



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO TECNOLÓGICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

FABIELLE NEGRAO FERREIRA

**DISCRIMINAÇÃO DE ESPÉCIES DE PEIXES DA COSTA AMAZÔNICA E
PREDIÇÃO DA COMPOSIÇÃO CENTESIMAL USANDO UM
ESPECTROFOTÔMETRO NIR PORTÁTIL**

Belém-Pará
2014



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO TECNOLÓGICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

FABIELLE NEGRAO FERREIRA

**DISCRIMINAÇÃO DE ESPÉCIES DE PEIXES DA COSTA AMAZÔNICA E
PREDIÇÃO DA COMPOSIÇÃO CENTESIMAL USANDO UM
ESPECTROFOTÔMETRO NIR PORTÁTIL**

Dissertação IV apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Pará,
como requisito à obtenção do grau de Mestre em Ciência e
Tecnologia de Alimentos.

ORIENTADOR. Prof. Dr. Jesus Nazareno Silva de Souza
CO-ORIENTADOR. Prof. Dr. Evaldo Martins da Silva

Belém-Pará
2014

FABIELLE NEGRÃO FERREIRA

**DISCRIMINAÇÃO DE ESPÉCIES DE PEIXES DA COSTA AMAZÔNICA E
PREDIÇÃO DA COMPOSIÇÃO CENTESIMAL USANDO UM
ESPECTROFOTÔMETRO NIR PORTÁTIL**

Dissertação IV apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Pará,
como requisito à obtenção do grau de Mestre em Ciência e
Tecnologia de Alimentos.

Avaliada em. ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Jesus Nazareno Silva de Souza
(PPGCTA/ITEC/UFPA – orientador)

Prof. Dr. Evaldo Martins da Silva
(PPGBA/IECOS/UFPA – co-orientador)

Prof^a. Dra. Lúcia de Fátima Henriques Lourenço
(PPGCTA/ITEC/UFPA - membro)

Prof. Dr. Heronildes Adonias Dantas Filho
(PPGQ/ICEN/UFPA – membro)

Belém-Pará
2014

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus criador de tudo.

Dedico especial agradecimento ao meu orientador Dr. JESUS SOUZA, por me proporcionar a honra de ser sua orientanda, pela sua confiança, paciência, gentileza e humildade.

Ao idealizador deste trabalho, meu co-orientador Dr. EVALDO SILVA, que com sabedoria soube dirigir-me os passos e os pensamentos para a conclusão deste projeto.

Ao meu colega, amigo e eterno professor, que me acompanha desde a graduação, Msc. DARLY POMPEU, pela sua indescritível e indispensável colaboração, por receber-me e ensinar-me sempre, com muita simpatia.

Ao Dr. VINCENT BAETEN, pela sua humildade e sabedoria, por ter guiado os primeiros passos que foram fundamentais aos demais passos necessários para conclusão deste projeto.

À professora Dr^a. LÚCIA LOUTENÇO, Coordenadora da Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos e Coordenadora do Laboratório de Pescado, por ter cedido às dependências do laboratório para realização de muitas análises e também por ter aceitado participar da minha banca examinadora colaborando mais uma vez com o progresso da pesquisa.

Ao prof. Dr. HERONILDES DANTAS por ter aceitado participar da minha banca examinadora e ter colaborado através de suas sugestões durante correção deste trabalho.

Aos coordenadores, técnicos e bolsistas dos laboratórios que realizei minhas análises: LAPESCA, CVACBA, LAOS e Laboratório de análises físico-químicas.

A todos aqueles que de alguma forma doaram um pouco de si para que a conclusão deste trabalho se tornasse possível: as pessoas que ajudaram nas minhas análises (MILENA PASSOS, CLEIDIANE ARAÚJO, LUANA CADETE), aos que tiveram todo o cuidado com as minhas amostras (LUÃ OLIVEIRA, PAULA MOIA, RAFAELA CRISTINA), e ao meu grupo de estudos (FRANCÍLIA CAMPOS, DEUSA COSTA).

