test for electrical conductivity in the same experiment. Using the NIR method, the prediction of the model (M) resembles the response obtained by the conventional method; when applied to validating the predictive model (V), it diverges from the trend seen in the conventional test (AA).

Qualidade fisiológica pelo método NIR e teste de envelhecimento acelerado (EA)

Sementes com alto vigor garante melhor estabelecimento em campo, e as plantas desenvolvidas apresentam maiores vantagens, rotineiramente, o objetivo dos testes de vigor é determinar o grau de qualidade fisiológica das sementes obtidas sob diversos fatores (OMURA *et al.*, 2020). Rotineiramente, o teste de envelhecimento acelerado utiliza-se da avaliação de vigor em sementes de milho, considerado como fundamental e sensível para essa cultura (VIEIRA *et al.*, 2020).

Na Figura 5, o teste de EA consegue detectar com alta precisão o potencial fisiológico apresentado pelos seis Lotes de sementes de milho, concordando plenamente com os demais testes, quando o NIR na aplicação da predição pelo modelo consegue acompanhar a tendência do teste convencional, embora os dados não sejam iguais.

Em uma pesquisa desenvolvida por Sena *et al.* (2017), para avaliar qualidade fisiológica de sementes de milho, utilizando o teste de EA – envelhecimento acelerado, detectaram apenas um Lote (L1) com melhor desempenho e classificaram 2 Lotes como intermédios e um lote (L20) com o pior desempenho, acompanhando os resultados obtidos no teste de condutividade elétrica no mesmo experimento. Pelo método NIR, a predição utilizando o modelo (M) consegue se assemelhar à resposta obtida pelo método convencional, quando aplicada a predição da validação (V), decorre em se afastar da tendência encontrada no teste convencional (EA).

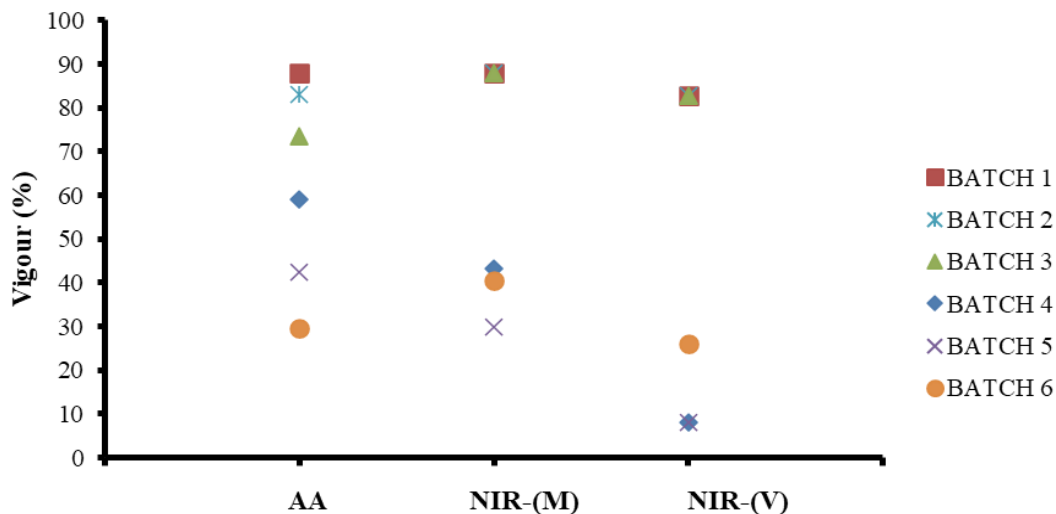


Figure 5 - Physiological quality in Batches of maize seeds, cv. DKB-290-HS, evaluated using the PLS-DA model from NIR data based on the accelerated ageing test (AA).

Figura 5 - Qualidade fisiológica de Lotes de sementes de milho, cv. DKB-290-HS, avaliadas pelo modelo PLS-DA dos dados NIRS com base no teste de envelhecimento acelerado (EA).

