

Diferenciação de cultivares de girassol por espectroscopia no infravermelho próximo e análise multivariada, utilizando sementes e óleo

Michelle Conceição Vasconcelos¹, Ariadne Santos Oliveira¹, João Antônio Almeida Granja¹,
Joel Conceição Costa¹, Renato Mendes Guimarães¹

¹ Universidade Federal de Lavras, Departamento de Agricultura, Lavras, MG, Brasil. E-mail: michelle_florestal@yahoo.com.br (ORCID: 0000-0002-9833-3780); ariadneoliveira86@gmail.com (ORCID: 0000-0002-9428-0386); joaoalmeida.antonio@gmail.com (ORCID: 0000-0001-7917-8992); joelconceicao costa@yahoo.com.br (ORCID: 0000-0003-4552-488X); renatomg@dag.ufla.br (ORCID: 0000-0002-2034-0788)

RESUMO: Neste trabalho se objetivou avaliar a técnica de espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) e a análise multivariada para a diferenciação de cultivares de girassol utilizando sementes e óleo. As amostras foram submetidas à análise no NIR e os espectros foram gerados por meio do detector FT-IR. Para a construção do modelo de calibração foi utilizado o método de classificação multivariada por mínimos quadrados parciais com análise discriminante (PLS-DA), em que as classes (y) são as variáveis dependentes e os espectros obtidos das amostras as variáveis independentes. As cultivares de girassol foram diferenciadas, tanto óleo quanto semente. Por óleo obteve-se 100% de acerto na calibração, 92% no teste de y -randomization, 86% na validação cruzada e 92% na validação externa, em que se testa 25% das amostras para validar o modelo. E por sementes 100% de acerto na calibração, 87% no teste de y -randomization, 100% na validação cruzada e 100% na validação externa. Portanto, conclui-se que a técnica de espectroscopia no infravermelho próximo, associada à análise multivariada, diferencia cultivares de girassol, tanto por meio do óleo, extraído de semente com pericarpo e de semente sem pericarpo, quanto por semente, com e sem pericarpo.

Palavras-chave: análise de semente; *Helianthus annuus*; NIR; PLS-DA

Differentiation of sunflower cultivars by spectroscopy in infrared next and multivariate analysis using seeds and oil

ABSTRACT: This work aimed to evaluate the near-infrared spectroscopy technique (NIR) and multivariate analysis in the differentiation of sunflower cultivars, using seeds and oil. The samples were subjected to analysis in the NIR and the spectra were generated by the FT-IR detector. To construct the calibration model it was used the multivariate classification method of partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA), in which the classes (y) are the dependent variables and the samples' spectra are the independent variables. Sunflower cultivars were differentiated both by oil and by seed. For oil it was obtained 100% accuracy in the calibration, 92% in y -randomization test, 86% in cross-validation and 92% in external validation in which 25% of samples are tested to validate the model. And seeds had 100% accuracy in the calibration, 87% in y -randomization test, 100% in cross-validation and 100% in external validation. Therefore, it is concluded that the near-infrared spectroscopy associated with multivariate analysis differentiates sunflower cultivars, both by oil (extracted from seeds with and without pericarp) and by seed (with and without pericarp).

Key words: seed analysis; *Helianthus annuus*; NIR; PLS-DA

Introdução

As espécies de interesse agrônomo podem possuir diversas cultivares, que contêm características que atende a determinada necessidade, como: condições edafoclimáticas ou resistência à doença. Uma nova cultivar quando é lançada deve possuir características distintas das demais existentes e essas características devem permanecer sem nenhuma alteração, por sucessivas gerações. Para saber se realmente a nova cultivar é inédita são empregados descritores morfológicos, que consistem na descrição das características agrônomicas.

Os descritores morfológicos também são utilizados para a diferenciação de cultivares, essa pode ser ainda realizada por meio de marcadores moleculares, que é executada pelo estudo de DNA. Entre esses marcadores os mais utilizados são: RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*) e microssatélites (ISSR - *Inter Simple Sequence Repeats*; SSR - *Simple Sequence Repeats*).

Esses métodos de diferenciação possuem procedimentos demorados para obtenção de resultados. O método de análise molecular possui ainda as desvantagens de ser destrutivo e de necessitar de reagentes caros e que geram resíduos. Todavia, na espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) essas desvantagens não são presentes e pode-se ainda utilizar-se de vários traços constitutivos qualitativos e quantitativos ao mesmo tempo, além de obter espectros em amostras sólidas e líquidas, sem necessitar de preparo.

No entanto, para que se possa obter resultados a partir das interações entre os constituintes químicos de absorção dentro de amostras complexas exigem o desenvolvimento de calibração para diferentes culturas e preparações de amostra (Hacisalihoglu et al., 2010).

