



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

ROBERTA ROSSATO

**PREDIÇÃO DO TEOR DE ÓLEO EM CANOLA POR
ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO (NIR)**

Londrina
2013

ROBERTA ROSSATO

**PREDIÇÃO DO TEOR DE ÓLEO EM CANOLA POR
ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO (NIR)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioenergia como parte das exigências para obtenção do título de mestre em Bioenergia, Área de Concentração em Biocombustíveis.

Orientador: Prof. Dr. Cássio Egídio Cavenaghi Prete.

Co-orientador: Pesq. César de Castro - Embrapa Soja.

Londrina
2013

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

R827p Rossato, Roberta.
Predição do teor de óleo em canola por espectroscopia de infravermelho próximo (NIR) / Roberta Rossato. – Londrina, 2013.
48 f. : il.

Orientador: Cássio Egídio Cavenaghi Prete.
Coorientador: César de Castro.
Dissertação (Mestrado em Bioenergia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Bioenergia, 2013.
Inclui bibliografia.

1. Plantas oleaginosas na produção de biodiesel – Teses. 2. Óleos e gorduras – Teses. 3. Canola – Semente – Espectroscopia de infravermelho – Teses. 4. Sementes oleaginosas – Extração (Química) – Teses. I. Prete, Cássio Egídio Cavenaghi. II. Castro, César de. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Bioenergia. IV. Universidade Estadual de Maringá. Título. V. Universidade Estadual de Ponta Grossa. VI. Universidade Estadual do Centro-Oeste. VII. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. VIII. Título.

CDU 662.755

ROBERTA ROSSATO

**PREDIÇÃO DO TEOR DE ÓLEO EM CANOLA POR
ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO (NIR)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioenergia como parte das exigências para a obtenção do título de mestre em Bioenergia, Área de concentração em Biocombustíveis.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Cássio Cavenaghi Prete
Universidade Estadual de Londrina- UEL

Dr. Claudio Guilherme Portela de Carvalho
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária -
EMBRAPA Soja

Dr. Pedro Mário de Araújo
Instituto Agronômico do Paraná - IAPAR -
Londrina

Londrina, 19 de março de 2013.

Dedico este trabalho a Deus, por sempre me ajudar, guiando-me e protegendo-me.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar presente em todos os dias da minha vida, me ajudando a vencer todas as batalhas, pois sem ele nada é possível;

À minha mãe por toda paciência, esforço, motivação e carinho durante minha formação e ao meu pai (in memoriam);

Ao professor e orientador, engenheiro agrônomo, Dr. Cássio Egídio Cavenaghi Prete e ao pesquisador engenheiro agrônomo da Embrapa Soja, Dr. César de Castro pela confiança depositada a mim, orientação, experiência, conselhos e novas idéias;

Ao engenheiro agrônomo e pesquisador da Embrapa Soja, Dr. Claudio Guilherme Portela de Carvalho pela orientação, troca de experiência, novas idéias, conselhos e total apoio durante a execução do trabalho;

Aos engenheiros agrônomos e pesquisadores da Embrapa Trigo, Dr. Gilberto Omar Tomm e Dr. Pedro Mário de Araújo do IAPAR - Londrina, pela troca de experiência, novas idéias e apoio técnico fornecido durante a realização do trabalho;

Ao bioquímico M.e José Marcos Gontijo Mandarino, pesquisador da Embrapa Soja, pelo apoio proporcionado a realização das análises e execução do trabalho no laboratório de análises físico-químicas e cromatográficas da Embrapa soja;

Ao químico Rodrigo Leite da Embrapa soja pela dedicação, orientação, troca de experiência e novas idéias;

À Dra. Anna Karolina Grunvald pela dedicação, orientação, troca de experiência, carinho e amizade;

À todos os funcionários da Embrapa, em especial a equipe de apoio setor Girassol, aos bibliotecários e em especial a Izilda da Costa Calheiros, e a todos aqueles que diretamente e indiretamente me ajudaram na execução do trabalho;

Ao Wendell Giovani Martineli, por me apoiar nos momentos alegres e difíceis, sem medir esforços, com carinho e amor;

À Universidade Estadual de Londrina (UEL), à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) e ao Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), pela possibilidade de realização deste trabalho;

À Coordenadora do Mestrado em Bioenergia, Profa. Dra. Carmen Luisa Barbosa Guedes, pela orientação prestada aos alunos em todos os momentos;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudo durante o período da pós-graduação;

Aos meus irmãos, amigos e todos aqueles que passaram pela minha vida e que me esqueço de citar, meu sincero muito obrigada.

ROSSATO, Roberta. **Predição do teor de óleo em sementes de canola por espectroscopia de infravermelho próximo (NIR)**. 2013. 49 fls. Dissertação (Mestrado em Bioenergia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi estabelecer uma equação de calibração e mostrar a eficiência da análise de espectroscopia de reflectância no infravermelho próximo (NIR) para a avaliação dos teores de óleo de sementes de canola, obtidas em condições edafoclimáticas brasileiras, particularmente para as condições da região Sul do país. Para a calibração, as informações espectrais do NIR de 124 famílias de meios-irmãos (amostras padrão) foram correlacionadas com os teores de óleo obtidos pelo método padrão químico. A precisão da equação foi verificada pelo coeficiente de determinação (R^2), erro padrão de calibração (SEC) e pelo erro padrão de desempenho (SEP). A região entre 1386 nm a 2228 nm foi selecionada para a calibração. O R^2 foi de 0,92, o SEC foi de 0,78 e o SEP foi de 1,22. Adicionalmente, a análise do teor de óleo de 10 genótipos, não incluídos na calibração, foi similar ao método químico padrão. Esta similaridade e os valores de R^2 , SEC e SEP possibilitaram inferir que a avaliação de sementes de canola por meio da análise de espectroscopia do NIR foi adequada para diferenciar teores de óleo de genótipos de canola cultivados na região Sul do Brasil.

Palavras-chave: *Brassica napus*. Análise espectral. Oleaginosa. Soxhlet. NIR.

ROSSATO, Roberta. **Prediction oil content in canola seed by near infrared spectroscopy (NIR)**. 2013. 49 fls. Dissertation (Master in Bioenergy) – State University of Londrina, Londrina, 2013.

ABSTRACT

The aim of this paper was to establish a calibration equation and show the efficiency of the the Near-infrared reflectance spectroscopy (NIR) in the evaluation of oil content of canola seeds from different genotypes produced under brazilian environmental conditions, mainly in the south of Brazil. For NIR calibration the spectral data of of 124 half sib families (sample standard) were compared to the seed oil contents obtained with the standard chemical method. The precision of the equation was determined using both the coefficient of determination (R^2) and the standard error of the calibration (SEC). The performance of the equation was evaluated by the standard error of performance (SEP). The wavelengths ranging from 1386 to 2228 nm were selected for the calibration. The R^2 was 0.92, the SEC was 0.78, and the SEP was 1.22. The oil content values obtained for the 10 genotypes analyzed by NIR spectroscopy that were not included in the calibration were similar to the values obtained using the standard chemical method. That similarity, and the values of R^2 , SEC and SEP led to the conclusion that the evaluation of seeds using NIR spectroscopy was suitable to determine the different oil contents of canola seeds sowed in southern Brazil.

Key words: *Brassica napus*. Spectral analysis. Oilseed. Soxhlet. NIR.

Tudo posso naquele que me fortalece
(FILIPENSES: 4: 13).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Exemplo de ácidos graxos comuns: ácido esteárico (saturado) e ácido oléico, linoléico e linolênico (insaturado).....	17
Figura 2 - Isômeros cis e trans dos ácidos graxos oléico, elaídico e esteárico.....	18
Figura 3 - Deslocamento entre átomos na molécula, lei de Hooke.	24
Figura 4 - Representação dos modos vibracionais das moléculas.....	24
Figura 5 - Oscilador harmônico e não harmônico.....	25
Figura 6 - Representação adaptada das matrizes de dados (x e y) na calibração multivariada.....	28
Figura 7 - Fórmulas do SEP e SEC.....	32
Figura 8 - Equipamento NIR Thermo Scientific modelo Antaris II com esfera de integração.....	33
Figura 9 - Modelo de preparo de pacotes (sachês) em papel filtro.....	34
Figura 10 - Extração de óleo pelo método Soxhlet.....	35
Figura 11 - Região estabelecida para a determinação da equação de calibração do equipamento de NIR, para avaliação do teor de óleo (%) de genótipos de canola, de 1386 a 2228 nanômetros (nm).....	37
Figura 12 - Equação de calibração do aparelho de NIR para teor de óleo (%) em sementes intactas de genótipos de canola.....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Alguns ácidos graxos de ocorrência natural: estrutura, propriedades e nomenclatura.....	16
Tabela 2 - Regiões espectrais do infravermelho	22
Tabela 3 - Análise de variância do teor de óleo de híbridos de canola avaliados pela espectroscopia de NIR e pelo método padrão químico.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a.c	antes de Cristo
ANN	Redes Neurais Artificiais
CH	Ligação Carbono e Hidrogênio
CH ₂	Metileno
CH ₃	Metil
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FAR	Espectroscopia de Infravermelho Distante
FH	Ligação Flúor (halogênio) e Hidrogênio
GA	Algoritmo genético
IAPAR	Instituto Agrônômico do Paraná
IR	Região do Infravermelho
IV	Infravermelho
MIR	Espectroscopia de Infravermelho Médio
MSC	Correção de Espalhamento Multiplicativo
NH	Amina
NIR	Espectroscopia de Infravermelho Próximo
N-PLS	Mínimos Quadrados Parciais Não Lineares
OH	Hidroxila
PCR	Regressões em Componentes Principais
PLS	Mínimos Quadrados Parciais
SEC	Erro Padrão de Calibração
SEP	Erro Padrão de Desempenho
SH	Tiol
SNV	Varição Normal Padrão

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	ÓLEOS E GORDURAS.....	15
2.1.1	Ácidos Graxos	15
2.1.2	Ácidos Graxos Saturados e Insaturados	16
2.1.3	Propriedades Físicas dos Ácidos Graxos e Conformação.....	17
2.2	ORIGEM DA CULTURA DA CANOLA	19
2.2.1	Taxonomia da Canola.....	19
2.2.2	Aspectos Econômicos da Cultura da Canola.....	19
2.2.3	Importância do Óleo de Canola na Agroenergia / Produção de Biodiesel	20
2.3	HISTÓRIA DA ESPECTROSCOPIA ELETROMAGNÉTICA	21
2.3.1	Conceito sobre Espectroscopia de Infravermelho	22
2.3.2	Espectroscopia de Infravermelho Próximo - NIR.....	23
2.3.3	Vibrações Moleculares	23
2.3.4	Interpretação das Bandas Espectrais - NIR.....	26
2.4	QUIMIOMETRIA	27
2.5	CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA	28
2.5.1	Pré-processamento ou Pré-Tratamentos Espectrais	30
2.5.2	Construção dos Modelos de Calibração	29
2.6	VALIDAÇÃO.....	31
3	MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1	COLETA DE ESPECTROS PARA CALIBRAÇÃO DO EQUIPAMENTO NIR	33
3.1.1	Extração Química do Teor de Óleo	34
3.1.2	Calibração do Modelo Matemático para Predição do Teor de Óleo	35
3.1.3	Validação da Curva / Correlações entre os Métodos Soxhlet e NIR.....	36
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5	CONCLUSÃO	42
	REFERÊNCIAS	43

1 INTRODUÇÃO

A crescente preocupação com a diminuição das reservas fósseis e oscilação nos preços do petróleo, além das questões referentes ao meio ambiente, levam à preocupação e a procura por fontes renováveis de energia. Nesse aspecto, as oleaginosas têm se firmado como uma das principais opções para atender esse mercado, onde a canola se destaca como matéria-prima para a produção de biodiesel devido seu potencial energético.