Aos meus pais, LUIZ e SOCORRO, meus sogros, MARIA OLIVEIRA E WANDERLEY, meus irmãos e a toda minha família que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

Ao meu marido, WANDERLEY OLIVEIRA DE LIMA, que eu amo, por acrescentar razão e beleza aos meus dias.

A minha amiga ELENIR ALMEIDA, pelo seu apoio, pelas nossas longas conversas e seus sábios conselhos.

Aos meus grandes amigos que me inspiraram e me incentivaram ao ingresso no mestrado e comemoraram junto a mim, mais esta vitória (MARLEY SILVA, ROGÉRIO MALHEIROS, ALEXANDRE NÚNES, ANDRÉIA PINTO, SILVANA ALMEIDA, MARCELO CARDOSO).

A UFPA pelo ensino público de qualidade e a CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

E por fim, a MIM, que me dediquei e agarrei com todas as forças mais esta oportunidade de crescimento profissional e pessoal.

RESUMO

A espectroscopia vibracional no infravermelho próximo (NIR) tem muitas aplicações na indústria, particularmente no controle da qualidade, discriminação e determinação da composição química em diversos alimentos, devido à rapidez e facilidade de aplicações em análises de rotina em relação aos métodos físicos e químicos tradicionais. Este trabalho tem como objetivo utilizar esta técnica para discriminar espécies de peixes oriundos da costa amazônica (*Genyatremus luteus*, *Lutjanus purpureus*, *Macrodon ancylodon*, *Cynoscion acoupa*, *Micropogonias furnieri*) e prever componentes majoritários (teor de água, lipídios e proteínas). Foi utilizado um espectrômetro portátil de baixa resolução (1600-2400 nm) para obtenção de medidas espectrais em amostras (filés) intactas, trituradas e liofilizadas. Os espectros foram pré-processados através de derivadas utilizando-se o algoritmo de Savitzky-Golay para suavização de ruídos espectrais, tanto para o emprego dos modelos de predição como para os de discriminação. Os modelos de PCA e SIMCA foram aplicados para a discriminação de espécies, enquanto que PCR e PLS foram utilizados na predição dos componentes. Utilizando PCA observou-se a formação de grupos referentes às espécies de *G. luteus* e *L. purpureus* em amostras intactas e liofilizadas, e quando se aplicou o SIMCA, observou-se a formação de grupos referente às cinco espécies, confirmados através da distancia entre os grupos na faixa de 4,16 a 13,31 e 2,90 a 57,05 para amostras intactas e liofilizadas, respectivamente. O modelo de regressão PLS apresentou uma pequena variação positiva para os valores r^2 e R^2 , sendo que as amostras liofilizadas apresentaram melhores resultados para os três parâmetros estudados: umidade (r^2 : 0,58, RMSEP_{cv}: 1,11 e RDP: 1,40), lipídios (r^2 : 0,96, RMSEP_{cv}: 1,09 e RDP: 4,82), e proteína bruta (r^2 : 0,86, RMSEP_{cv}: 1,96 e RDP: 2,60). Foi obtida uma boa correlação entre os dados obtidos por métodos AOAC e aqueles preditos pela regressão PLS.

Palavras chave: Peixes amazônicos. NIR. PCA. SIMCA. PCR. PLS.