No desenvolvimento do modelo de calibração para análise de espectro NIR são empregadas as técnicas quimiométricas. Essas técnicas referem-se a métodos matemáticos e entre esses está a estatística multivariada, a qual considera a correlação entre muitas variáveis analisadas simultaneamente, permitindo a extração de quantidade muito maior de informação (Sena et al., 2000).

Portanto, a ausência de trabalhos científicos com a utilização da espectroscopia NIR para diferenciar cultivares, reforça a necessidade da realização de estudos para definir a metodologia ideal para escolha da amostra e calibração de modelos quimiométricos. Neste trabalho objetivou-se avaliar a técnica de espectroscopia no infravermelho próximo e a análise multivariada para a diferenciação de cultivares de girassol utilizando sementes e óleo.

Material e Métodos

Os ensaios foram conduzidos utilizando sementes de girassol, com e sem pericarpo, e óleo, extraído de sementes com pericarpo e extraído de sementes sem pericarpo, de três

cultivares: BRS 324 (Embrapa soja - Paraná), NUSOL 2100 e NUSOL 2500 (Atlântica Sementes S.A. - Paraná).

Obtenção do óleo

Para obtenção do óleo, extraído de sementes com e sem pericarpo, de cada cultivar foram utilizadas 100 gramas de sementes de girassol secas e trituradas, as quais foram depositadas em balão de fundo redondo e boca esmerilhada de 500 mL. Foram adicionados 200 mL de hexano até cobrir as sementes e levados para refluxar. Após 24 horas, o material foi filtrado, descartando o sólido e a fase líquida foi evaporada em um evaporador rotatório Buchi-144, sob pressão reduzida. O óleo obtido de cada tratamento foi colocado em estufa a aproximadamente 35 °C por 24 horas, para a completa evaporação do solvente.

Espectroscopia no infravermelho próximo

Para análise de espectroscopia no infravermelho em sementes foram utilizadas 100 sementes com pericarpo e 100 sementes sem pericarpo, totalizando 200 sementes de cada cultivar. As sementes foram colocadas inteiras no equipamento e cada uma representava uma amostra. Para a análise de óleo utilizou-se 35 amostras de óleo extraído de sementes com pericarpo e 35 amostras de óleo extraído de semente sem pericarpo, em que cada amostra continha um mL. O óleo foi colocado em tubo vial, para leitura no equipamento e cada tubo representava uma amostra.

As amostras foram submetidas à análise de espectroscopia de infravermelho próximo e os espectros foram gerados por meio do detector FT-IR (*Fourier-Transform Near-Infrared*), acoplado ao equipamento Tensor 27 da Bruker®. O software utilizado no equipamento foi o OPUS_Spectroscopy version 6, do mesmo fabricante. A resolução utilizada foi de 8 cm⁻¹, tempo de varredura 256 scan, na amplitude de 2451 a 3231 e posição de 60931 a 61042, de acordo para cada análise, e espectro de absorbância de comprimento de onda entre 10000 e 4000 cm⁻¹.

O espectrofotômetro coletou 256 leituras para cada medida de absorbância por amostra, que produziram um espectro médio constituindo o banco de dados de leituras para cada amostra.

Análise multivariada

Para a construção do modelo de calibração foi utilizado o método de classificação multivariada por regressão de mínimos quadrados parciais com análise discriminante (PLS-DA), com o auxílio do programa estatístico Chemoface® versão 1.6 (Nunes et al., 2012), em que as classes (y) são as variáveis dependentes e os espectros NIR obtidos dessas amostras as variáveis independentes (Abdi, 2003).

Para a construção do modelo de calibração realizou-se o pré-processamento dos números de onda por correção multiplicativa de sinais e os dados foram ajustados excluindo-se os espectros de número um a trezentos, pois essa região espectral confere apenas ruídos e não produz informações relevantes (Decker et al., 2005).

Otimizou-se o modelo pela escolha do número de variáveis latentes com base na porcentagem de classificações corretas, e por validação cruzada, em que se utiliza as mesmas amostras do conjunto de calibração, mas separa-se uma amostra (*leave-one-out*) e constrói-se o modelo com as restantes e calcula-se o erro de previsão para a amostra que ficou de fora, assim esse processo é repetido até que todas as amostras tenham ficado de fora uma vez.

A porcentagem de acerto na diferenciação das cultivares foi o parâmetro utilizado para avaliação do modelo de classificação. O teste de randomização de y (*y-randomization*) também foi utilizado para avaliação da qualidade dos ajustes aplicados aos modelos, em que se utiliza as mesmas amostras do conjunto de calibração, selecionando ao acaso as classes y para construir o modelo. Se realmente x descreve y , o erro de previsão desse modelo deve ser ruim, ou seja, quanto maior o percentual de acerto do teste de *y-randomization*, mais robusto é o modelo criado.