A canola (*Brassica napus*) foi a segunda cultura anual produtora de óleo no mundo com 24,29 milhões de toneladas em 33,11 milhões de hectares na safra 2011/2012, sendo os principais países produtores o Canadá, a China, a Índia, a França e a Alemanha (ESTADOS UNIDOS, 2012, 2013).

No Brasil, a área cultivada na safra 2011/2012 foi de 42,4 mil ha (CONAB, 2012), restrita principalmente aos Estados do Rio Grande do Sul (61,7 %) e Paraná (31,8 %). Apesar da dimensão da área, o interesse no país por produtores tem aumentado pelas propriedades físico-químicas do óleo, que confere a ele boa qualidade para o consumo humano e para produção de biodiesel (AUKEMA; CAMPBELL, 2011).

A determinação do teor de óleo em sementes de canola é, geralmente, feita pelo método de extração química de Soxhlet, utilizando-se o N-hexano ou éter de petróleo como solvente químico (ZENEBO; PACUET; TIGLEA, 2008). Contudo, o uso destes solventes é prejudicial ao meio ambiente e à saúde humana. Além disso, o método apresenta elevado custo, longo tempo de análise e destruição das amostras. Devido a essas características, o método químico se torna não adequado ou inviável, quando há a necessidade de avaliar um grande número de amostras ou de utilizar as amostras em pesquisas subsequentes.

Como alternativa ao método padrão, o teor de óleo pode ser predito por espectroscopia de reflectância no infravermelho próximo (NIR). Este método é rápido, com baixo custo, não poluente, efetivo, com menor necessidade de mão-de-obra e não destrutivo, possibilitando análise de semente intacta e não havendo necessidade de sua estabilidade higroscópica (SATO, 2002; VELASCO; BECKER, 1998). Além disso, ele permite a análise simultânea de diferentes componentes das sementes, como: óleo, proteína, fibra, dentre outros (BATTEN, 1998).

A espectroscopia do NIR é um método indireto, onde se faz necessária a calibração do equipamento. Para isto, correlaciona-se a informação espectral de NIR com um conjunto de dados provenientes de um método de referência. Contudo, características ambientais, tais como tipo de solo, temperatura e umidade, podem influenciar na absorvância dos espectros e, por consequência, as equações de calibração (BATTEN, 1998; SIEMENS; DAUN, 2005). Outros fatores como a variabilidade genética, a morfologia e a coloração do tegumento da semente, a composição de ácidos graxos, a aplicação do tratamento matemático e o modelo do equipamento, podem também, influenciar no processo de estimação (PANFORF; MAN, 1990).

O método de NIR tem sido utilizado em diversas espécies. Em canola, a eficiência de seu uso já foi demonstrada por Sato et al. (1998), Velasco e Becker (1998) e Siemens e Daun (2005). Contudo, as curvas de calibração preditas nestes estudos foram feitas em outros países, com condições edafoclimáticas distintas às do Brasil.

O objetivo deste trabalho foi estabelecer uma equação de calibração e mostrar a eficiência da análise de espectroscopia de reflectância no infravermelho próximo para a avaliação dos teores de óleo de sementes de canola, obtidas em condições brasileiras, particularmente para as condições da região Sul do país.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ÓLEOS E GORDURAS

Os óleos e gorduras são substâncias insolúveis em água. Essas substâncias são denominadas hidrofóbicas e podem ser de origem animal, vegetal ou até mesmo microbiana, constituídos predominantemente por triglicerídeos (MORETTO; FETT, 1998).

Os triglicerídeos são compostos formados de glicerol e ácidos graxos (MORETTO; FETT, 1998). O glicerol é um componente alcoólico que contém três grupos hidroxílicos (OH) identificados como ésteres de glicerol, cuja composição química depende do tipo e origem da matéria prima, sendo designados como mono, di ou triol (tri-ésteres ou tri-glicerídeos) (CAMPBELL; FARRELL, 2007). E os ácidos graxos são lipídios, classificados de acordo com a sua natureza química, através de compostos de cadeia aberta, chamados de carboxila (COOH) e hidrocarboneto (ligações de átomos de hidrogênio e carbono) (CAMPBELL; FARRELL, 2007).

A diferenciação entre óleos e gorduras, está no seu ponto de fusão à temperatura ambiente (MORETTO; FETT, 1998). Os óleos vegetais são líquidos à temperatura ambiente, devido sua maior proporção de graxos insaturados e as gorduras tendem a ser sólidas, por serem constituídas em maior parte por ácidos graxos saturados, exemplo as gorduras animal (CAMPBELL; FARRELL, 2007).

2.1.1 Ácidos Graxos

Os ácidos graxos diferem basicamente um do outro pelo comprimento da cadeia hidrocarbonada (variando de 4 a 36 carbonos – C4 a C36) e pelo número das duplas ligações e suas posições (NELSON; COX, 2011) (Tabela 1).

Tabela 1 - Alguns ácidos graxos de ocorrência natural: estrutura, propriedades e nomenclatura.

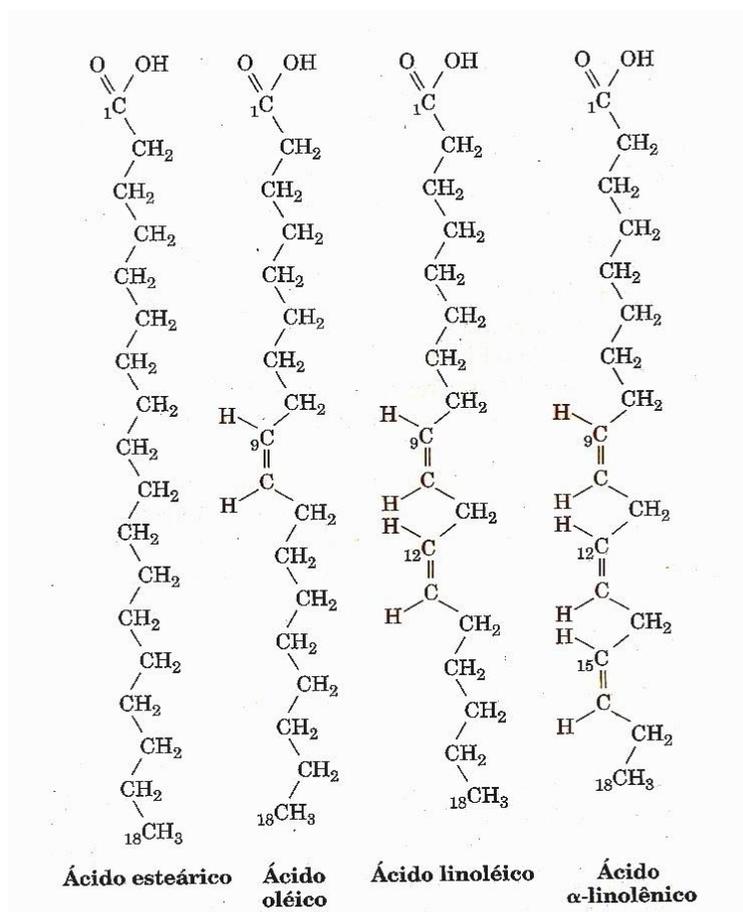
Esqueleto carbonado	Estrutura	Nome sistemático	Nome comum (derivação)
12:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$	Ácido <i>n</i> -dodecanoico	Ácido láurico
14:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$	Ácido <i>n</i> -tetradecanoico	Ácido mirístico
16:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$	Ácido <i>n</i> -hexadecanoico	Ácido palmítico
18:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$	Ácido <i>n</i> -octadecanoico	Ácido esteárico
20:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$	Ácido <i>n</i> -eicosanoico	Ácido araquídico
24:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{22}\text{COOH}$	Ácido <i>n</i> -tetracosanoico	Ácido lignocérico
16:1(Δ^9)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	Ácido <i>cis</i> -9 Hexadecenoico	Ácido palmitoleico
18:1(Δ^9)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	Ácido <i>cis</i> -9 octadecenoico	Ácido oléico
18:2($\Delta^{9,12}$)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	Ácido <i>cis</i> -, <i>cis</i> -9,12 octadecadienoico	Ácido linoléico
18:3($\Delta^{9,12,15}$)	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	Ácido <i>cis</i> -, <i>cis</i> -, <i>cis</i> -9,12,15 octadecatrienoico	Ácido α -linolênico
18:3($\Delta^{5,8,11,14}$)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$	Ácido <i>cis</i> -, <i>cis</i> -, <i>cis</i> -, <i>cis</i> -5,8,11,14 eicosatetraenoico	Ácido araquidônico

Fonte: Adaptação de Nelson e Cox (2011)

2.1.2 Ácidos Graxos Saturados e Insaturados

Os ácidos graxos podem ser classificados de acordo com suas ligações entre os átomos de carbono. Ácidos graxos saturados são aqueles que apresentam ligações simples (C-C) na cadeia hidrocarbonada e os insaturados, possuem duplas ligações (C=C) (Figura 1) (MORETTO; FETT, 1998).

Figura 1 - Exemplo de ácidos graxos comuns: ácido esteárico (saturado) e ácido oléico, linoléico e linolênico (insaturado).



Fonte: Voet (2006)

A dupla ligação é especificada por número sobrescrito, seguido da letra grega Δ (delta) e é indicada pelo número do átomo de carbono em que começa a dupla ligação, exemplo: entre o C-9 e C-10 (Δ^9) (Tabela 1) (NELSON; COX, 2011).

Na maioria dos ácidos graxos monoinsaturados (com apenas uma dupla ligação) a dupla ligação está entre o C-9 e C-10 (Δ^9) e nos ácidos graxos poliinsaturados (mais que uma dupla ligação) as duplas geralmente estão entre as posições Δ^{12} e Δ^{15} , separadas por um grupo metileno (CH_2), exemplo: $(-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-)$ (NELSON; COX, 2011).