ABSTRACT

Vibrational spectroscopy in the near infrared (NIR) has many applications in industry, particularly in quality control, discrimination and determination of the chemical composition of different foods because of the speed and ease of application in routine analysis when compared to traditional physical and chemical methods. This work aims to use this technique to discriminate five fish species from the Amazonian coast (*Genyatremus luteus* , *Lutjanus purpureus* , *Macrodon ancylodon* , *Cynoscion acoupa*, *Micropogonias furnieri*) and predict major components (water content, lipids and proteins). A portable low-resolution spectrometer (1600-2400 nm) was used for obtaining spectral measures of fish samples (intact, crushed and lyophilized muscle tissue). The spectra were pre-processed by means of derivatives using the Savitzky-Golay algorithm for smoothing of spectral noises, when constructing both prediction and discrimination models. The PCA and SIMCA models were applied for species discrimination, while PCR and PLS were used in the prediction of the major components. Using PCA, it was observed the formation of well-defined groups of the species *G. luteus* and *L. purpureus* in intact and lyophilized samples. With SIMCA, it was observed the formation of groups of the five species, which were confirmed by the distance between groups in the range from 4.16 to 13.31 and 2.90 to 57.05 for intact and lyophilized samples, respectively. The PLS regression model showed a small positive variation values for r^2 and R^2 , and the lyophilized samples showed better results for the three studied parameters: water content (r^2 : 0.58 , RMSEPcv: 1.11 and RDP: 1.40), lipids (r^2 : 0.96 , RMSEPcv : RDP 1.09 and 4.82), and crude protein (r^2 : 0.86 , RMSEPcv : RDP and 1.96 : 2.60). A good correlation between proximate composition data and those predicted by PLS regression was obtained.

Keywords : Amazonian fish . NIR . PCA . SIMCA . PCR . PLS .

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Vibrações de deformações axiais e angulares em uma molécula de água. (+ indica movimento para fora da página e - indica movimento para dentro da página.).....	18
Figura 2 - Representação sistemática de modelo de energia potencial harmônico (A) e anarmônico (B) de uma molécula diatômica. d_e =distancia de equilíbrio (U=mínimo).....	19
Figura 3 - Espectro eletromagnético.	20
Figura 4 - Peixe Pedra (<i>Genyatremus luteus</i>)	26
Figura 5 - Pargo (<i>Lutjanus purpureus</i>)	27
Figura 6 - Pescada gó (<i>Macrodon ancylodon</i>).....	28
Figura 7 - Pescada amarela (<i>Cynoscion acoupa</i>)	28
Figura 8 - Corvina (<i>Micropogonias furnieri</i>)	29
Figura 9.1 – Gráfico da primeira derivada (b) sobre o espectro bruto (a) utilizando filtro de Savitzky-Golay (5,5,11,2).	33
Figura 9.2 – Gráfico da segunda derivada (b) aplicado sobre o espectro bruto (a) utilizando filtro de Savitzky-Golay (5,5,11,2).....	34
Figura 10 – Gráfico do pré-tratamento com MSC (b) sobre o espectro bruto (a).....	35
Figura 11 – Gráfico do SNV (b) sobre o espectro bruto (a) utilizando filtro de Savitzky-Golay.....	36
Figura 12 - Fluxograma dos métodos de reconhecimento de padrões e classificação que serão aplicados.	38
Figura 13 - Espectrômetro portátil utilizado nas análises espectroscópicas.	46
Figura 14 - Fluxograma de etapas de preparação das amostras e análises por espectroscopia no infravermelho próximo (NIR)	47