Para validação externa do modelo foram utilizadas amostras de um grupo teste, que são representadas por 25% do número de amostras originais que foram selecionadas pelo método *kennard-stone selection*, as quais não estavam incluídas no grupo de amostras de calibração (correspondentes aos 75% das amostras restantes). O desempenho do modelo também foi avaliado por meio da porcentagem de classificações corretas para as amostras de teste.

Resultados e Discussão

As principais bandas de absorção na região do infravermelho próximo são relacionadas aos sobretons e bandas de combinação das transições vibracionais fundamentais dos grupos: C-H, N-H, O-H e S-H (Souza et al., 2013), portanto não seletivo (a sua intensidade é 10-50 vezes menos do que as correspondentes bandas do infravermelho médio e pouco utilizado para a interpretação e elucidação espectral. Contudo, a análise multivariada pode ser aplicada e modelos de quantificação podem ser obtidos a partir da espectroscopia NIR (Westad et al., 2008).

As cultivares de girassol foram diferenciadas por meio da técnica de espectroscopia no infravermelho próximo e da análise multivariada (PLS-DA) por meio do óleo, extraído de sementes com pericarpo e sem pericarpo, e da semente, com e sem pericarpo. O modelo utilizado para discriminação das cultivares de girassol apresentou bom desempenho, pois obteve alto percentual de sucesso para calibração, validação cruzada, teste de *y-randomization*, e teste de validação externa. O número de variáveis latentes necessárias para o modelo foi de 10 para o óleo extraído de semente com pericarpo, 7 para o óleo extraído de sementes sem pericarpo e 21 para as sementes com e sem pericarpo. Os resultados do sucesso da calibração e da validação do modelo estão representados na Tabela 1.

A porcentagem de acerto na calibração refere-se as 105 amostras totais para óleo e 300 amostras totais

Tabela 1. Parâmetros de desempenho do modelo PLS-DA para diferenciação de cultivares de girassol por óleo, extraído de sementes com pericarpo e de sementes sem pericarpo, e semente, com e sem pericarpo.

	Acerto (%)	
	Com pericarpo	Sem pericarpo
Óleo		
Calibração	100	100
Calibração (<i>y-randomization</i>)	100	92
Validação cruzada	95	86
Teste (validação externa)	88	92
Semente		
Calibração	100	100
Calibração (<i>y-randomization</i>)	89	87
Validação cruzada	99	100
Teste (validação externa)	100	100

para sementes menos os 25% que foram retirados para teste de validação externa. A porcentagem de acerto da validação cruzada refere-se ao teste em que se retira uma amostra e testa o modelo inúmeras vezes, e a calibração do *y-randomization* é o teste em que se embaralham as classes e testam-se as amostras. Além dessa análise, ainda se testa os 25% das amostras restantes para validar o modelo.

O acerto da diferenciação das cultivares por óleo e sementes pode ser representado também pelo número de amostras classificadas corretamente pela validação cruzada, as quais podem ser observadas na Tabela 2. Observa-se ainda a alocação de cada amostra classificada incorretamente. Como a validação cruzada é um dos testes que comprova o ajuste da calibração do modelo, por esses dados há uma confirmação que as cultivares foram diferenciadas com suas amostras classificadas dentro de cada classe (cultivar).

Na Figura 1 pode-se observar a representação gráfica da discriminação das cultivares de girassol por óleo, extraído de sementes com pericarpo e de sementes sem pericarpo,

Tabela 2. Número de amostras, óleo e sementes, classificadas corretamente pela validação cruzada para cada cultivar de girassol pelo modelo PLS-DA.

	BRS 324	NUSOL 2100	NUSOL 2500	Total	Classificadas corretas (%)
Óleo – Com pericarpo					
BRS 324	29	1		30	97
NUSOL 2100		24	2	26	92
NUSOL 2500		1	22	23	96
Óleo - Sem pericarpo					
BRS 324	26			26	100
NUSOL 2100		20	4	24	83
NUSOL 2500		7	22	29	76
Semente - Com pericarpo					
BRS 324	92	1		93	99
NUSOL 2100		68		68	100
NUSOL 2500			64	64	100
Semente - Sem pericarpo					
BRS 324	84			84	100
NUSOL 2100		61		61	100
NUSOL 2500			80	80	100