The companies that produce hybrid maize seeds are increasingly convinced of the need to raise the quality of the seeds they produce, with the germination test, cold test and accelerated ageing test being the three most important tests for predicting seed quality (GU *et al.*, 2017).

As empresas produtoras de sementes de milho híbrido estão cada vez mais convencidas da necessidade de aumentar a qualidade das sementes que produzem. Sendo que o teste de germinação, teste de frio e envelhecimento acelerado são os três testes mais importantes para prever a qualidade da semente (GU *et al.*, 2017).

Physiological quality using the NIR method and cold test (CT)

The present study is complemented by the NIR method, with the future aim of improving data on seed vigour and also preserving the seeds (XAVIER *et al.*, 2019). Figure 6 shows the results of the conventional cold test (CT) and evaluation using the NIR method.

Based on the results of the cold test (CT), four Batches (1, 2, 3 and 4) were classified as having superior vigour, while Batches 5 and 6 had low vigour. This difference is seen in the FE and FGC tests. The NIR method, applying the prediction of the model, is able to classify the six Batches of maize seeds as having similar quality.

Qualidade fisiológica pelo método NIR e teste de frio (TF)

Este estudo se complementa com o método NIR, visando no futuro aprimorar os dados de vigor das sementes e, ainda, preservar as sementes (XAVIER *et al.*, 2019). Na Figura 6, apresentam-se resultados obtidos pelo teste convencional (TF) e a avaliação pelo método NIR.

Pelos resultados do teste de frio (TF), houve classificação de quatro Lotes (1; 2; 3 e 4) com vigor superior, enquanto os Lotes 5 e 6 apresentaram baixo vigor. Verifica-se que essa discriminação também ocorre nos testes EC e PCG. O método NIR aplicando a predição pelo modelo consegue classificar em similar qualidade os seis Lotes de sementes de milho.

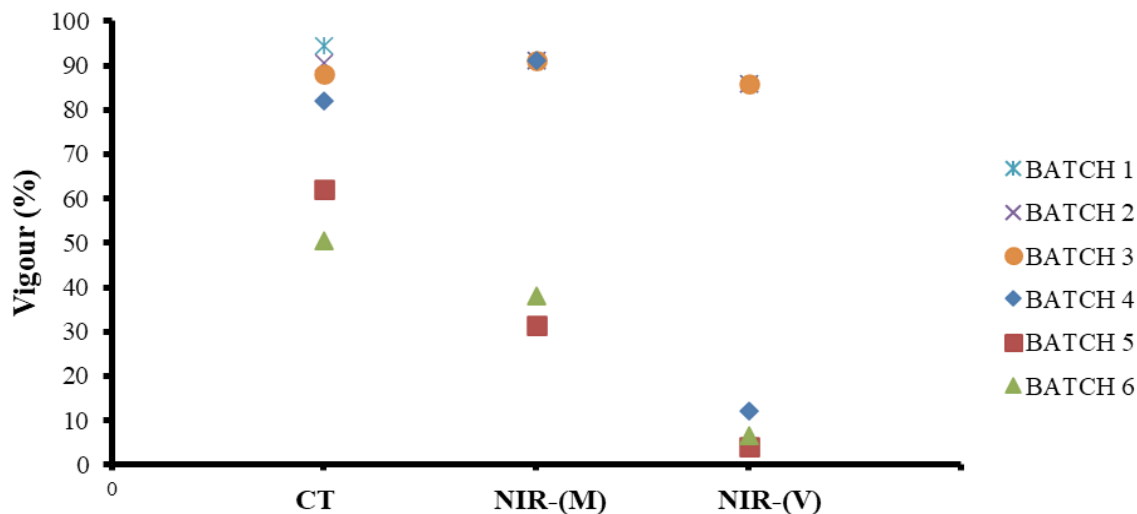


Figure 6 - Physiological quality in Batches of maize seeds, cv. DKB-290-HS, evaluated using PLS-DA model from NIR data based on the cold test (CT).