- Figura 15 - Delimitação de pontos de coleta de espectros nos filés frescos intactos.48
- Figura 16 - Média dos espectros brutos obtidos de *Cynoscion acoupa* utilizando policloreto de polivinila transparente, placa de quartzo (de 2 mm de espessura), placas de vidro (de 1 mm e 2 mm de espessura) como material de revestimento.50
- Figura 17 - MSC seguido de segunda derivada utilizando o filtro de Savitzky-Golay (5, 5, 11, 2) aplicados sobre a média dos espectros brutos de *Cynoscion acoupa* utilizando policloreto de polivinila transparente, placa de quartzo (de 2 mm de espessura), placas de vidro (de 1 mm e 2 mm de espessura) como material de revestimento.....51
- Figura 18 - *Scores* dos componentes principais para PC1 e PC3 utilizando os dados espectrais pré-processados de *Cynoscion acoupa* utilizando policloreto de polivinila transparente, placa de quartzo (de 2 mm de espessura), placas de vidro (de 1 mm e 2 mm de espessura) como material de revestimento.51
- Figura 19 - Média dos espectros brutos coletados sobre a) filés frescos intactos, b) frescos triturados, c) triturados liofilizados, ambos de *M. ancylondon*, *G. luteus*, *C. acoupa*, *L. purpureus* e *M. furnieri* utilizando a faixa de 1600 a 2400nm da região espectral do infravermelho próximo.54
- Figura 20 – Pré-processamentos aplicados através de: a) segunda derivada utilizando o filtro de Savitzky-Golay (5, 5, 11, 2) da média dos espectros brutos obtidos a partir dos filés frescos intactos; b) correção multiplicativa de sinal (MSC), função *common offset* seguida de uma segunda derivada utilizando o filtro Savitzky-Golay (6, 6, 13, 2), da média dos espectros brutos obtidos a partir dos filés frescos triturados; c) Segunda derivada utilizando o filtro de Savitzky-Golay (7, 7, 15, 2) da

média dos espectros brutos obtidos a partir dos filés triturados liofilizados, ambos de <i>M. ancylondon</i> , <i>G. luteus</i> , <i>C. acoupa</i> , <i>L. purpureus</i> e <i>M. furnieri</i>	56
Figura 21 - Scores dos componentes principais para PC1 e PC3 para filés a) frescos intactos, b) frescos triturados e c) triturados liofilizados, ambos de <i>M. ancylondon</i> , <i>G. luteus</i> , <i>C. acoupa</i> , <i>L. purpureus</i> e <i>M. furnieri</i>	58
Figura 22 - Gráfico de <i>Loadings</i> do a) primeiro componente principal PC1, b) segundo componente principal PC2 e c) terceiro componente principal PC3, ambos das amostras de filés frescos intactos, frescos triturados e triturados liofilizados.....	60
Figura 23. Gráfico SIMCA da distância entre <i>G. lúteus versus L. purpureus</i> em um conjunto de modelos PCAs de cinco espécies (<i>M. ancylondon</i> , <i>G. luteus</i> , <i>C. acoupa</i> , <i>L. purpureus</i> e <i>M. furnieri</i>).	63
Figura 24. Gráfico SIMCA da distância entre <i>C. acoupa versus M. furnieri</i> em um conjunto de modelos PCAs de cinco espécies (<i>M. ancylondon</i> , <i>G. luteus</i> , <i>C. acoupa</i> , <i>L. purpureus</i> e <i>M. furnieri</i>).	63
Figura 25 - Dados NIR previstos versus dados de referência do teor de umidade, lipídios e proteína bruta, utilizando o modelo de predição PLS.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Regiões espectrais do infravermelho próximo (NIR) segundo autores	22
Tabela 2 - Distância de modelo para modelo em SIMCA para clusters de filés frescos intactos (acima da diagonal) e triturados liofilizados (abaixo da diagonal).....	62
Tabela 3 - Estimativa dos coeficientes de determinação de calibração (R^2) e de validação cruzada (r^2), erro médio de calibração (RMSEC) e de predição para o conjunto de validação cruzada ($RMSEP_{CV}$) e desvio preditivo residual (RDP) avaliados utilizando os métodos de regressão de mínimos quadrados parciais (PLS) e de componentes principais (PCR) para prever a composição química dos filés sob três condições: filés frescos intactos, filés triturados e liofilizados.	66
Tabela 4 - Estimativa dos coeficientes de determinação de calibração (R^2) e de validação cruzada (r^2) avaliados utilizando 14 variáveis para aplicação dos modelos de regressão de mínimos quadrados parciais (PLS) e de componentes principais (PCR), regressão linear múltipla (MLR) para prever a composição química de filés triturados liofilizados.	69
Tabela 5 - Composição química obtida pelo método AOAC e por predição NIR de 50 peixes de cinco espécies (<i>G. luteus</i> , <i>L. purpureus</i> , <i>M. ancylodon</i> , <i>C. acoupa</i> e <i>M. furnieri</i>) oriundos da costa Amazônica.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DP	Desvio padrão
FIR	Infravermelho distante
MIR	Infravermelho médio
MLR	Regressão linear múltipla
MSC	Correção de espalhamento multiplicativo de luz
NIR	Infravermelho próximo
PC	Componente principal
PCA	Análise por componentes principais
PCR	Regressão de Componentes Principais
PLS	Regressão por mínimos quadrados parciais
R^2	Coefficiente de determinação de calibração
r^2	Coefficiente de determinação de validação cruzada
RDP	Desvio preditivo residual
RMSEC	Raiz quadrada do erro médio quadrático de calibração
$RMSEP_{cv}$	Raiz quadrada do erro médio quadrático de predição para o conjunto de validação cruzada
SIMCA	Modelagem independente e flexível por analogia de classes
SNV	Variação normal padrão
UV-VIS	Ultravioleta e Visível