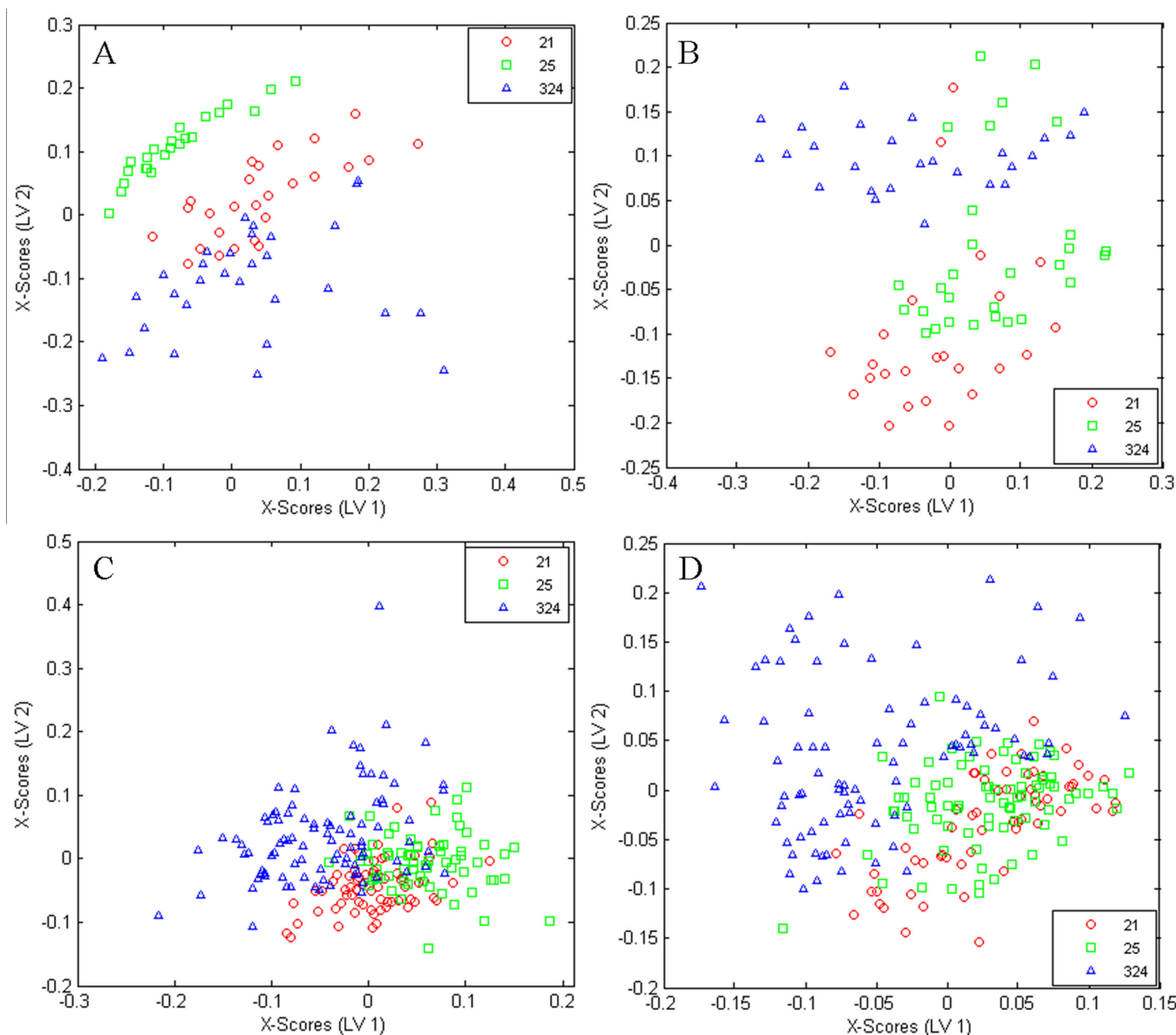


Figura 1. Múltiplas plotagens de pontuações da PLS-DA para ensaios das amostras de óleo extraído de sementes com pericarpo (A), de óleo extraído de semente sem pericarpo (B), de sementes com pericarpo (C) e de sementes sem pericarpo (D) das cultivares de girassol.

e sementes, com e sem pericarpo. Observa-se que em cada gráfico, as amostras de cada cultivar apresentam-se em grupos distintos, representadas por cores diferentes.

Do mesmo modo como este trabalho, Monferrere et al. (2012) obtiveram diferença entre as sementes de girassol pelos níveis de conteúdo oleico: baixo oleico ($\leq 25\%$ w/w ácido oleico), médio oleico (entre 26% e 76% w/w) e alta oleico ($\geq 77\%$ w/w ácido oleico) utilizando a espectroscopia infravermelho próximo de refletância difusa (NIRDRS) e análise multivariada de dados por PCA, CA, LDA, e PLS-DA. A PLS-DA foi o método que obteve a melhor capacidade de análise gráfica e discriminante, devido à sua capacidade de reconhecer os três grupos separados. O método NIRDRS-PLS tem a vantagem de não requerer análise cromatográfica para gerar a matriz de concentrações, obtendo assim o espectro de infravermelho que pode resultar na classificação

rápida e econômica de variedades de sementes de girassol (Monferrere et al., 2012).