2.1.3 Propriedades Físicas dos Ácidos Graxos e Conformação

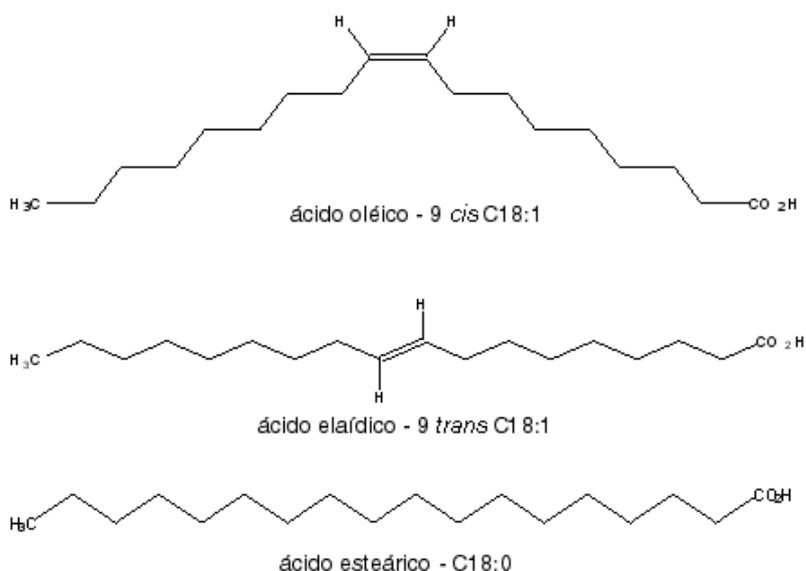
As propriedades físicas dos ácidos graxos são fortemente determinadas pelo comprimento da cadeia hidrocarbonada, grau de insaturação e

posição das duplas ligações (MANDARINO; ROESSING; BENASSI, 2005). Portanto, com o grau de insaturação têm-se a formação de dois segmentos diferentes na cadeia hidrocarbonada, chamados de isômeros (cis) e (trans) (Figura 2), onde, devido às moléculas dos átomos de carbono estar agrupadas com menor compactação e menor energia térmica, estas apresentam pontos de fusão consideravelmente mais baixos, quanto aos ácidos graxos saturados (NELSON; COX, 2011).

Os ácidos graxos na forma trans apresentam ponto de fusão mais elevado, porém inferior ao ponto de fusão do ácido graxo saturado com mesmo número de átomos de carbono. Assim, os isômeros trans podem ser considerados ácidos graxos intermediários entre um ácido graxo insaturado e um ácido graxo completamente saturado (RIBEIRO et al., 2007).

Nos óleos e gorduras naturais, encontram-se normalmente os isômeros Cis (MORETTO; FETT, 1998). Os isômeros cis são mais rapidamente metabolizados como fonte de energia que os trans (RIBEIRO et al., 2007). No isômero cis os segmentos da cadeia carbônica estão no mesmo lado, e no isômero trans em lados opostos (Figura 2) (CAMPBELL; FARRELL, 2007).

Figura 2 - Isomêros cis e trans dos ácidos graxos oléico, elaídico e esteárico.



Fonte: Costa; Bressan e Sabarense (2006).

2.2 ORIGEM DA CULTURA DA CANOLA

A planta de canola é uma oleaginosa também conhecida como colza e apresenta relatos sobre a sua existência desde a antiguidade. Sabe-se que seu cultivo remonta a Era Cristã, com relatos desde 500 a.C com o uso do seu óleo como fonte de combustível para lamparinas. Porém, como centro proposto de origem ficou conhecido a Europa e a Índia há mais de 2000 anos (DAUN, 2011).

Durante a Segunda Guerra Mundial na Europa, o óleo de colza tornou-se um lubrificante essencial para motores a vapor em navios de guerra e mercante, vindo a se destacar como medida de suprimento no Canadá, com incentivo às pesquisas com óleo para aditivo de combustível a diesel e lubrificante em processos industrial tais como: plásticos, lacas e detergentes (CASSÉUS, 2009).

Portanto, áreas de cultivo da cultura foram aumentadas no Canadá e graças ao melhoramento genético em 1974, através do pesquisador Dr. Baldur Stefansson, originou-se a planta de canola, através da seleção de plantas de colza com a finalidade de baixar o teor de ácido erúico (22:0) no óleo para menos de 2% e menos 30 micromoles de glucosinatos por grama de matéria seca na semente (DAUN, 2011). Em 1978 o nome canola passou a ser aceito como termo da marca registrada e licenciada pelo Conselho Canadense de Canola - Canadian Oil Low Acid (óleo canadense com baixa acides) (CANOLA COUNCIL OF CANADÁ, 2012).

2.2.1 Taxonomia da Canola

Brassica napus L. variedade oleífera, é uma oleaginosa, popularmente conhecida como canola ou colza, pertencente à família das Brassicaceae ou crucíferas (VELASCO; GOFFMAN; BECKER, 1999).

2.2.2 Aspectos Econômicos da Cultura da Canola

Os grãos de canola possuem média de teor de óleo de 44% em produção mundial (BARTHET; DAUN, 2011) e média de 38% de óleo para grãos cultivados no Brasil (TOMM, 2007). Quando comparado às demais oleaginosas a canola foi à segunda cultura anual produtora de óleo no mundo com 24,29 milhões

de toneladas na safra 2011/2012, sendo os principais países produtores a Europa (EU-27 - principalmente a Alemanha e a França), a China, o Canadá e a Índia (ESTADOS UNIDOS, 2013). No Brasil, a área cultivada nesta safra foi de 42,4 mil ha (CONAB, 2012), restrita principalmente aos Estados do Rio Grande do Sul (61,7 %) e Paraná (31,8 %). Segundo Tomm et al. (2010), a canola no Brasil constitui uma excelente opção de cultivo com destinação para fins agroenergéticos, especialmente para exportação e disputa do produto no mercado europeu, além de ótima opção econômica para o agricultor brasileiro.

A importância econômica da canola tem aumentado devido às suas propriedades físico-químicas do óleo, que confere a ele boa qualidade para o consumo humano e para produção de biodiesel (AUKEMA; CAMPBELL, 2011). Essa qualidade é proporcionada pela sua composição dos ácidos graxos, os quais são considerados essenciais, principalmente, para a alimentação humana, pois estes não são produzidos pelo organismo, tendo a necessidade de serem ingeridos por meio de óleo vegetais e organismos marinhos (peixes e crustáceos) (MANDARINO; ROESSING; BENASSI, 2005).

2.2.3 Importância do Óleo de Canola na Agroenergia / Produção de Biodiesel

A canola apresenta balanço energético positivo para a produção de biocombustível (GAZZONI et al. 2009). Para cada 1 (uma) unidade de energia que entra no sistema, outras 2,90 unidades de energia são produzidas (1: 2,90) e a coloca em situação favorável se comparada com o girassol (1: 2,37) e a mamona (1: 1,85).

A composição do óleo de canola é constituída em maior parte por ácido graxo insaturado, predominante o monoinsaturado ácido oléico (18:1) com teor médio de 58% e poli-insaturados, Linoléico (18:2) - 22% e Linolênico (18:3) -10% (MANDARINO; ROESSING; BENASSI, 2005). Além disso, apresenta apenas 6% ácidos graxos saturados, contra 15 e 11% do óleo de soja e de girassol, respectivamente (MORETTO; FETT, 1998). Contudo, esse baixo teor de ácido saturado confere ao óleo de canola características importantes, tais como: baixo ponto de fusão (característico do ácido oléico) (MORETTO; FETT, 1998), baixo índice de iodo (114 gI₂/100g) e ponto de névoa de - 4 °C. Segundo Aukema e

Campbell (2011) para produção de biodiesel, índices menores de iodo são favoráveis para evitar oxidação, formação de ácidos corrosivos, formação de depósitos no motor - bicos injetores e aumento no desgaste da bomba de combustível. Enquanto que o óleo de soja é de 130 gl²/100g com a formação de cristais a 3 °C e o sebo comestível a partir de 19 °C.

2.3 HISTÓRIA DA ESPECTROSCOPIA ELETROMAGNÉTICA

Segundo Davies (1998), os estudos sobre a espectroscopia eletromagnética iniciou-se após o experimento de Frederick William Herschel em 1800, com a descoberta da região do infravermelho, ao colocar um bulbo de um termômetro em cada uma das partes coloridas do espectro solar e visualizar o aumento da temperatura nas proximidades da região da cor vermelha e aumento ainda maior na região não iluminada, depois desta coloração.

Somente no final do século XIX com os cientistas Abney e Festing em 1882, com obtenção de mais de 50 compostos através dos espectros de absorção, que os estudos sobre espectroscopia na radiação do infravermelho tomaram forças, com algumas dificuldades entre a interação da luz e vários materiais (BARBOSA, 2008).

No entanto, após os trabalhos iniciados em 1903, pelo pesquisador William W. Coblentz, com experiências abrangentes, foi possível verificar a utilidade dos espectros de absorvância no infravermelho para identificação de grupos funcionais, de forma precisa, para centenas de compostos inorgânicos e orgânicos (DERRICK; STULIK; LANDRY, 1999).

Com o avanço da eletrônica na década de 1940, equipamentos mais sofisticados e rápidos se tornaram disponíveis no mercado, de modo que a partir da década 1950 a espectroscopia no infravermelho passou a ser rotineiramente utilizada pelos químicos e com equipamentos modernos, onde a obtenção de um espectro no infravermelho nos dias de hoje leva apenas alguns minutos (BARBOSA, 2008).

Assim, a espectroscopia no infravermelho é certamente uma das técnicas analíticas mais importantes para o químico moderno devido às suas áreas de aplicação, desde identificação de compostos inorgânicos e orgânicos, estudo dos

polímeros, análise de misturas complexas como gasolina e poluentes atmosféricos, controle de qualidade de diversos produtos, estudo de semicondutores, transporte de moléculas bioativas em tecidos vivos, mecanismo de catálise e entre outros (BARBOSA, 2008).

2.3.1 Conceito sobre Espectroscopia de Infravermelho

A espectroscopia de infravermelho (IV) pode ser definida como ondas ou radiação eletromagnética, que se movem com a velocidade da luz ($2,998 \times 10^8 \text{ m s}^{-1}$ no vácuo), através da diferenciação de amplitude, comprimento e frequência desta, onde, associadas a variações de energia molecular ocasionam transições vibracionais devido à absorção ou emissão de um fóton (STUART, 1997).

A energia de um fóton envolvida neste fenômeno é dada por:

$E = h.v$, onde h é a constante de Planck ($6,626 \times 10^{-34} \text{ J s}$) e v é a frequência de transição. Logo, como a radiação eletromagnética também pode ser tratada por onda, a energia envolvida neste tipo de transição pode ser também expressa por:

$E = h.v = h. c/ \lambda$, onde c corresponde à velocidade da luz e λ comprimento de onda (PASQUINI, 2003).

A região espectral do infravermelho (IR) compreende faixa de radiação com números de onda de aproximadamente 12800 a 10 cm^{-1} , onde esta se subdivide em três regiões (Tabela 2) de acordo com a proximidade do espectro: (próximo – NIR), (médio – MIR) e (distante – FAR) (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

Tabela 2 - Regiões espectrais do infravermelho.

Região	Intervalo de número de onda ($\bar{\nu}$), cm^{-1}	Região em comprimento de onda (λ), nm	Região de frequência em (V), Hz
Próximo (NIR)	12.800 a 4.000	780 a 2.500	$3,8 \times 10^{14}$ a $1,2 \times 10^{14}$
Médio (MIR)	4.000 a 200	2.500 a 5.000	$1,2 \times 10^{14}$ a $6,0 \times 10^{12}$
Distante (FIR)	200 a 10	5.000 a 100.000	$6,0 \times 10^{12}$ a $3,0 \times 10^{11}$

Fonte: Skoog; Holler e Nieman (2002).