SUMÁRIO

RESUMO.....	VI
LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE TABELAS	XI
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	XII
1 INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1. ESPECTROSCOPIA	17
2.1.1 Espectroscopia vibracional.....	17
2.1.1.1 Vibrações moleculares	18
2.1.2 Espectroscopia de absorção no infravermelho.....	20
2.1.2.1 Radiação infravermelha.....	20
2.1.3 Espectroscopia de absorção no infravermelho próximo (NIR)	22
2.2 ESPÉCIES DE PEIXES ESCOLHIDAS PARA AVALIAÇÃO POR ESPECTROSCOPIA NIR.....	26
2.2.1 <i>Genyotremus luteus</i> (BLOCH, 1795).....	26
2.2.2 <i>Lutjanus purpureus</i> (POEY, 1876)	27
2.2.3 <i>Macrodon ancylodon</i> (BLOCH & SCHNEIDER, 1801).....	28
2.2.4 <i>Cynoscion acoupa</i> (LACEPÉDE, 1802).....	28
2.2.5 <i>Micropogonias furnieri</i> (DESMAREST, 1823).....	29
2.3 APLICAÇÕES DA ESPECTROSCOPIA NIR EM PESCADOS	30
2.4 TRATAMENTO QUIMIOMÉTRICO DE SINAIS ESPECTRAIS	31
2.4.1 Análise multivariada a partir de dados espectroscópicos	31
2.4.1.1 Pré-processamento dos sinais.	31
2.4.1.1.1 Derivadas	32
2.4.1.1.2 Correção de espalhamento multiplicativo de luz	34
2.4.1.1.3 Variação normal padrão.....	35
2.4.1.2 Métodos de Reconhecimento de Padrões e Classificação.....	37
2.4.1.2.1 Análise dos componentes principais	38
2.4.1.2.2 Regressão linear múltipla.....	39

2.4.1.2.3 Regressão por Componentes Principais	40
2.4.1.2.4 Regressão por Mínimos Quadrados Parciais	42
2.4.1.2.5 Modelagem Independente Flexível por Analogia de Classes.....	43
3 MATERIAL E MÉTODOS	45
3.1. OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS.....	45
3.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	45
3.3. COLETA DOS ESPECTROS	45
3.4 ENSAIOS PRELIMINARES PARA ESCOLHA DE MATERIAL DE REVESTIMENTO.....	48
3.5 TRATAMENTO QUIMIOMÉTRICO DOS DADOS.....	49
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.1 ENSAIOS PRELIMINARES PARA ESCOLHA DE MATERIAL DE REVESTIMENTO.....	50
4.2 TRATAMENTOS DOS DADOS ESPECTRAIS PARA A DISCRIMINAÇÃO DE ESPECIES.....	53
4.3 ANÁLISES DE PCA	57
4.4 ANÁLISES POR SIMCA.....	62
4.5 PREDIÇÃO NIR DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA.....	64
5 CONCLUSÃO	74
REFERÊNCIAS.....	75