Figura 6 - Qualidade fisiológica de Lotes de sementes de milho, cv. DKB-290-HS, avaliadas pelo modelo PLS-DA dos dados NIR com base no teste de frio (TF).

According to the International Seed Testing Association - ISTA (1981) and the Association of Official Seed Analysts - AOSA (1983), the cold test is considered the most important for maize seed vigour (SENA *et al.*, 2017).

De acordo com a International Seed Testing Association - ISTA (1981) e a Association of Official Seed Analysts - AOSA (1983), o teste frio é considerado o mais importante para o vigor da semente de milho (SENA *et al.*, 2017).

Physiological quality using the NIR method and field emergence test (FE)

The field emergence test was used with the aim of simulating seed performance in the field. Figure 7 compares the NIR method and the field emergence test (FE).

It can be seen that the NIR method classified Batches 1, 2 and 3 as having greater than 80%, both in the model and in validating the prediction, the trend in classification regarding vigour by the field emergence test being similar in the six Batches of maize seeds. According to Vieira *et al.* (2015), the field emergence test (FE) is efficient in evaluating vigour in maize seeds, and highlights its application in other studies carried out using bean and wheat seeds.

Qualidade fisiológica pelo método NIR e teste de emergência em campo (EC)

Com o propósito de simular qual seria o desempenho das sementes em campo, utilizou-se o teste de emergência em campo. Na Figura 7, apresenta-se os resultados da comparação do método NIR com o teste de emergência em campo (EC).

Pode-se verificar que o método NIR classificou com porcentagem superior aos 80% nos Lotes 1; 2 e 3, tanto no modelo quanto na validação da predição, a tendência de classificação é similar nos seis Lotes de sementes de milho referente ao seu vigor pelo teste de emergência em campo. Conforme Vieira *et al.* (2015), o teste de emergência em campo (EC) é eficiente para avaliar vigor de sementes de milho e destaca a sua aplicação em outras pesquisas desenvolvidas com sementes de feijão e trigo.

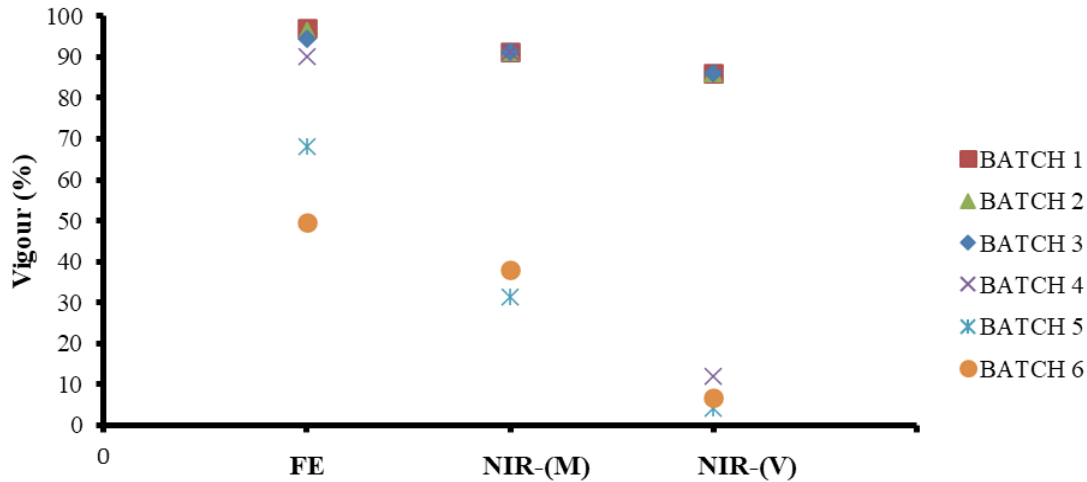


Figure 7 - Physiological quality in six Batches of maize seeds evaluated using the PLS-DA model from NIR data based on the field emergence test (FE).