2.3.2 Espectroscopia de Infravermelho Próximo - NIR.

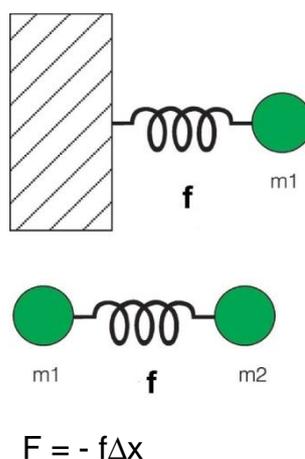
Os primeiros estudos sobre a espectroscopia de infravermelho próximo (NIR) iniciaram em 1965 com os trabalhos de Karl Norris, através da procura de novos métodos para determinação de umidade em produtos agrícolas (PASQUINI, 2003) com subsequente introdução da técnica de NIR para a indústria de grãos e sementes em 1973, como meio de análise rápida de proteína e óleo (PANDORF; MAN, 1990).

A espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) é um tipo de espectroscopia vibracional que emprega energia de fótons (feixes de luz) no intervalo de $2,65 \times 10^{-19}$ a $7,96 \times 10^{-20}$ J, o que corresponde ao comprimento de onda de 780 a 2.500 nm (PASQUINI, 2003), com bandas de absorção por vibrações fundamentais, com características essencialmente de sobretons e por combinações (BLANCO; VILLARROYA, 2002).

2.3.3 Vibrações Moleculares

A vibração da molécula na região do infravermelho se dá através da absorção da radiação, variação no momento dipolo, massa (m) do átomo, constante de força (f) e ligação química entre os átomos da molécula (DERRICK; STULIK; LANDRY, 1999; BARBOSA, 2008). Portanto, a vibração é o resultado da absorção da radiação com deslocamento dos átomos em relação um ao outro, através do movimento de compressão ou estiramento entre as ligações, representados por dois modos de vibração: estiramento e deformação angular (BARBOSA, 2008). No caso, como exemplo explicativo sobre o estiramento, tem-se a lei de Hooke, onde estabelece que, se uma mola é esticada até uma determinada quantidade (Δx), existirá uma força oposta de restauração (f), que é proporcional ao deslocamento (Δx), conforme (Figura 3) (BARBOSA, 2008). O sinal negativo que aparece no primeiro membro indica que a força de restauração da mola é oposta ao deslocamento sofrido pela partícula.

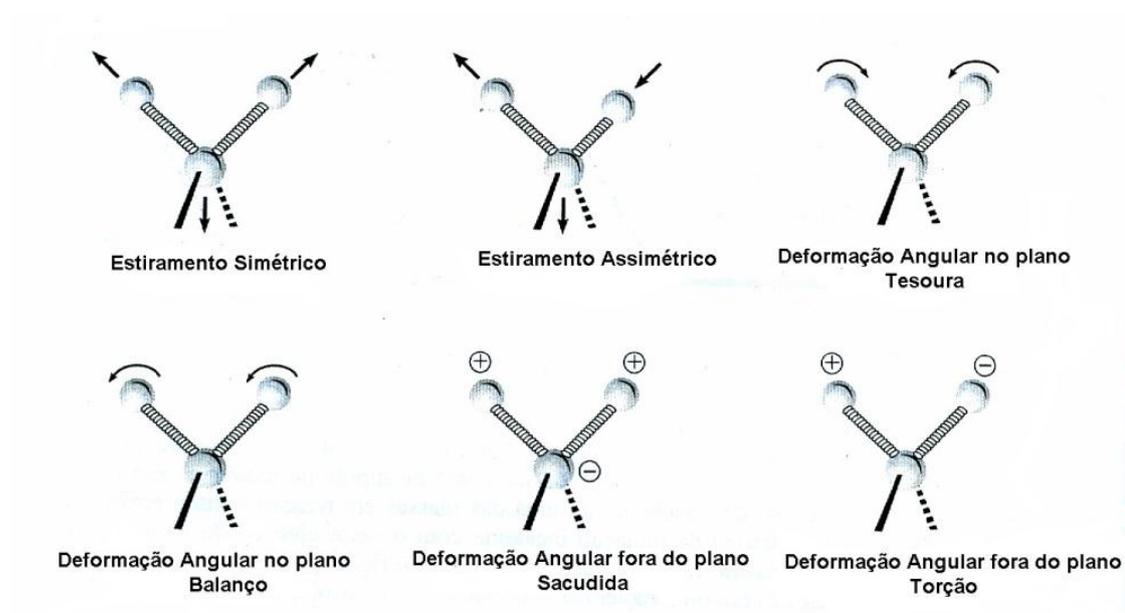
Figura 3 - Deslocamento entre átomos na molécula, lei de Hooke.



Fonte: Oliveira (2001)

Para as representações vibracionais de estiramento dos átomos das moléculas tem-se os modos (simétrico e assimétrico) e para as deformações angulares (tesoura δ , balanço ρ , torção τ , sacudida ω), onde também podem ser simétrica e assimétrica fora e dentro do plano (Figura 4) (DERRICK; STULIK; LANDRY, 1999; BARBOSA, 2008).

Figura 4 - Representação dos modos vibracionais das moléculas. Os sinais de + e - indicam movimentos perpendiculares ao plano do papel.

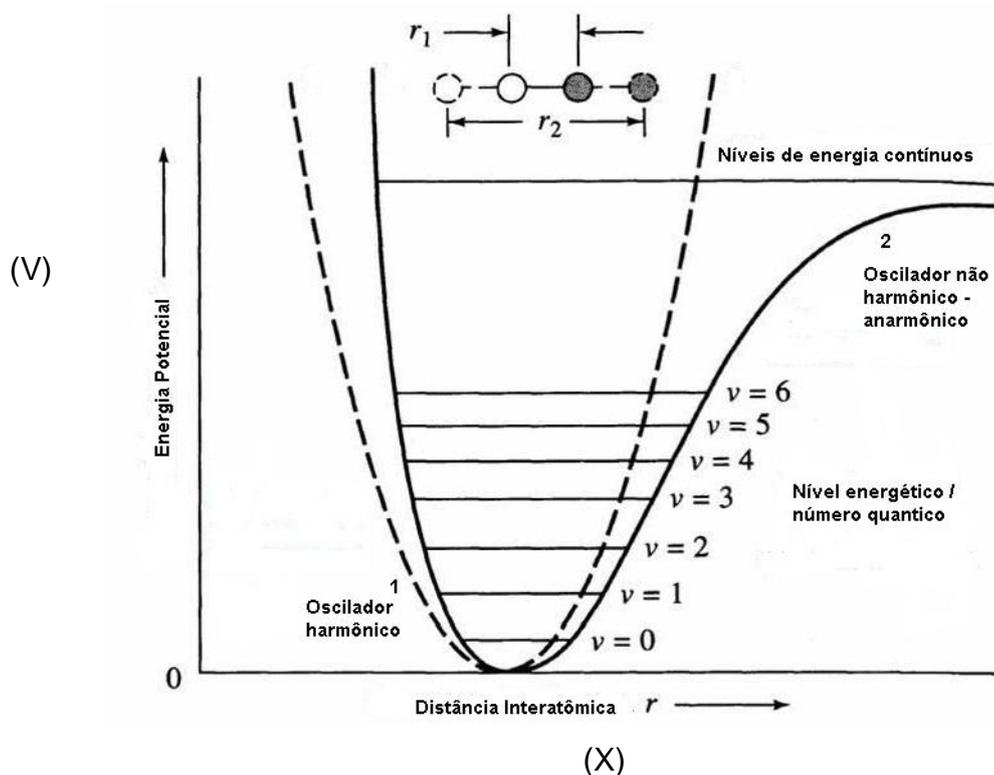


Fonte: Adaptação de Barbosa (2008)

Assim, para cada átomo de uma molécula, este pode se movimentar através de coordenadas definidas por três eixos cartesianos x , y e z , com movimentos de modos distintos, associados a três possíveis transições: vibracionais, rotacionais e translacionais (OLIVEIRA, 2001), com amplitude nanométrica, que são transferidas e aumentadas para as demais moléculas (STUART, 1997), correspondente a uma energia potencial de vibração molecular (BARBOSA, 2008).

A energia potencial de vibração molecular pode ser descrita por um modelo simplificado, supondo um oscilador harmônico, para a qual a energia potencial (V) esta função do deslocamento dos átomos de (X), dado pela (Figura 5).

Figura 5 - Oscilador harmônico e não harmônico.



Fonte: Adaptação de Pasquini (2008) e Somoza (2006).

O modelo de oscilador harmônico descreve o comportamento do potencial energético vibracional das moléculas, de modo mais simples e realista, em função do deslocamento do átomo em equilíbrio (estado mínimo de energia) (OLIVEIRA, 2001; PASQUINI, 2003). Porém, este é falho, devido não descrever o comportamento real das moléculas através da repulsão ou dissociação entre os átomos e pelo fato de que os sistemas moleculares não podem assumir o perfil de

energia contínua, igualmente espaçados ($\Delta u = \pm 1$), sendo o (u) definido como número quântico de vibração para as transições entre níveis energéticos (BARBOSA, 2008; PASQUINI, 2003).

Logo, através do oscilador não harmônico (anarmônico), têm-se um melhor comportamento das moléculas, resultando-se em transições entre os estados de energia vibracional, onde: $\Delta u = \pm 2, \pm 3...$ (sucessivamente), devido os níveis de energia não ser igualmente espaçados (Figura 5) (LIMA et al., 2009).

2.3.4 Interpretação das Bandas Espectrais - NIR

Segundo Oliveira (2001), um espectro nada mais é do que ter em mãos uma espécie de impressão digital de um composto químico.

Os espectros são dados particulares de uma matriz, resultados de características físicas e constituição química, que contém diversas bandas de absorção, que podem ser utilizadas para análises qualitativas ou quantitativas. Estas bandas de absorção são radiações eletromagnéticas associadas a um movimento vibracional (BARBOSA, 2008).

Assim, a intensidade de uma banda de absorção está associada com a mudança de magnitude do momento dipolo durante o deslocamento dos átomos com vibração e grau de anarmonicidade, onde ambos os fenômenos estão presentes em grande intensidade e associados às ligações que envolvem o átomo de hidrogênio, carbono, nitrogênio e enxofre. (PASQUINI, 2003).

Logo, as ligações OH, CH, NH e SH tendem a apresentar anarmonicidade de energia, com transições vibracionais fundamentais (BLANCO; VILLARROYA, 2002). Todavia, como os valores de eletronegatividade dos átomos aumentam na ordem de $C < N < O < F$, observa-se um aumento nos números de ondas de absorção na mesma sequência indicada dos grupos funcionais ($C-H < N-H < O-H < F-H$ e $S-H$) (BARBOSA, 2008).

As ocorrências espectrais na região NIR são dominadas por bandas de absorção de sobretons (overtones) e por combinação (estiramento e deformação angular), com características de absorção de ligações CH, OH, NH. Estas ligações C-H estão presentes em grupos funcionais como o CH_2 (metileno), CH_3 (metil) e o $-CH=CH-$ (etenil) (WESTAD; SCHMIDT; KERMIT, 2008; LIMA et al., 2009).

Os grupos funcionais formados por átomos com grande diferença de eletronegatividade, como carbonila C=O, hidroxila O-H e amino N-H, geralmente dão origem a bandas de absorção mais intensas, devido as vibrações de estiramento dos átomos, onde, por sua vez, originam bandas mais intensas que as de deformação angular (BARBOSA, 2008).