1 INTRODUÇÃO

A técnica analítica de espectroscopia vibracional no infravermelho próximo (NIR) tem muitas aplicações na indústria alimentar, particularmente no controle da qualidade das matérias primas, e é comumente utilizada para discriminação e determinação da composição química em diversos alimentos (OSBORNE et al., 1993; BÜNING-PFAUE, 2004; PLA et al., 2007). Sua principal vantagem sobre os métodos físicos e químicos tradicionais é a rapidez e facilidade de aplicações em análises de rotina (BARANSKA et al, 2010).

Os espectros gerados nas análises espectroscópicas fornecem informações sobre as moléculas do material analisado (que contenham grupos C-H, N-H, C=O, S-H ou O-H) e reflete suas características mais significativas através das diferenças de absorção das ligações entre os seus átomos (MILLER, 2001).

Métodos de predição utilizando NIR vêm sendo empregados para quantificação de componentes químicos em peixes, como lipídios, proteínas e teor de umidade (XICCATO et al., 2004; KHODABUX et al., 2007; HUANG et al., 2003; LIN, et al., 2003; VOGT et al., 2002). As análises geralmente são realizadas diretamente no músculo e/ou na amostra liofilizada (XICCATO, et al., 2004; KHODABUX et al., 2007). Modelos de regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) e por componentes principais (PCR) são comumente utilizados para esta finalidade.

Além de análises preditivas, o infravermelho próximo é utilizado para outros fins em análise de pescados, como por exemplo, identificação e discriminação de espécies (O'BRIEN et al, 2013), avaliação da modificação causada pelo congelamento (UDDIN et al, 2005), avaliação da temperatura ideal de aquecimento (UDDIN, 2002) dentre outros. Estas avaliações são possíveis pelo simples tratamento dos dados espectrais utilizando o modelo de análise de componentes principal (*Principal Components Analysis* -PCA) e modelagem independente e flexível por analogia de classes (*Soft Independent Modelling of Class Analogy*-SIMCA) (CAMO, 2011).

OBJETIVOS

Geral

Avaliar a utilização de espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) em uma estreita faixa de comprimento de onda entre 1600 - 2400 nm, empregando um espectrômetro portátil de baixa resolução para discriminação de espécies e predição de umidade, lipídios e proteínas em cinco espécies de peixes oriundas da costa amazônica.

Específicos

- Estudar a possibilidade de discriminar espécies de peixes oriundas da costa amazônica: peixe pedra (*Genyatremus luteus*); pargo (*Lutjanus purpureus*); pescada gó (*Macrodon ancylodon*); pescada amarela (*Cynoscion acoupa*) e corvina (*Micropogonias furnieri*), através da utilização de espectroscopia no infravermelho próximo (NIR);

- Avaliar a utilização da técnica de espectroscopia NIR para predição simultânea de umidade, lipídios e proteínas, através da aplicação modelos baseados em regressão (PCR e PLS).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. ESPECTROSCOPIA

Espectroscopia é um termo geral utilizado para a ciência que estuda a interação dos diferentes tipos de radiação com a matéria (SKOOG et al., 2005). Refere-se à medição da intensidade da radiação absorvida, em função do comprimento de onda (ou frequência), através de dispositivos de medição chamados espectrômetros ou espectrofotômetros (SOLOMONS; FRYHLE, 2009).

A espectroscopia baseia-se no fato de que as moléculas absorvem radiação em quantidades discretas de energia, ocorrendo absorção apenas em determinadas frequências, referentes às características do corpo em estudo. A frequência ou comprimento de onda de uma absorção depende das massas relativas dos átomos, das constantes de força das ligações e da geometria dos átomos (SILVERSTEIN et al., 2006; VOLLHARDT; SCHORE, 2004).