Figura 7 - Qualidade fisiológica de seis Lotes de sementes de milho avaliadas pelo modelo PLS-DA dos dados NIR, com base no teste de emergência em campo (EC).

Physiological quality using the NIR method and speed of emergence test (SEI)

In studying the data obtained by NIR, making predictions based on the mean values for SEI, it can be seen that the interpretation is similar to the earlier tests for both the model and the validation (Figure 8).

Qualidade fisiológica pelo método NIR e teste de velocidade de emergência (IVE)

No estudo dos dados obtidos pelo NIR, fazendo as predições com base nas médias de IVE, pode-se observar que a interpretação é similar aos testes anteriores, tanto para o modelo quanto para a validação (Figura 8).

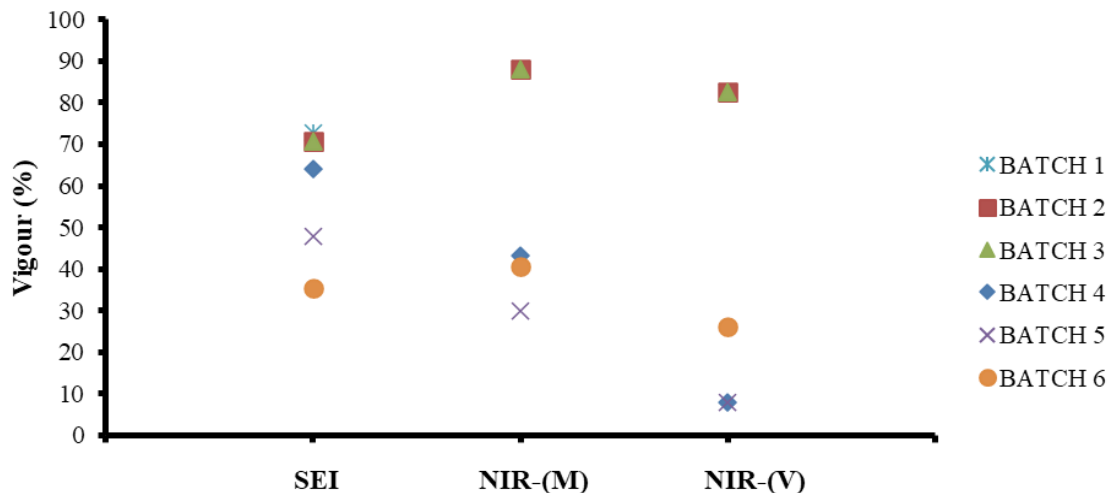


Figure 8 - Physiological quality in Batches of maize seeds, cv. DKB-290-HS, evaluated using the PLS-DA model from NIR data based on the speed of emergence test (SEI).

Figura 8 - Qualidade fisiológica de Lotes de sementes de milho, cv. DKB-290-HS, avaliadas pelo modelo PLS-DA dos dados NIR, com base no teste de velocidade de emergência (IVE).

Speed of emergence, as it is a field test (seedbed), is important for evaluating the physiological quality of seeds, since the conditions of the test are similar to those in the field that the seed will have to face when the crop is planted. Castan *et al.* (2018) state that the speed of emergence and seedling emergence tests help to differentiate vigour characteristics in the seeds.

The physiological quality of maize seeds has been studied for several years using conventional vigour testing (SENA *et al.*, 2017; SENA *et al.*, 2015; GASPARETTO; ZUCARELI, 2015; GU *et al.*, 2017), although the aim of developing devices, technologies and methodologies is increasingly more promising (CASTAN *et al.*, 2018; DRANSKI *et al.*, 2017; JIA *et al.*, 2016; AMBROSE *et al.*, 2016).

The present results give technical and scientific support to using NIR technology to speed up the process of analysing the physiological quality of maize seeds, cv. DKB-290-HS, since once the predictions had been made by the PLS-DA method, the technique distinguished the physiological quality of the six Batches of maize seeds with high precision, being more efficient when the Batches showed great variation in physiological quality. Such is the case of Batch 1 (undeteriorated), Batch 5, and Batch 6 (most deteriorated), a characteristic that was also effectively verified by conventional vigour testing.