De modo geral, na região do NIR, bandas com vibração de sobretons aparecem aproximadamente entre 780 nm a 1820 nm, dependendo da natureza, força e característica química da molécula, com ordem de primeiro e segundo sobreton; e aproximadamente entre 1820 nm a 2500 nm, bandas com vibração de combinação (LIMA et al., 2009).

Devido à complexidade na obtenção das informações contidas nos espectros de NIR, faz-se necessário a utilização de métodos quimiométricos.

2.4 QUIMIOMETRIA

A quimiometria é uma área destinada à análise de dados químicos de natureza multivariada com uso de técnicas matemáticas, estatísticas e informática, para extrair informações relevantes a partir de dados analíticos, no caso, dados espectrais do NIR (FERREIRA et al., 1999).

Segundo Pasquini (2003), atualmente a espectroscopia de NIR é a técnica analítica que mais aplica quimiometria. Tanto a quimiometria como a tecnologia do NIR evoluíram em simbiose, com modelos cada vez mais robustos na quantificação e identificação de compostos químicos e propriedades físico-químicas, estendendo a aplicabilidade da técnica NIR e levando a novos desafios para a quimiometria.

Por conseguinte, umas das características mais interessantes dos modernos instrumentos de espectroscopia é o número das variáveis que podem ser medidas simultaneamente, a partir dos espectros obtidos em comprimentos de onda (cm^{-1}) ou (nm), com o fornecimento de dados posteriormente tratados, através de equações, resultando em curvas de calibração (FERREIRA et al., 1999).

2.5 CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA

O objetivo de uma análise química é determinar a concentração de um determinado analito em amostras, isto é, um composto químico de interesse presente nas mesmas. Para isto, é necessário construir um modelo de calibração, ou seja, determinar a relação entre propriedades medidas e concentração (BARROS; SCARMINIO; BRUNS, 2006).

Assim, a calibração, em geral, é uma operação que relaciona uma grandeza de saída com uma grandeza de entrada, para um sistema de medida sob determinadas condições (BARROS; PIMENTA; ARAÚJO, 2002).

O processo geral de calibração consiste de duas etapas: modelagem, que estabelece uma relação matemática entre \mathbf{x} e \mathbf{y} no conjunto de calibração, e a validação que otimiza a relação no sentido de uma melhor descrição do analito de interesse (FERREIRA et al., 1999).

Logo, os sinais dos espectros de cada amostra, são organizados numa matriz, \mathbf{x} ($\mathbf{n} \times \mathbf{m}$), de variáveis independentes, onde cada linha representa uma amostra, e cada coluna de \mathbf{x} corresponde a um comprimento de onda específico. Assim, o outro conjunto de dados é constituído pelas variáveis dependentes e organizado na matriz \mathbf{y} e caso haja mais de uma variável (mais de um analito de interesse) pelo vetor \mathbf{y} (Figura 6). O total de elemento deste vetor é igual a (\mathbf{n}), isto é, o numero de amostras, e este corresponde às concentrações de um determinado analito ou propriedade de interesse que se espera prever (FERREIRA et al., 1999).

Figura 6 - Representação adaptada das matrizes de dados (\mathbf{x} e \mathbf{y}) na calibração multivariada.

$$\mathbf{x} = \begin{pmatrix} \mathbf{x}_{11} & \mathbf{x} \dots & \mathbf{x}_{1m} \\ \mathbf{x} & \mathbf{x} \dots & \mathbf{x}_{2m} \\ \cdot & \cdot & \cdot \\ \cdot & \cdot & \cdot \\ \cdot & \cdot & \cdot \\ \mathbf{x}_{n1} & \mathbf{x}_{n2} & \mathbf{x}_{nm} \end{pmatrix} \qquad \mathbf{y} = \begin{pmatrix} \mathbf{y}^1 \\ \mathbf{y}^2 \\ \cdot \\ \cdot \\ \mathbf{y}^3 \end{pmatrix}$$

Variáveis Independentes
Variável dependente

Fonte: Adaptação de Ferreira et al. (1999) e Pimentel; Galvão e Araújo (2008)

Portanto, para melhorar a matriz do conjunto de dados e obter eficiência na construção dos modelos de calibração, faz-se uso de pré-processamento ou pré-tratamentos, para identificar possíveis problemas, mediante as interferências espectrais e o desconhecimento do composto analisado. Geralmente, os dados espectrais do NIR sofrem algum pré-tratamento para superar os problemas associados com o espalhamento da radiação e outros fenômenos que afetam a linha de base devido à falta de homogeneidade das amostras (PASQUINI, 2003; FERREIRA et al., 1999).

2.5.1 Pré-processamento ou Pré-Tratamento Espectral

Existem vários pré-processamentos para espectroscopia, porém, os mais utilizados para espectros do NIR são: Normalização, derivadas (geralmente primeira e segunda) – utilização do algoritmo Savitzky-Golay, aplicação de correção de espalhamento multiplicativo (MSC - Multiplicative Scatter Correction) e variação normal padrão (SNV- Standard Normal Variate) (BLANCO; VILLARROYA, 2002; BEEBE; PELL; SEASHOLTZ, 1998).

A normalização é a divisão ou multiplicação de cada variável de um vetor da amostra por uma constante com a remoção de variações relativas, as derivadas são utilizadas para corrigir variações na linha de base e problemas de sobreposição aleatórios dos espectros, com a suavização da relação sinal/ruído através do filtro SavitskyGolay e MSC e SNV amenizam problemas de dispersão de luz, muito comum em varreduras espectrais por refletância difusa, onde a incidência da radiação é direta na amostra (BEEBE; PELL; SEASHOLTZ, 1998; PASQUINI, 2003).

2.5.2 Construção dos Modelos de Calibração

Dentre vários métodos utilizados para a calibração, os mais comuns são: as regressões em componentes principais (PCR), mínimos quadrados parciais (PLS), algoritmo genético (GA), redes neurais artificiais (ANN) e mínimos quadrados parciais não lineares (N-PLS) (BARROS; SCARMINIO; BRUNS, 2006). Porém, PCR e PLS podem ser considerados como técnicas de calibração padrão para

espectroscopia de NIR (PASQUINI, 2003). Os dois métodos são consideravelmente mais eficientes para lidar com ruídos experimentais, colinearidades e não linearidades, além de não se alterarem com a inclusão de novas amostras no conjunto de calibração (FERREIRA et al., 1999). Porém a técnica de (PLS) é a técnica mais comum na construção de modelos de calibração multivariada com uso de sinais de espectros (GELADI; KOWALSKI, 1986).

Segundo Spiegelman et al. 1998, teve-se uma melhora na seleção espectral inteira ou seleção específica, com modelos mais robustos de calibração, onde colinearidade não esteve presente. A colinearidade é um número excedido de variáveis independentes, correlacionadas, com a formação de estimativas extremamente exageradas dos coeficientes de regressão (HOSMER; LEMESHOW, 2000), onde traz a necessidade de retirar ou selecionar algumas variáveis explicativas ou obter maior número de observações, em processo demorado e tedioso (FERREIRA et al., 1999). Assim, não é desejável que exista alta correlação entre as variáveis independentes, pois o modelo de regressão é sensível à colinearidade entre as variáveis (HAIR et al., 1998).

O PLS é um método que tem como objetivo encontrar uma relação entre a matriz \mathbf{x} (espectros das amostras) e o vetor que armazena as respectivas concentrações (dados do método de referência) \mathbf{y} , onde \mathbf{b} é o vetor de regressão e (\mathbf{e}) é o vetor que representa o erro do modelo (MORGANO, 2005) resultando em variáveis latentes, identificadas como combinações lineares (FERREIRA et al., 1999), conforme equação:

$$y = \mathbf{x}\mathbf{b} + \mathbf{e}$$

O PLS consiste na decomposição de uma matriz (\mathbf{X}) , através da soma das várias matrizes $M_1+M_2\dots$, onde (\mathbf{a}) é o número de variáveis latentes, e (\mathbf{E}) corresponde a matriz de resíduos, relacionada ao número de variáveis latentes escolhidas, conforme a equação:

$$\mathbf{X} = \mathbf{M}_1 + \mathbf{M}_2 + \dots + \mathbf{M}_a + \mathbf{E}$$

Na modelagem, as matrizes (\mathbf{M}) das variáveis \mathbf{x} e \mathbf{y} , são formadas pelo produto de dois vetores, \mathbf{t} (escores) e \mathbf{p} (pesos) e a soma de \mathbf{h} variáveis latentes, conforme as expressões a seguir:

$$\mathbf{X} = \sum t_h \mathbf{p}_h^t + \mathbf{E} = \mathbf{TP}^t + \mathbf{E}$$

$$\mathbf{y} = \sum u_h \mathbf{q}_h^t + \mathbf{F} = \mathbf{UQ}^t + \mathbf{F}$$

A relação entre as duas matrizes de dados **x** e **y** pode ser obtida, correlacionando-se os escores de cada bloco, a fim de obter uma relação linear descritiva conforme expressão:

$$U = bT + e$$

Nesse caso, a letra **U** passa a ser a matriz contendo as propriedades (variáveis dependentes) de todas estas amostras; **b** é um vetor contendo os parâmetros do modelo; **T** é uma matriz de resposta (exemplo: o conjunto de espectros) para uma série de amostras de calibração e (**e**) é um vetor que representa o ruído do espectro e os erros do modelo (KONZEN et al., 2003).

2.6 VALIDAÇÃO

A validação é a precisão desejada da técnica de NIR através da capacidade de produzir resultados semelhantes aos obtidos com o método de referência, mediante as estimativas das concentrações dos análitos no conjunto de amostras de calibração e previsão. Essas estimativas são expressas através do coeficiente de determinação (R^2), erro padrão de calibração (SEC - Standard Error of Calibration) e do erro padrão de validação ou erro padrão de desempenho (SEP - Standard Error of Prediction) (PIMENTEL; GALVÃO; ARAÚJO, 2008). O valor do SEC indica a melhor precisão teórica obtida para o conjunto de variáveis utilizadas para o desenvolvimento da calibração e o valor do SEP indica o desvio padrão da diferença entre o método de referência e a técnica de NIR para as amostras no conjunto de validação (BATTEN, 1998), e são definidos através da fórmula (Figura 7).

Figura 7 - Fórmulas do SEC e SEP.

$$SEC = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_{pred} - y_{obs})^2}{n}}$$
$$SEP(\%) = 100 \times \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_{pred} - y_{obs})^2}{\sum_{i=1}^n (y_{obs})^2}}$$

Fonte: Goodarzi et al. (2009)

Em que **y** (predito) é a concentração prevista ou estimada da amostra pelo modelo, **y** (observado) é o valor da concentração verdadeira da amostra, e **n** é o número de amostras no conjunto de validação (GOODARZI, et al., 2009).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Para estabelecer a equação de calibração de avaliação do teor de óleo em sementes de canola, por espectroscopia de reflectância no infravermelho próximo, foram utilizadas 124 famílias de meio-irmãos, semeadas em Londrina (2008) e Pato Branco (2009), PR, pelo Instituto Agronômico do Paraná - IAPAR. Essas famílias foram provenientes de uma população oriunda do cruzamento entre 14 genótipos pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma de canola da Embrapa. Londrina está situada a 23° 21' 23" de latitude Sul, 51° 09' 52" de longitude Oeste, com 585 m de altitude e apresenta solo tipo Nitossolo Vermelho eutrófico. Pato Branco está situada a 26° 13' 43" Sul, 52° 40' 10" Oeste, 760 m de altitude e apresenta de solo tipo Latossolo Bruno distrófico.