Na avaliação da aplicação da tecnologia de espectroscopia de infravermelho próximo para o controle de qualidade de sementes de girassol direto do agricultor e de silo de armazenagem, González-Martín et al. (2013) alcançaram resultados que comprovam que o método analítico empregando espectroscopia no infravermelho próximo pode ser utilizado como uma ferramenta rápida e não destrutiva para a determinação de umidade, gordura e conteúdo alto ou baixo de ácido oleico em amostras de sementes de girassol. O modelo discriminante permitiu a classificação de sementes de girassol com alto ou baixo teor de ácido oleico, com uma taxa de previsão de $90,5\%$ para validação interna e de $89,4\%$ para validação cruzada, taxas semelhantes às encontradas para diferenciação de cultivares deste trabalho.

Precisão semelhante, a desta pesquisa, para validação do modelo também foram registrados por Wang et al. (2003), em que as sementes de soja saudáveis e com dano fúngico foram facilmente classificadas usando o modelo PLS com a espectroscopia NIR, a precisão da classificação foi mais de 99% quando a região de comprimento de onda foi de 490-1690 nm. Para a discriminação entre os vários tipos de danos fúngicos obteve precisões de 100, 99, 84, 94, e 96% para a validação, correspondendo a sementes saudáveis, *Phomopsis*, *C. kikuchii*, mosaico do vírus de soja, e sementes danificadas e com míldio, respectivamente.

Por meio da técnica de espectroscopia FT-NIR associada à análise multivariada de PLS, Pande & Mishra (2015) ajustaram um modelo, utilizando a região espectral 4000-12000 cm^{-1} , para determinar o nível de ácido fítico em sementes de *Vigna radiata*, obtendo valores de R^2 de 97% para validação e 96% para validação cruzada. Já Seo et al. (2016) concluíram que a técnica FT-NIR associada a análise multivariada de PLS-DA são valiosas para a classificação de sementes viáveis e inviáveis de *Capsicum annuum* (pimenta) com precisão de 90,5%.

Os espectros obtidos das sementes de girassol com pericarpo e sem pericarpo apresentaram um padrão espectral semelhante em relação aos picos de absorbância, o que era esperado, pois se trata da mesma espécie (Figura 2). A maioria das absorções foram observadas entre a faixa de 7000 a 4000 cm^{-1} , que foram atribuídas para as bandas de combinação dos grupos funcionais -C=O , -NH , -CH , e C-C (Mecozzi et al., 2011).

Porém, os espectros obtidos de sementes com pericarpo são diferentes dos espectros das sem pericarpo, isso é explicado pelo fato do infravermelho próximo possuir comprimento de onda longo, que caracteriza a frequência e energia como relativamente baixas (Leite & Prado, 2012), o que não facilita a penetração da radiação no objeto em estudo. Portanto, nas sementes com pericarpo, que na verdade é um fruto seco tipo aquênio, a radiação infravermelha é absorvida apenas no pericarpo, sendo necessária a retirada desse para a aquisição dos espectros da semente propriamente dita.

A radiação no infravermelho, quando absorvida pelas ligações entre os átomos de determinada molécula, provoca movimentos de distensão, de rotação e vibratórios, que são específicos para cada tipo de ligação covalente presente. Os espectros resultantes dessa absorção podem ser utilizados para identificar compostos puros ou compostos complexos, pois as curvas espectrais do composto no infravermelho próximo podem ser comparadas a uma “impressão digital” do composto (Vogel, 1992).

A moderna análise NIR envolve a aquisição rápida de grande número de valores de absorção para uma faixa espectral selecionada. A informação contida na curva espectral é então utilizada para prever a composição química da amostra extraído-se as variáveis apropriadas de interesse (Xiaobo et al., 2010).