Conventional seed vigour testing will continue to be a routine part of research, seed production and the development of new cultivars, together with any innovation that may help in studying the physiological quality of maize seeds, such as Near-Infrared Spectroscopy (NIR).

CONCLUSIONS

Near-infrared (NIR) spectroscopy, compared to conventional vigour testing, is efficient in classifying the physiological quality of maize seeds, cultivar DKB-290-HS;

Batch 1 shows the most vigour, while Batches 5 and 6 are less vigorous.

A velocidade de emergência, por se tratar de um teste em campo (canteiro), é importante na avaliação da qualidade fisiológica de sementes, pois esse teste se assemelha às condições de campo que a semente terá que enfrentar na implantação da lavoura. Castan *et al.* (2018) afirmam que os testes de velocidade de emergência e emergência de plântula ajudam a diferenciar características de vigor nas sementes.

O estudo da qualidade fisiológica de sementes de milho vem sendo desenvolvido durante vários anos utilizando os testes de vigor convencionais (SENA *et al.*, 2017; SENA *et al.*, 2015; GASPARETTO; ZUCARELI, 2015; GU *et al.*, 2017), embora a premissa de desenvolver aparelhos, tecnologias e metodologias sejam cada vez mais promissoras (CASTAN *et al.*, 2018; DRANSKI *et al.*, 2017; JIA *et al.*, 2016; AMBROSE *et al.*, 2016).

Os resultados aqui encontrados dão suporte técnico-científico quanto à utilização da tecnologia NIR na agilidade do processo de análise da qualidade fisiológica de sementes de milho, cv. DKB-290-HS. Pois essa técnica, realizadas as predições pelo método PLS-DA, distinguiu com alta precisão a qualidade fisiológica dos seis Lotes de sementes de milho, tornando mais eficientemente quando os Lotes apresentaram grande distância na qualidade fisiológica. Assim é o caso do Lote 1 (não deteriorado), Lote 5 e Lote 6 (com maior deterioração), característica que também foi verificada efetivamente pelos testes convencionais de vigor.

Os testes convencionais de vigor de sementes continuarão fazendo parte rotineira do estudo, produção de sementes e no desenvolvimento de novas cultivares, assim como toda inovação que venha ajudar no estudo da qualidade fisiológica de sementes de milho, como a Espectroscopia do Infravermelho Próximo (NIR).

CONCLUSÕES

A tecnologia de espectroscopia do infravermelho próximo (NIR), comparadas aos testes convencionais de vigor, é eficiente para classificar a qualidade fisiológica de sementes de milho, cultivar DKB-290-HS;

O Lote 1 se apresenta com maior vigor, enquanto os Lotes 5 e 6 se apresentam com menor vigor.

ACKNOWLEDGEMENTS

I wish to express my eternal gratitude to the Organização dos Estados Americanos (OEA) in cooperation with the Programa de Alianças para a Educação e a Capacitação (PAEC) and the Grupo de Cooperação Internacional de Universidades Brasileiras (GCUB) for including me in the masters' scholarship program, as well as to the Universidade Federal de Lavras (UFLA) and all my professors and post-graduate colleagues, who complemented me both personally and professionally.

AGRADECIMENTOS

Eterna gratidão à Organização dos Estados Americanos (OEA) em cooperação com o Programa de Alianças para a Educação e a Capacitação (PAEC) e Grupo de Cooperação Internacional de Universidades Brasileiras (GCUB), por me selecionar no programa de bolsas de mestrado, bem como a universidade Federal de Lavras (UFLA) e todos os professores e colegas de pós-graduação, que me proporcionaram um complemento pessoal e profissional.