3.1 COLETA DE ESPECTROS PARA CALIBRAÇÃO DO EQUIPAMENTO NIR

Foi utilizado equipamento de espectroscopia de infravermelho próximo (NIR) da marca Thermo Scientific, modelo Antaris II, dotado de esfera de integração e leitura na faixa entre 1100 e 2500 nanômetros (Figura 8).

Figura 8 - Equipamento NIR Thermo Scientific modelo Antaris II com esfera de integração.



Fonte: Autora

Os espectros de absorção das amostras padrões (famílias de meios-irmãos) foram obtidos de sementes de canola, intactas (com tegumento), após homogeneização e limpeza prévia das mesmas. Inicialmente foram coletados os espectros de todas as amostras (tanto para geração da curva, como para a

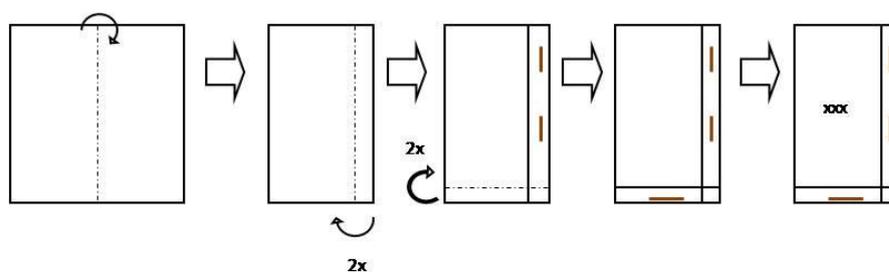
validação desta) com o NIR ajustado para a obtenção de 32 scans a 4 cm^{-1} (número de onda eletromagnética) de resolução por amostra, com absorvância de $(\text{Log}1/R)$.

Posteriormente, cada amostra foi subdividida em duas porções, sendo uma parte moída para quantificação do teor de óleo pelo método Soxhlet (utilizado como método referência) e a outra conservada intacta para posterior necessidade.

3.1.1 Extração Química do Teor de Óleo

A extração química do teor de óleo foi determinada pelo processo gravimétrico, após extração da fase etérea (ZENEBOON; PACUET; TIGLEA, 2008). Para a extração, foram preparados pacotes (sachês) em papel filtro, dobrando cada folha deste papel de forma a obter pequenos sachês com espaço interno suficiente para receber a amostra a ser desengordurada. Após dobrar duplamente as bordas do papel, os cantos foram grampeados, conforme (Figura 9).

Figura 9 - Modelo de preparo de pacotes (sachês) em papel filtro.



Fonte: Adaptação ao método oficial AOCS BC 3-49 (2009) - Embrapa Soja

As sementes de canola foram moídas e transferidas para o pacote preparado, correspondente a 500 mg de farelo. Cada amostra foi avaliada em duplicata, identificada e mantida durante 1 hora em estufa de secagem a $105 \text{ }^\circ\text{C}$, para redução da umidade. Com auxílio de pinça metálica, esta foi retirada da estufa e resfriada em dessecador (durante 15 minutos), pesando-a em seguida.

Para a extração, a amostra foi colocada em extrator tipo Soxhlet acoplado a um balão de fundo chato, utilizando o solvente N-hexano para a extração, durante 6 horas (Figura 10). Ao final deste processo, as amostras foram secas em estufa a $105 \text{ }^\circ\text{C}$ por 1 hora, com posterior pesagem.

Figura 10 - Extração de óleo pelo método Soxhlet.



Fonte: Autora

Também foi determinado o teor de umidade inicial da amostra para converter o resultado final de base úmida para base seca. Para isso, subtraiu-se no valor da massa da amostra o seu teor de umidade. Em seguida foi aplicada a seguinte fórmula para a quantificação do teor de óleo:

$$\% \text{ óleo} = \frac{(\text{massa final do pacote}) - (\text{massa inicial do pacote})}{(\text{massa da amostra, em gramas})} \times 100$$

Os parâmetros de leitura e calibração foram definidos inicialmente utilizando-se como base os trabalhos sobre quantificação de óleo em sementes de soja e de girassol (PARREIRA et al., 2002; GRUNVALD et al., 2009).

3.1.2 Calibração do Modelo Matemático para Predição do Teor de Óleo

A calibração do NIR foi realizada com base na construção do modelo de regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) com correção do espalhamento da radiação/espectros, durante a realização das medidas ou variabilidade das propriedades das amostras, através das técnicas de pré-processamento SNV – Variação Normal Padrão.

Para a calibração, as informações espectrais do NIR foram correlacionadas com os teores de óleo obtidos pelo método padrão químico de referência – Soxhlet (ZENEBO; PACUET; TIGLEA, 2008). Foram utilizados a primeira derivada e o filtro de Savitzky-Golay para reduzir ou suavizar sinais / ruídos aleatórios, com intervalo de 11 pontos e ordem polinomial 1. Para explicar o modelo matemático foram utilizados 7 componentes principais.

3.1.3 Validação da Curva / Correlações entre os Métodos Soxhlet e NIR

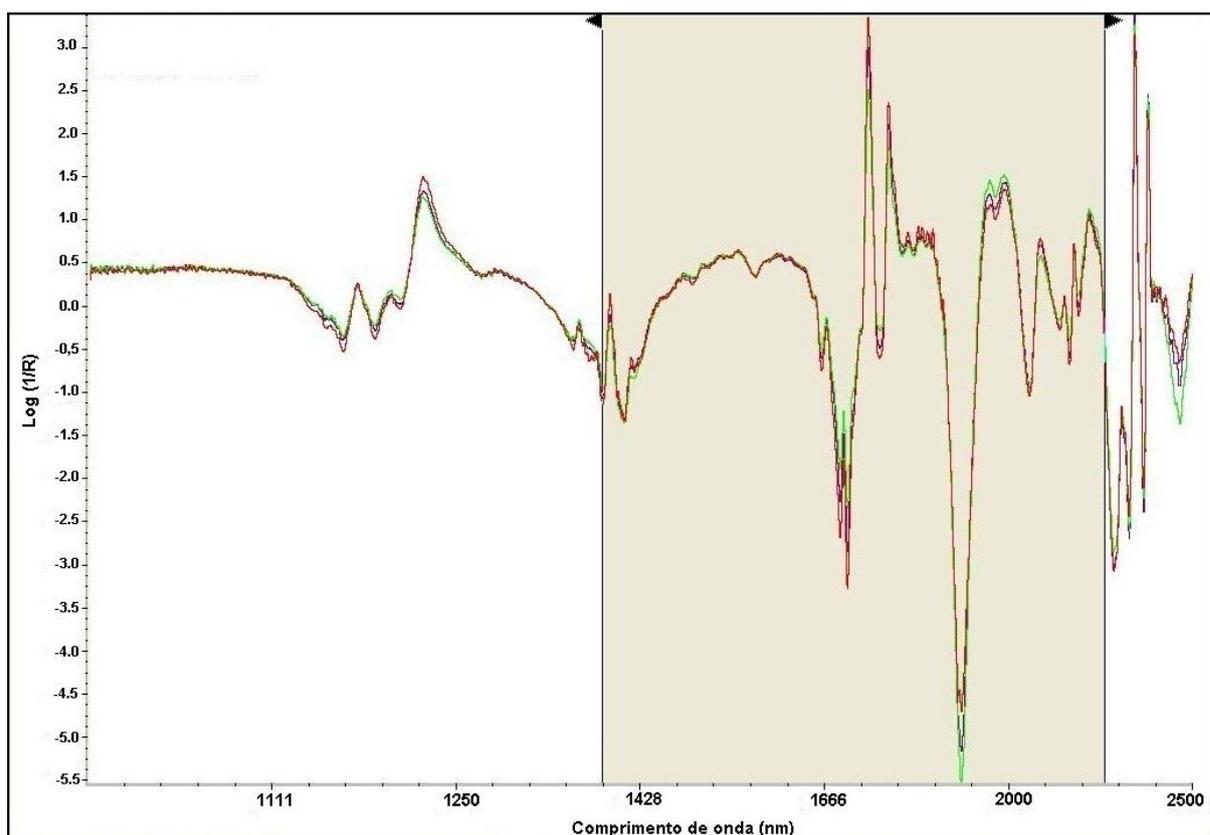
A precisão e a validação da equação de calibração foram efetuadas por meio do programa TQ Analyst da Thermo Scientific, estimando-se o coeficiente de determinação (R^2), o erro padrão de calibração (SEC) e erro padrão de desempenho (SEP). Adicionalmente, foram comparados os valores dos teores de óleos de 10 híbridos de canola introduzidos no Brasil (Hyola 50, Hyola 61, Hyola 76, Hyola 401, Hyola 411, Hyola 432, Hyola 433, Hyola 571, Q 6501 e Q 6503), obtidos pela curva de calibração do aparelho NIR e pelo método químico de referência (ZENEBO; PACUET; TIGLEA, 2008).

As estimações dos teores de óleo dos híbridos, cujos valores não foram inseridos na calibração, foram obtidas de sementes provenientes de dois ensaios conduzidos em Encruzilhada do Sul (ano 2009) e Três de maio (ano 2010) (RS). Encruzilhada do Sul está situada na latitude de 30° 32' 28" Sul, longitude de 52° 31' 19" Oeste, 432 m de altitude e apresenta solo tipo Argissolo Vermelho Amarelo distrófico e Três de Maio está situada a 27° 46' 24" latitude Sul, 54° 14' 24" longitude Oeste, 343 m de altitude e apresenta solo tipo Cambissolo Háplico eutrófico. O delineamento experimental foi de blocos ao acaso, com três repetições e adotou-se o modelo de parcela subdividida. As parcelas foram constituídas pelos híbridos e as subparcelas pelos dois métodos de avaliação do teor de óleo. As análises de variância foram realizadas por meio do programa Genes (CRUZ, 2001).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