Por meio da representação gráfica dos espectros e suas faixas espectrais é possível determinar os prováveis grupos

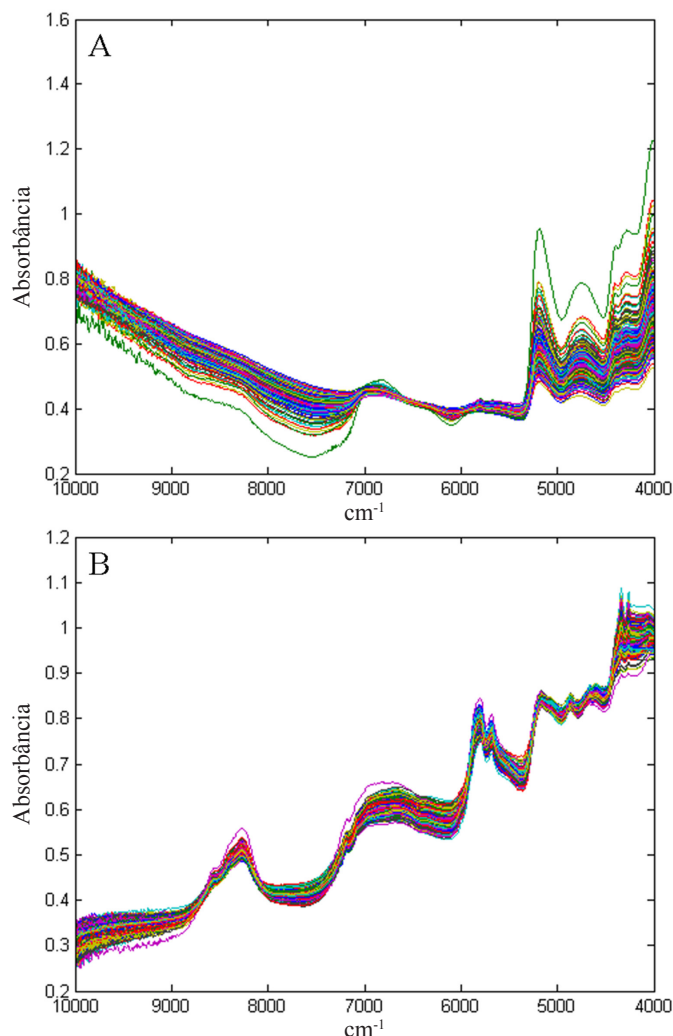


Figura 2. Representação dos espectros no infravermelho próximo obtidos de sementes com pericarpo (A) e sem pericarpo (B) das três cultivares de girassol.

funcionais químicos presentes na semente de girassol (Tabela 3). Essa correlação é realizada com o auxílio do livro *Practical Guide and Spectral Atlas for Interpretive Near-Infrared Spectroscopy* (Workman Júnior & Weyer, 2012) que contém uma tabela que correlaciona o comprimento de ondas (cm^{-1}) com os grupos funcionais.

Para os espectros obtidos do óleo de girassol, extraído de sementes com e sem pericarpo, observou-se a mesma situação da semente, em que demonstraram um padrão espectral semelhante em relação aos picos de absorbância (Figura 3). O mesmo comportamento da absorção das sementes foi observado para o óleo, em que a maioria das absorções foram observadas entre cerca de 7000 a 4000 cm^{-1} .

Por meio da representação gráfica dos espectros e suas faixas espectrais também foi possível determinar os prováveis grupos funcionais químicos presentes no óleo de girassol (Tabela 4), a correlação foi feita conforme descrito para as assim foi observado nas sementes (Tabela 3).

As faixas espectrais 4625, 5675, 5735, 5787, 7194 e 8258 cm^{-1} do óleo são as mesmas que aparecem para os espectros das sementes sem pericarpo.

Tabela 3. Correlação espectro-estrutura por infravermelho próximo para a semente de girassol com e sem pericarpo.