CITED SCIENTIFIC LITERATURE

ANDRIAZZI, C. V. G.; ROCHA, D. K.; SOUZA, I. C. P.; BICHUETTE, S. A. Evaluation of physiological quality of corn seeds by GroundEye. **Agro@ambiente On-line**, v. 14, p. 1-10, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.18227/1982-8470ragro.v14i0.6750>

AMBROSE, A.; LOHUMI, S.; LEE, W. H.; CHO, B. K. Comparative nondestructive measurement of corn seed viability using Fourier transform near-infrared (FT-NIR) and Raman spectroscopy. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 224, p. 500-506, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2015.10.082>

BEZERRA, M. C. L.; SANTOS S. G. R.; CARVALHO, T. K. N.; MACÊDO R. R.; SILVA, T. B. M.; MEDEIROS, J. G. F. Fungi reduction and physiological quality of corn seeds inoculated with *Trichoderma harzianum*. **Nativa**, v. 10, n. 1, p. 69-73, 2022. DOI: <https://doi.org/10.31413/nativa.v10i1.13011>

BORILLE, T. B.; MARCELO. M. A. C. ; ORTIZ, R. S.; MARIOTTI, K. C.; FERRÃO, M. F.; LIMBERGER, R. P. Near infrared spectroscopy combined with chemometrics for growth stage classification of cannabis cultivated in a greenhouse from seized seeds. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy (SAA)**, v. 173, n. 15, p. 318-323, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2016.09.040>

BRASIL. Regras Para Análise de Sementes. 1a. ed. Brasília, DF: **Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA)**, 2009, 399 p.

CASTAN, D. O. C.; GOMES-JUNIOR, F. G.; MARCOS-FILHO, J. Vigor-S, a new system for evaluating the physiological potential of maize seeds. **Scientia Agricola**, v. 75, n. 2, p. 167-172, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1678-992X-2016-0401> ISSN

DIAS, M. A. N.; MONDO, V. H. V.; CICERO, S. M.; GONÇALVES, N. R.; DA SILVA, C. A. T. Vigor tests association as an alternative for precise and efficient assessment of maize seed quality. **Revista Caatinga**, v. 28, n. 3, p. 93-99, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1983-21252015v28n311rc>

DI-RIENZO, J. A.; CASANOVES, F.; BALZARINI, M.; GONZALEZ L. A. InfoStat, versión 2008. **Grupo InfoStat, FCA**, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. 2008.

DRANSKI, J. A. L.; DE MALAVASI, M. M.; MALAVASI, U. C.; SCHUSTER, I.; LAZARETTI, N. S. Carbon dioxide quantified by the infrared in respiratory activity evaluation in corn seeds. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 38, n. 3, p. 1115-1132, 2017. DOI: [10.5433/1679-0359.2017v38n3p1115](https://doi.org/10.5433/1679-0359.2017v38n3p1115)

FASSIO, A. S.; RESTAINO, E. A.; COZZOLINO, D. Determination of oil content in whole corn (*Zea mays* L.) seeds by means of near infrared reflectance spectroscopy. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 110, p. 171-175, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.compag.2014.11.015>