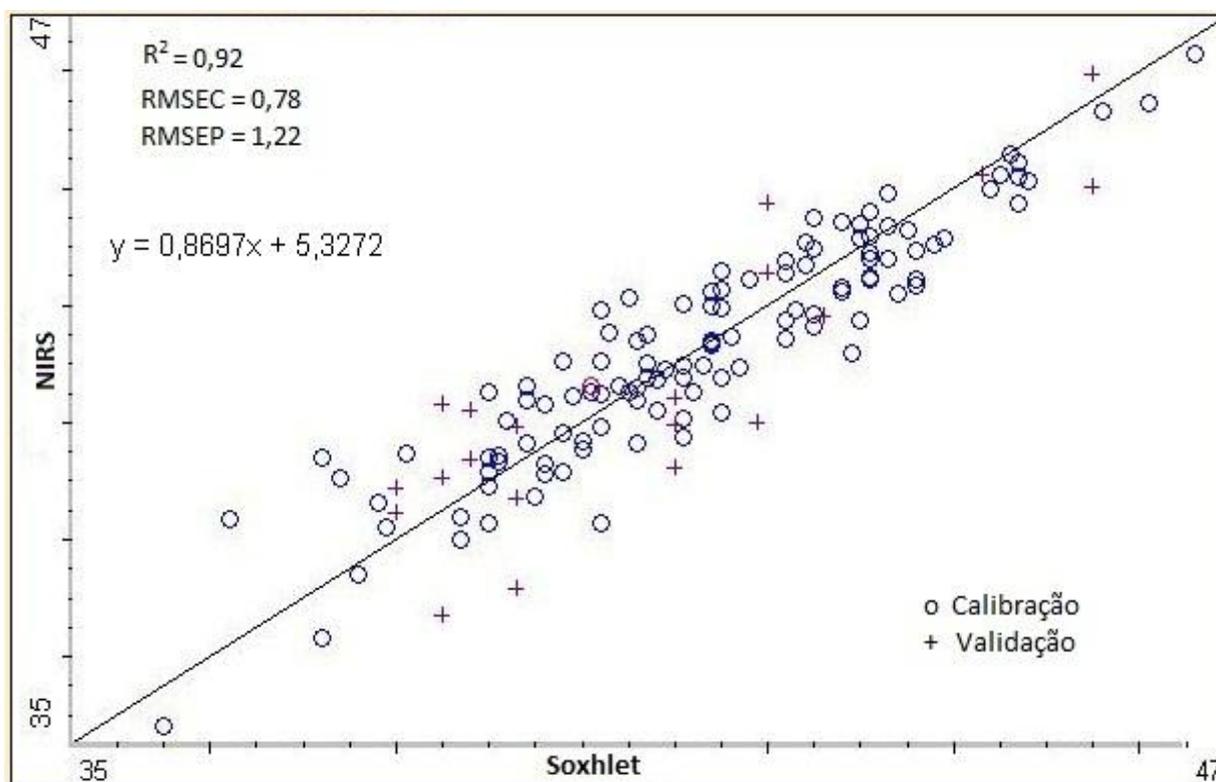
A região do espectro do infravermelho estabelecida para a determinação da equação de calibração do equipamento de NIR para avaliar o teor de óleo em canola, nas condições edafoclimáticas da região Sul do Brasil, compreendeu os comprimentos de onda de 1386 nm a 2228 nm (Figura 11). Com a adoção desta região, o coeficiente de determinação (R^2) da equação foi de 0,92, o erro padrão de calibração (SEC) de 0,78 e o erro padrão de desempenho (SEP) de 1,22 (Figura 12).

Figura 11 - Região estabelecida para a determinação da equação de calibração do equipamento de NIR, para avaliação do teor de óleo (%) em genótipos de canola, de 1386 a 2228 nanômetros (nm).



Fonte: Autora

Figura 12 - Equação de calibração do aparelho de NIR para o teor de óleo (%) em sementes intactas de genótipos de canola.



Fonte: Autora

A região estabelecida para a estimação da equação compreendeu as regiões B (1300 a 1600 nm), C (1600 a 1850 nm), D (1850 a 2050 nm) e E (2050 a 2230 nm), definidas por Hourant et al. (2000). Ao ser utilizada a primeira derivada, os maiores picos de absorção ocorreram nas regiões C, D e F (2230 a 2500 nm) (Figura 11). A região C contém bandas no espectro que são características do primeiro sobretom de vibração de estiramento C-H dos grupos metileno (C-H₂), metil (C-H₃) e etenil (-CH=CH-) e a região D contém bandas envolvendo a combinação de ligação de estiramento C-H do grupo etenil e do grupo O-H, principalmente relacionado com a água (HOURANT et al., 2000). Apesar da presença de picos de absorção, as regiões A (1100 a 1300 nm) e F (2230 a 2500 nm) não foram consideradas no estudo devido à similar ou menor precisão da equação com suas inclusões ($R^2 = 0,93$; SEC = 0,71; SEP = 1,20) e ($R^2 = 0,87$; SEC = 0,98; SEP = 1,31), respectivamente.

A região espectral entre 1880 a 1930 nm está associada ao conteúdo de água e não ao teor de óleo, como observado em algumas oleaginosas -

soja (PARREIRA et al., 2002), girassol (FASSIO; COZZOLINO, 2004) e (GRUNVALD, 2012) e canola (WESTAD; SCHMIDT; KERMIT, 2008). Isto é resultado das vibrações de estiramento de grupos funcionais formados por átomos com grande diferença de eletronegatividade, como a hidroxila, por resultarem em bandas mais intensas nesta região (BARBOSA, 2003). Devido à associação com a água, a inclusão desta região para o estabelecimento da equação de calibração pode não ser satisfatória, como verificado na análise do teor de óleo de girassol cultivado na região centro-sul do Brasil (GRUNVALD, 2012). Contudo, neste estudo, sua não inclusão aumentou a precisão da estimativa, em relação a equação incluindo apenas as regiões B, C e E ($R^2 = 0,85$; SEC = 1,07; SEP = 1,22) (Figura 11 e Figura 12). Resultados similares foram obtidos em Parreira et al. (2002) e Westad; Schmidt e Kermit (2008).

Para a estimação da equação indicada na Figura 12 foram utilizadas 248 amostras padrões provenientes de uma população oriunda do cruzamento entre 14 genótipos. O teor de óleo das amostras variou de 36 a 47%, variabilidade esta encontrada em *Brassica napus*. A precisão da equação indicada na Figura 12 ($R^2 = 0,92$, SEC = 0,78; SEP = 1,22) foi similar a obtida por Tkachuk (1981), Greenwood et al. (1999) e Hom; Becker e Möllers (2007) e superior a Velasco; Goffman e Becker (1999). Neste último, além da canola, outras espécies da família Brassicaceae foram utilizadas na estimação da equação, com $R^2 = 0,97$, SEC = 1,85; SEP = 1,92. A maior variabilidade genética pode ter influenciado nas estimativas encontradas.

Mesmo utilizando amostras de sementes com diferentes colorações de tegumento foi possível estimar uma equação, com precisão satisfatória e com baixo número de amostras padrão (248 amostras) (Figura 12). A pouca influência da coloração do tegumento na estimação foi também obtida por Tkachuk (1981), em canola e Wang; Ram e Dowell (2002), em soja. Mas, quando a variabilidade deste caráter é maior, como verificado em girassol, uma menor precisão da estimativa ($R^2 = 0,87$, SEC = 2,79; SEP = 2,57) tem sido obtida e um maior número de amostras tem sido requerido (901 amostras) (GRUNVALD, 2012). Além da coloração do tegumento, isto pode ter sido consequência, também, da uniformidade da morfológica da semente de canola, do reduzido número de ambientes em que foram obtidas as amostras (Londrina, 2008 e Pato Branco, 2009 – PR) ou da variabilidade genética (amostras provenientes de uma população de 14 genótipos). Grunvald

(2012), utilizou amostras de sementes com desuniformidade morfológica, provenientes de 88 híbridos e 116 linhagens obtidas em diversas localidades da região centro-sul do país.

Para avaliar a precisão da equação de calibração, além do valor do SEP, foram comparados os valores de teor de óleo obtidos pelo método químico padrão com os valores obtidos por meio da espectroscopia de NIR. Para isto, análises foram realizadas em amostras provenientes de um ensaio com delineamento em blocos completos casualizados. Com base em análises de variância não foram observadas diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os dois métodos e nem na interação métodos x híbridos (Tabela 3), revelando a similaridade entre os métodos na comparação de médias do teor de óleo dos híbridos.

Tabela 3 - Análise de variância do teor de óleo de híbridos de canola avaliados pela espectroscopia de NIR e pelo método padrão químico.

FV	GL	QM
Blocos (B) / Ambientes (A)	4	20,84
Genótipos (G)	9	49,13*
A	1	313,63**
G x A	9	16,69**
Erro (a)	36	19,48
Métodos (M)	1	1,32 ^{ns}
M x A	1	1,77 *
M x G	9	0,73 ^{ns}
M x G x A	9	0,73 ^{ns}
Erro (b)	40	0,42
Média Geral	40,00	-
C.V. (%) ^{1/}	11,03	-
C.V. (%) ^{2/}	1,62	-

*, **: significativo em nível de 5% e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F; ns não significativo; 1/ coeficiente de variação referente à parcela; 2/ coeficiente de variação referente à subparcela.

Fonte: Autora

Neste estudo, os genótipos utilizados para avaliar a precisão da equação de calibração foram distintos aos utilizados para a calibração da curva. Além disso, as amostras foram obtidas em ambientes distintos, sendo as de calibração no Estado do Paraná e as de validação no Estado do Rio Grande do Sul. Mesmo assim, a análise por espectroscopia de NIR foi similar ao método químico

padrão. Esta comparação e os valores de R^2 , SEC e SEP possibilitaram inferir que a avaliação de sementes por meio da análise de espectroscopia de NIR foi adequada para diferenciar teores de óleo de genótipos de canola cultivados na região Sul do Brasil, região esta de expansão da cultura (CONAB, 2012).

5 CONCLUSÃO

1. É possível estabelecer uma equação de calibração por espectroscopia de reflectância no infravermelho próximo para avaliar teor de óleo em sementes de genótipos de canola cultivados na região Sul do Brasil.

2. O método da espectroscopia de reflectância no infravermelho próximo é adequado para a avaliação do teor de óleo em sementes de genótipos de canola cultivados na região Sul do Brasil.

REFERÊNCIAS

AUKEMA, H; CAMPBELL, I. Oil nutrition and utilization. In: DAUN, J.K.; ESKIN, M. N. A; HICKLING, D. **Canola: chemistry, production, processing, and utilization**. Urbana: AOCS Press, 2011. p. 245-280.

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. **Official methods and recommended practices of the AOCS**. Illinois, AOCS, 2009. Method BC 3-49.

BARBOSA, L. C. A. **Espectroscopia no infravermelho na caracterização de compostos orgânicos**. 1. ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2008. 189 p.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. 25 anos de quimiometria no Brasil. **Química nova**, v. 29, n. 6, p. 1401-1406, 2006.

BARROS NETO, B.; PIMENTEL, M. F.; ARAÚJO, M. C. U., Recomendação para calibração em química analítica – Parte I. Fundamentos e calibração com um componente (calibração univariada). **Química nova**, v. 25, n. 5, p. 856-865, 2002.

BARTHET, V. J.; DAUN, J. K. Seed morphology, composition, and quality. In: DAUN, J.K.; ESKIN, M. N. A; HICKLING, D. **Canola: chemistry, production, processing, and utilization**. Urbana: AOCS Press, 2011. p. 119-162.

BATTEN, G. D. Plant analysis using near infrared reflectance spectroscopy: the potential and the limitations. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Melbourne, v. 38, n. 7, p. 697-706, Dec.1998.

BEEBE, K. R.; PELL, R. J.; SEASHOLTZ, M. B. **Chemometrics: a practical guide**. New York: John Wiley & Sons, 1998. 360 p.

BLANCO, M.; VILLARROYA, I. NIR spectroscopy: a rapid-response analytical tool. **Trends in Analytical Chemistry**, Barcelona, v. 21, n. 4, p. 240-250, Apr. 2002.

CAMPBELL, M. K; FARRELL, S. O. **Bioquímica**. 5. ed. São Paulo: Thompson Learning, 2007. V. 1, 263 p.