Esta energia absorvida pelas moléculas provoca o “movimento” de elétrons ou de núcleos, um processo chamado de excitação. O movimento também é quantizado e, como as moléculas podem sofrer diferentes tipos de vibrações, cada tipo de movimento ocorre em uma energia diferente (VOLLHARDT; SCHORE, 2004).

Por meio da espectroscopia vibracional é possível reconhecer moléculas através da intensidade da sua frequência de vibração, a qual depende das massas e das forças de interação entre os átomos de uma molécula (ANDO, 2005).

2.1.1 Espectroscopia vibracional

A espectroscopia vibracional investiga transições vibracionais e rotacionais de determinadas moléculas, obtendo informações a respeito da estrutura molecular, a partir dos números de ondas vibracionais ativos nos espectros infravermelhos característicos do composto estudado, bem como da natureza das ligações químicas presentes nas moléculas. As técnicas mais utilizadas são a espectroscopia vibracional no infravermelho e Raman (SALA, 1995; ANDO, 2005), sendo que a mais conhecida e utilizada é a espectroscopia vibracional no infravermelho (ANDO, 2005).

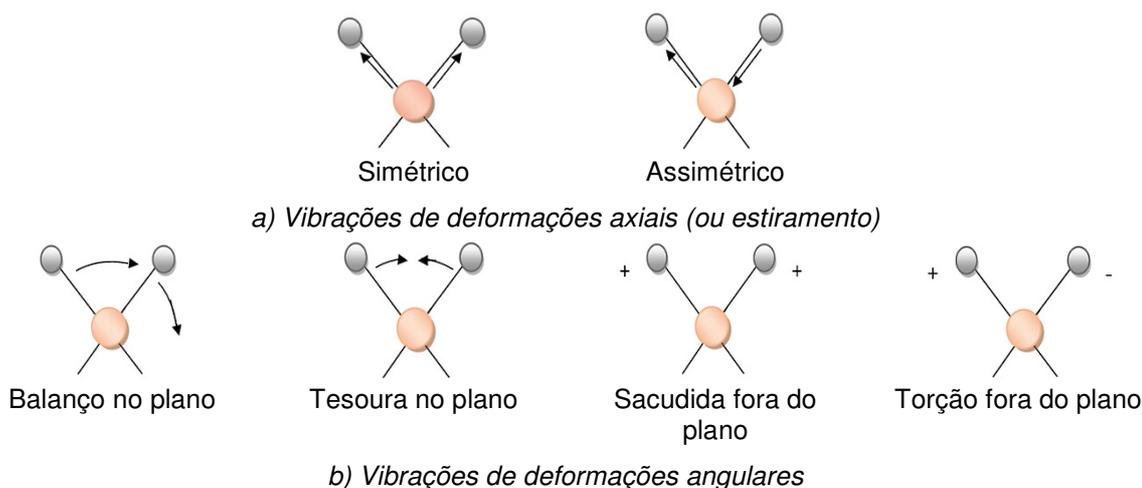
2.1.1.1 Vibrações moleculares

As vibrações moleculares são estudadas a partir da espectroscopia para que se possa, através da característica das vibrações, descobrir as “assinaturas” ou “impressões digitais” que cada substância ou molécula emite quando interage com a luz (SKOOG et al., 2005).

Existe um grande número de vibrações possíveis. As mais comuns são. estiramentos axiais (simétrico e assimétrico), e deformação angular (simétrica no plano -tesoura, assimétrica no plano -balanço, simétrica fora do plano -torção, assimétrica fora do plano -abano) (**Figura 1**) (SILVERSTEIN et al., 2006; DYER, 1969).

Uma vibração de deformação axial é um movimento rítmico ao longo do eixo da ligação que faz com que a distância interatômica aumente e diminua alternadamente. As vibrações de deformação angular correspondem às variações ritmadas de ligações que tem um átomo em comum ou o movimento de um grupo de átomos em relação ao resto da molécula sem que as posições relativas dos átomos do grupo se alterem (SILVERSTEIN et al., 2006; DYER, 1969). Na **Figura 1** pode-se observar uma representação dos modos vibracionais em uma molécula de água (H_2O).