- GU, R.; LI, L.; LIANG, X.; WANG Y.; FAN T.; WANG, Y.; WANG, J. The ideal harvest time for seeds of hybrid maize (*Zea mays* L.) XY335 and ZD958 produced in multiple environments. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 17537-9, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-16071-4>
- HAN, S. I.; CHAE, J. H.; BILYEU, K.; SHANNON, J. G.; LEE, J. D. Non-destructive determination of high oleic acid content in single soybean seeds by near infrared reflectance spectroscopy. **JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 91, n. 2, p. 229-234, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11746-013-2369-y>
- HULIANG, C.; FANGYUN, C.; LIPING, P. Determination of the Fatty Acid Composition in Tree Peony Seeds Using Near-Infrared Spectroscopy. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 93, n. 7, p. 943-952, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11746-016-2839-0>
- JIA, S.; YANG, L.; AN, D.; LIU, Z.; YAN, Y.; LI, S.; ZHANG, X.; ZHU, D.; GU, J. Feasibility of analyzing frost-damaged and non-viable maize kernels based on near infrared spectroscopy and chemometrics. **Journal of Cereal Science**, v. 69, n. 6, p. 145-150, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcs.2016.02.018>
- KIIHL, S. M. P.; TOMAZ, A. C.; LANZA, N.; RUCHEL, Q.; BRAVO, J. P. Desenvolvimento fisiológico de plântulas de milho tratadas com clotianidina e clorantraniliprole. **Saber científico**, v. 10, n. 1, p. 1-9, 2021.
- KRZYZANOWSKI, F. C.; FRANÇA NETO, J. De B.; VIEIRA, R. D. Vigor de sementes: conceitos e testes. 1. ed. Londrina, PR: **Associação Brasileira de Tecnologia de Sementes (ABRATES)**, 1999, 218 p.
- MAGUIRE, J. D. Speed of germination: aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v. 2, n. 2, p. 176-177, 1962.
- MARCOS-FILHO, J. Seed vigor testing: an overview of the past, present and future perspective. **Scientia Agricola**, v. 72, n. 4, p. 363-374, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/0103-9016-2015-0007>
- MAYRINCK, L. G.; LIMA J. M. E.; GUIMARÃES, G. C.; NUNES, C. A.; OLIVEIRA, J. A. Use of near infrared spectroscopy in cotton seeds physiological quality evaluation. **Journal of Seed Science**, v. 42, n. 1, p. 219-235, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/2317-1545v42n1p219>
- OMURA, M. S.; PELLIZZARO, V.; FREIRIA, G. H.; FURLAN, F. F.; NICOLETTI, M. A.; TAKAHASHI, S. A. Physiological potential of corn seeds with different sizes and vigor levels subjected to micronutrient treatment. **Agro@ambiente On-line**, v. 14, p. 1-12, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.18227/1982-8470ragro.v14i0.5946>
- PANERO, F. S.; SMIDERLE, O.; PANERO, J. S.; FARIA, F. S. D. V.; PANERO, P. S.; RODRIGUEZ, A. F. R. Non-Destructive Genotyping of Cultivars and Strains of Sesame through NIR Spectroscopy and Chemometrics. **Biosensors**, v. 12, n. 2, p. 69, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/bios12020069>
- PEREIRA FILHO, I. A.; BORGHI, E. Disponibilidade de cultivares de milho para o mercado de sementes do Brasil: safra 2021 / 2022. 1. ed. Sete Lagoas: **Embrapa Milho e Sorgo**, 2022, 16 p.
- RAAD, S. M.; BRANDÃO, S. V. G.; CASTRO, R. J.; PEREIRA, R. A. N.; CID, M. Y. P.; AMARAL, M. A. P.; MORAES, C. A. C.; TAVARES, C. L.; CARNEIRO, S. F. Qualidade fitossanitária e germinativa de sementes de milho submetidas à termoterapia. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 7, p. 3-8, 2022. DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i7.26749>
- SBRUSSI, C. A. G.; ZUCARELI, C. Germinação sob altas temperaturas para avaliação do potencial fisiológico de sementes de milho. **Ciência Rural**, v. 45, n. 10, p. 1736-1741, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20130906>
- SENA, D. V. A.; ALVES, E. U.; MEDEIROS, D. S. Vigor de sementes de milho cv. 'Sertanejo' por testes baseados no desempenho de plântulas. **Ciência Rural**, v. 45, n. 11, p. 1910-1916, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20120751>
- SENA, D. V. A.; ALVES, E. U.; MEDEIROS, D. S. Vigor tests to evaluate the physiological quality of corn seeds cv. "Sertanejo". **Ciência Rural**, v. 47, n. 3, p. e20150705, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20150705>
- XAVIER, J. B.; ANDRADE, B. D.; CORREA, S. D.; CASTANHEIRA, G. G.; VILELA, R. L.; MENDES, R. G. Morphological, chemical and physiological characterization of amaranthus spp. Seeds. **Journal of Seed Science**, v. 41, n. 4, p. 478-487, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/2317-1545v41n4p478>