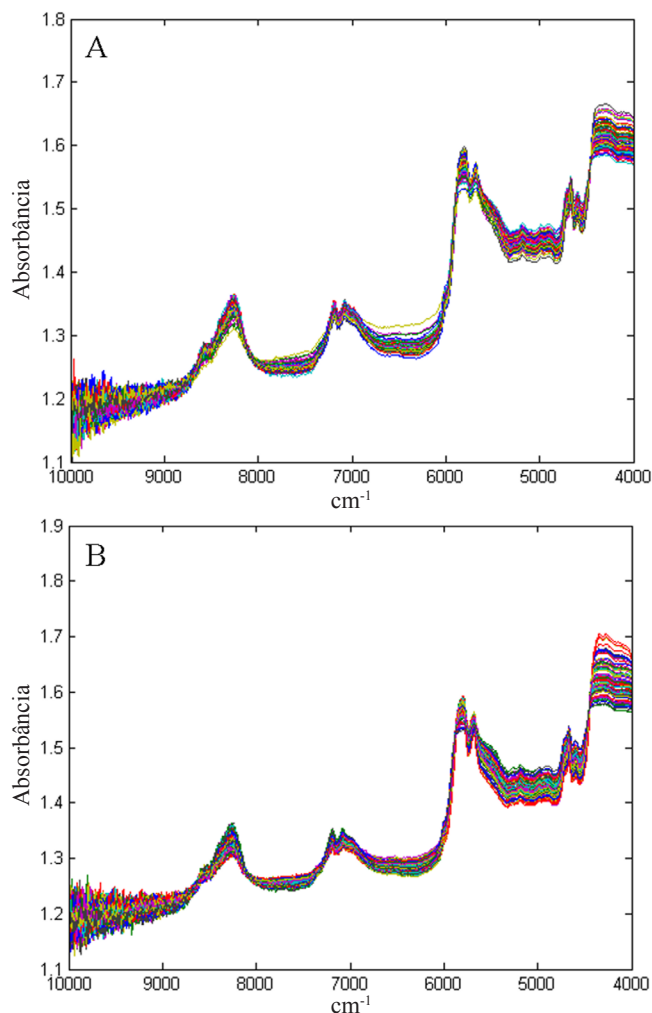
Faixa espectral (cm ⁻¹)	Grupo funcional
Com pericarpo	
4281	CHO clássico instrumento de filtro
4400	O-H/C-O a par r de glicose
4505	N-H combinação de bandas a par r de ureia (NH ₂ -C=O – NH ₂)
4762	CHO clássico instrumento de filtro
4960	O-H alongamento e flexão combinação a par r de metanol
5181	O-H (.O-H & HOH)
6944	C-H de me leno (.CH ₂)
Sem Pericarpo	
4261	C-H, C-H de me leno, associados com alifá co linear (CH ₂) _N R
4329	C-H (.C-H flexão)
4521	C=O/C-N/N-H combinação a par r da poliamida 11
4625	C-H Aromá co C-H (Aril)
4785	O-H Polimérico (.O-H)
4865	CONH ₂ especificamente devido a grupos = O pep deo N-H e C em ângulo reto para a linha do esqueleto do pep deo referido como a estrutura β-folha
4960	O-H alongamento e flexão, combinação a par r de metanol
5160	O-H da água, próximo 0 °C
5376	C-Cl orgânicos clorados (.C-Cl grupo)
5675	C-H de me leno (.CH ₂) (simétrica)
5735	C-H me lo C-H, aromá co associado (ArCH ₃)
5787	C-H de me leno (.CH ₂) (Assimétrico)
7194	C-H me lo C-H, associado com alifá co linear CH ₃ (CH ₂) _N CH ₃
8258	C-H de me leno (.CH ₂)

Fonte: Practical Guide and Spectral Atlas for Interpretive Near-Infrared Spectroscopy (Workman Júnior & Weyer, 2012).

Tabela 4. Correlação espectro-estrutura por infravermelho próximo para o óleo de girassol tanto extraído de sementes com pericarpo quanto extraído de sementes sem pericarpo.

Faixa espectral (cm ⁻¹)	Grupo funcional
4545	CHO Carboidrato (.CHO)
4587	N-H proteína: N-H
4625	C-H aromá co C-H (Aril)
4673	C-H/C=O lipídeo associado (.RC=CH & RC=O)
4975	N-H/C-N banda combinação de amidas primárias (R-C=O – NH ₂)
5181	O-H (.O-H & HOH)
5675	C-H de me leno (.CH ₂) (Simétrica)
5735	C-H me lo C-H, aromá co associado (ArCH ₃)
5787	C-H de me leno (.CH ₂) (Assimétrico)
7085	C-H de me leno C-H, associados com alifá co ramificado RC(CH ₃) ₃ ou RCH(CH ₃) ₂
7163	C-H de me leno C-H, associados com alifá co ramificado RC(CH ₃) ₃ ou RCH(CH ₃) ₂
7194	C-H me lo C-H, associado com alifá co linear CH ₃ (CH ₂) _N CH ₃
8258	C-H de me leno (.CH ₂)

Fonte: Practical Guide and Spectral Atlas for Interpretive Near-Infrared Spectroscopy (Workman Júnior & Weyer, 2012).

**Figura 3.** Representação dos espectros no infravermelho próximo obtidos de óleo extraído de sementes com pericarpo (A) e sem pericarpo (B) das três cultivares de girassol.

Conclusão

A técnica de espectroscopia no infravermelho próximo associada à análise multivariada diferencia cultivares de girassol, BRS 324, NUSOL 2100 e NUSOL 2500, tanto por meio do óleo, extraído de semente com pericarpo e de semente sem pericarpo, quanto por semente, com e sem pericarpo.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudo de doutorado à Michelle Conceição Vasconcelos.

Literatura Citada

Abdi, H. Partial least squares (PLS) regression. In: Lewis-Beck, M.; Bryman, A.; Futing, T. (Eds.). Encyclopedia of social sciences research methods. Thousand Oaks: Sage, 2003. p.792-795. <https://www.utdallas.edu/~herve/Abdi-PLS-pretty.pdf>. 18 Jan. 2017.