CANOLA COUNCIL OF CANADÁ. **The history of canola**. Disponível em: <<http://www.canolacouncil.org/oil-and-meal/what-is-canola/the-history-of-canola/>>. Acesso em: 20 out. 2012.

CASSÉUS, I. Canola: a canadian success story. **Statistics Canada Catalogue**, Ottawa, n. 96-325-X, 2009. Disponível em: <<http://www.statcan.gc.ca/pub/96-325-x/2007000/article/10778-eng.htm>> Acesso em: 18 jul.2012.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira**. Grãos: safra 2011/2012. Décimo levantamento, julho/2012. Brasília, DF, 2012. 29 p. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_07_05_08_41_20_boletim_graos_-_10julho_2012.pdf>. Acesso em: 25 jul. 2012.

COSTA, A. G. V.; BRESSAN, J.; SABARENSE C. M. Ácidos graxos *trans*: Alimentos e efeitos na saúde. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion – ALAN**, Caracas, v. 56, n. 1, p. 12-21, mar. 2006. Disponível em: <http://www.alanrevista.org/ediciones/2006-1/acidos_graxos_trans.asp>. Acesso em: 12 fev. 2013.

CRUZ, C. D. **Programa Genes**: Versão Windows; aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: UFV, 2001. 648 p. Disponível em: <<http://www.ufv.br/dbg/genes/genes.htm>> Acesso em: 19 jun. 2012.

DAUN, J. K. Origin, distribution, and production. In: DAUN, J.K.; ESKIN, M. N. A; HICKLING, D. **Canola**: chemistry, production, processing, and utilization. Urbana: AOCS Press, 2011. p. 1-27.

DAUN, J. K.; CLEAN, K. M.; WILLIAMS, P. Comparison of three whole seed near infrared analyzers for measuring quality components of canola seed. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Urbana, v. 71, n. 10, p. 1063 -1068, Oct. 1994.

DAVIS, T. The history of near infrared spectroscopic analysis: Past, presente and future – “From sleeping technique to the morning star of spectroscopy”, **Analisis**, Les Ulis, v. 26, n.4, p. 17-19, May. 1998. Disponível em: <<http://analisis.edpsciences.org>>. Acesso em 12 dez. 2012.

DERRICK, M. R; STULIK, D.; LANDRY, J.M. **Infrared Spectroscopy in conservation**: Scientific tools for conservation. Los Angeles: The Getty Conversation Institute, 1999. 248 p.

ESTADOS UNIDOS. Department of Agriculture. Foreign Agricultural Service. **Oilseeds**: world market and trade. Washington: USDA, Feb. 2013. 33 p. (USDA. Circular series, FOP 02-13). Disponível em: <<http://usda01.library.cornell.edu/usda/fas/oilseed-trade//2010s/2013/oilseed-trade-02-08-2013.pdf>>. Acesso em: 08 jan. 2013.

ESTADOS UNIDOS. Department of Agriculture. Foreign Agricultural Service. **World agricultural production**. Washington: USDA, May. 2012. 26 p. (USDA. Circular series, WAP 05-12). Disponível em: <www.fas.usda.gov/wap/current/>. Acesso em: 08 jan. 2013.

FASSIO, O.; COZZOLINO, D. Non-destructive prediction of chemical composition in sunflower seeds by near infrared spectroscopy. **Industrial Crops and Products-Elsevier**, Amsterdam, v. 20, n.3, p. 321-329, 2004.

FERREIRA, M. M. C. et al. Quimiometria I: Calibração Multivariada, um tutorial. **Química Nova**, São Paulo, v. 22, n. 5, p. 724-73, jan. 1999.

GAZZONI, D. L. et al. Balanço energético da cultura da canola para a produção de biodiesel. **Revista Espaço Energia**, n. 11, p. 24-28, 2009. Disponível em: <<http://www.espacoenergia.com.br/edicoes/11/EE011-04.pdf>>. Acesso em: 21 jun. 2012.

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

GOODARZI, M. et al. Direct orthogonal signal correction-partial least squares for simultaneous spectrophotometric determination of sulfamethoxazole and trimethoprim in pharmaceutical formulation and synthetic samples. **Journal of the Chilean Chemical Society**, Santiago, v. 54, n. 3, p. 309-313, June 2009.

GREENWOOD, C.F. et al. **An investigation of the stability of nirs calibrations for the analysis of oil content in whole seed canola**. Disponível em: <<http://www.regional.org.au/au/gcirc/1/572b.htm>>. Acesso em: 08 fev. 2013. (10 th International Rapeseed Congress. 1999)

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.

GRUNVALD, A. K. **Influência da temperatura na composição dos ácidos graxos e caracterização da qualidade e do teor de óleo de genótipos de girassol por espectroscopia de NIR**. 2012. 74f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2012.

HAIR, J. F. et al. **Análise multivariada de dados**. 5. ed, Porto Alegre: Bookman, 1998. 593 p.

HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. **Princípios de análise instrumental**. 6.ed, Porto Alegre: Bookman, 2009. 1056 p.

HOM, N. H.; BECKER, H. C.; MÖLLERS, C. Non-destructive analysis of rapeseed quality by nirs of small seed samples and single seeds. **Euphytica**, Wageningen, v. 157, n.1, p. 27-34, Jan. 2007.

HOSMER, D. P.; LEMESHOW, S. **Applied logistic regression**. 2. ed, Hoboken: John Wiley & Sons, 2000, 392 p.

HOURANT, P. et al. Oil and fat classification by selected bands of near – infrared spectroscopy. **Applied Spectroscopy**, Serville, v. 54, n. 8, p. 1168 -1174, Apr. 2000.

KONZEN, P. H. A. et al. Otimização de métodos de controle de qualidade de fármacos usando algoritmo genético e busca tabu. **Pesquisa Operacional**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 1, p. 189-207. Jan/abr, 2003.

LIMA, K. M. G. et al. Sensores ópticos com detecção no infravermelho próximo e médio. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 6, p. 1635-1643, fev. 2009.

MANDARINO, J. M. G; ROESSING, A. C.; BENASSI, V. T. **Óleos: Alimentos funcionais**. Londrina: Embrapa Soja, 2005. 9 p.

MORETTO, E.; FETT, R. **Tecnologia de óleos e gorduras vegetais na indústria de alimentos**. São Paulo: Varela, 1998. 150 p.

MORGANO, M. A. et al. Determinação de proteína em café cru por espectroscopia NIR e regressão PLS. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 1, p. 25-31, mar. 2005.

NELSON, D. L.; COX, M. M. lipídios. In:_____. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011. p. 343-370.

OLIVEIRA, L. F. C. Espectroscopia molecular. **Química Nova na Escola**, n. 4, p. 24-30, maio. 2001. Disponível em :<
<http://qnesc.s bq.org.br/online/cadernos/04/espect.pdf> >. Acesso em: 02 jan 2013.

PANFORF, J. A.; MAN, J. M. Determination of oil content of seeds by NIR: Influence of fatty acid composition on wavelength selection. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Urbana, v. 67, n. 8, p. 473- 482, Aug. 1990.

PARREIRA, T. F. et al. Quantitative determination of epoxidized soybean oil using near-infrared spectroscopy and multivariate calibration. **Applied Spectroscopy**, Baltimore, v. 56, n. 12, Aug. 2002.

PASQUINI, C. Near infrared spectroscopy: Fundamentals, practical aspects and analytical applications. **Sociedade Brasileira de Química**, v. 14, n. 2, p. 198-219, Apr. 2003.

PIMENTEL, M. F.; GALVÃO, R. K. H.; ARAÚJO, M. C. U. Recomendações para calibração em química analítica - Parte 2. Calibração Multianalito. **Química Nova**, Campinas, v. 31, n. 2, p. 462-467, fev. 2008.

RIBEIRO, A. P. B. et al. Interesterificação química: Alternativa para obtenção de gorduras zero trans. **Química nova**, v. 30, n. 5, p. 1295-1300, maio. 2007.

SATO, T. et al. Nondestructive estimation of fatty acid composition in seeds of *Brassica napus* L. by near-infrared spectroscopy. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Urbana, v. 75, n. 12, July. 1998.

SATO, T. New estimation method for fatty acid composition in oil using near infrared spectroscopy. **Bioscience, Biotechnology na Biochemistry**, v.66, n. 12, p. 2543-2548, Aug. 2002. Disponível em: <https://www.jstage.jst.go.jp/article/bbb/66/12/66_12_2543/_article >. Acesso em: 20 nov. 2012.

SIEMENS, B. J ; DAUN, J. K. Determination of the fatty acid composition of canola, flax, and solin by near infrared spectroscopy. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Urbana, v. 82, n. 3, Fev. 2005.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. 836 p.

SOMOZA, M. Morse-potencial. **Wikipedia**, Mar. 2006. Disponível em:< <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Morse-potential.png#filehistory>>. Acesso em: 12 fev. 2013.

SPIEGELMAN, C. H. et al. Theoretical Justification of Wavelength Selection in PLS Calibration: development of a New Algorithm. **Analytical Chemistry**, Texas, v. 70, n. 1, p. 35-44, Jan. 1998.

STUART, B. **Biological applications of infrared spectroscopy**. Chichester: John Wiley & Sons, ltda, 1997. 212 p.

TKACHUK, R. Oil and protein analysis of whole rapeseed kernels by near infrared reflectance spectroscopy. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Urbana, v. 58, n. 1, p. 819-822, Aug. 1981.

TOMM, G. O. **Indicativos tecnológicos para a produção de canola no Rio Grande do Sul**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2007. 68 p. (Embrapa Trigo. Sistema de produção, 4).

TOMM, G.O. et al. **Panorama atual e indicações para aumento de eficiência da produção de canola no Brasil**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2010. 82 p. (Embrapa Trigo. Documentos, 95).

VELASCO, L.; BECKER, H. C. Estimating the fatty acid composition of the oil in intact-seed rapeseed (*Brassica napus* L.) by near-infrared reflectance spectroscopy. **Euphytica**, Wageningen, v. 101, p. 221-230, 1998.

VELASCO, L.; GOFFMAN, F. D.; BECKER, C. H. Development of calibration equations to oil content and fatty acid composition in brassicaceae germplasm by near-infrared reflectance spectroscopy. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Urbana, v. 76, n. 1, p. 25-30, 1999.

VOET, D.; VOET, J. G. **Bioquímica**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 1616 p.

WANG, D.; RAM, M. S.; DOWELL, F. E. Classification of damaged soybean seeds using near-infrared spectroscopy. **American Society of Agricultural Engineers**, Manhattam, v. 45, n. 6, p. 1943-1948, Oct. 2002.

WESTAD, F.; SCHMIDT, A.; KERMIT, M. Incorporating chemical band – assignment in near infrared spectroscopy regression models, **Journal of near infrared spectroscopy**, Oslo, n. 16, p. 265-273, July. 2008.

ZENEBON, O.; PACUET, N. S.; TIGLEA, P. (Coord.) Procedimentos e determinações gerais. In:_____. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4. ed. 1. ed. digital. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. p. 83-158.

Disponível em:

<http://www.ial.sp.gov.br/index.php?option=%20com_remository&Itemid=0&func=select&orderby=1>. Acesso em: 20 jun. 2012.