- Decker, M.; Nielsen, P. V.; Martens, H. Near-infrared spectra of *Penicillium camembarti* strains separated by extend multiplicative signal correction improved prediction of physical and chemical variations. *Applied Spectroscopy*, v. 59, n. 1, p. 56-68, 2005. <https://doi.org/10.1366/0003702052940486>.
- González-Martín, I.; Villaescusa García, V.; López González, F.; Oiz Jiménez, C.; Lobos Ortega, I. A.; Gordillo Arrobas, B.; Hernández Hierro, J. M. Control of quality and silo storage of sunflower seeds using near infrared technology. *Grasas y Aceites*, v. 64, n. 1, p. 30-35, 2013. <https://idus.us.es/xmlui/handle/11441/41046>. 05 Jan. 2017.
- Hacisalihoglu, G.; Larbi, B.; Settles, A. M. Near-infrared reflectance spectroscopy predicts protein, starch, and seed weight in intact seeds of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 58, n. 2, p. 702-706, 2010. <https://doi.org/10.1021/jf9019294>.
- Leite, D. O.; Prado, R. J. Espectroscopia no infravermelho: uma apresentação para o Ensino Médio. *Revista Brasileira de Ensino de Física*, v. 34, n. 2, p. 2504-2509, 2012. <https://doi.org/10.1590/S1806-11172012000200015>.
- Mecozzi, M.; Pietroletti, M.; Tornambè, A. Molecular and structural characteristics in toxic algae cultures of *Ostreopsis ovata* and *Ostreopsis* spp. evidenced by FTIR and FTNIR spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 78, n. 5, p. 1572-1580, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2011.02.002>.
- Monferrere, G. L.; Azcarate, S. M.; Cantarelli, M. Á.; Funes, I. G.; Camiña, J. M. Chemometric characterization of sunflower seeds. *Journal of Food Science*. Chicago, v. 77, n. 9, p. C1018-C1022, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02881.x>.
- Nunes, C. A.; Freitas, M. P.; Pinheiro, A. C. M.; Bastos, S. C. Chemoface: a novel free user-friendly interface for chemometrics. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 23, n. 11, p. 2003-2010, 2012. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532012005000073>.
- Pande, R.; Mishra, H. N. Fourier transform near-infrared spectroscopy for rapid and simple determination of phytic acid content in green gram seeds (*Vigna radiata*). *Food Chemistry*, London, v. 172, p. 880-884, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.049>.
- Sena, M. M.; Poppi, R. J.; Frighetto, R. T.; Valarini, P. J. Avaliação do uso de métodos quimiométricos em análise de solos. *Química Nova*, v. 23, n. 4, p. 547-555, 2000. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422000000400019>.
- Seo, Y. W.; Ahn, C. K.; Lee, H.; Park, E.; Mo, C.; Cho, B. K. Non-Destructive sorting techniques for viable pepper (*Capsicum annuum* L.) seeds using fourier transform near-infrared and raman spectroscopy. *Journal of Biosystems Engineering*, v. 41, n. 1, p. 51-59, 2016. <https://doi.org/10.5307/JBE.2016.41.1.051>.
- Souza, A. M.; Breikreitz, M. C.; Filgueiras, P. R.; Rohwedder, J. J. R.; Poppi, R. J. Experimento didático de quimiometria para calibração multivariada na determinação de paracetamol em comprimidos comerciais utilizando espectroscopia no infravermelho próximo: um tutorial, parte II. *Química Nova*, v. 36, n. 7, p. 1057-1065, 2013. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422013000700022>.
- Vogel, A. I. *Análise química quantitativa*. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. 712 p.
- Wang, D.; Dowell, F. E.; Ram, M. S.; Schapaugh, W. T. Classification of fungal-damaged soybean seeds using near-infrared spectroscopy. *International Journal of Food Properties*, v. 7, n. 1, p. 75-82, 2003. <https://doi.org/10.1081/JFP-120022981>.
- Westad, F.; Schmidt, A.; Kermit, M. Incorporating chemical band-assignment in near infrared spectroscopy regression models. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, v. 16, n. 3, p. 265-273, 2008. <https://doi.org/10.1255/jnirs.786>.
- Workman Júnior, J.; Weyer, L. *Practical guide and spectral atlas for interpretive near-infrared spectroscopy*. 2.ed. Boca Raton: CRC, 2012. 326p.
- Xiaobo, Z.; Jiewen, Z.; Povey, M. J.; Holmes, M.; Hanpin, M. Variables selection methods in near-infrared spectroscopy *Acta Analytica Chimica*, v. 667, n. 1, p. 14-32, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.03.048>.