Figura 1 - Vibrações de deformações axiais e angulares em uma molécula de água. (+ indica movimento para fora da página e - indica movimento para dentro da página.).

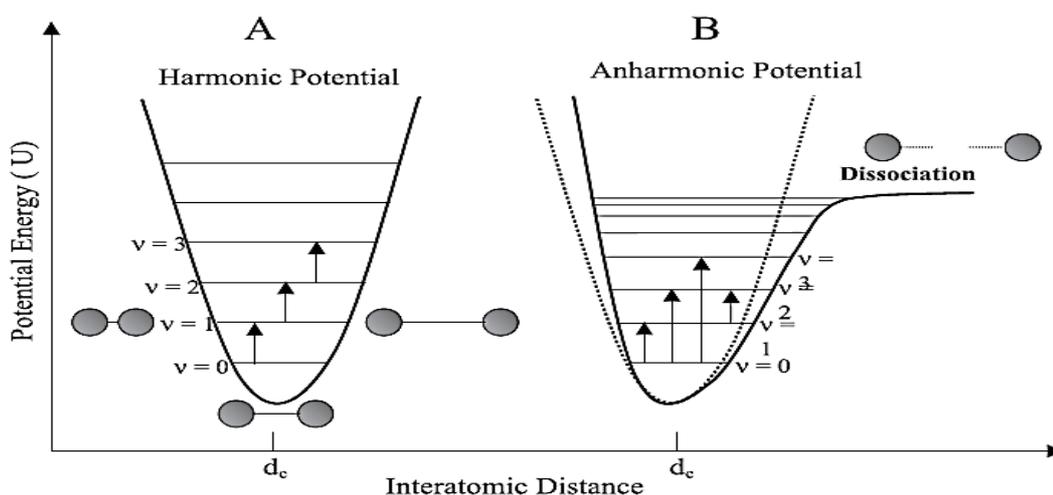


Fonte: Adaptado de SKOOG et al., 2005.

As características de uma vibração de estiramento podem se aproximar às de um modelo mecânico consistindo de duas massas ligadas por uma mola. Uma perturbação de uma das massas ao longo do eixo da mola resulta em uma vibração denominada movimento harmônico simples (SKOOG et al., 2005).

O modelo do oscilador anarmônico é o que melhor representa o comportamento das moléculas reais, pois as moléculas apresentam comportamento harmônico apenas quando a energia potencial é baixa, ou seja, em torno da posição de equilíbrio (NUNES, 2008). O movimento harmônico e anarmônico podem ser representados conforme a **Figura 2**.

Figura 2 - Representação sistemática de modelo de energia potencial harmônico (A) e anarmônico (B) de uma molécula diatômica. d_e =distancia de equilíbrio (U =mínimo).



Fonte: Pasquini, 2003.

De acordo com o modelo do oscilador anarmônico, pode-se observar transições tanto da banda fundamental ($\Delta v = \pm 1$) como também de bandas correspondentes a outras transições ($\Delta v = \pm 2, \pm 3, \pm 4, \dots$), as quais são denominadas de *sobretons* (primeiro, segundo, terceiro sobreton, ..., respectivamente) (NUNES, 2008).

Os sobretons são vibrações múltiplas das transições fundamentais, ou seja, acontecem do nível vibracional fundamental $n = 0$ para os diversos níveis vibracionais $n = 1, 2, 3, 4 \dots$. Os sobretons acontecem principalmente devido ao fenômeno de anarmonicidade mecânica, observado para muitas moléculas que

apresentam diferenças entre as massas dos átomos conectados pela ligação química. Nestes casos, a vibração não pode ser descrita por um oscilador com movimento harmônico (NAES et al., 2002).

Em NIR, as bandas de combinação ocorrem quando dois modos vibracionais são excitados simultaneamente e as duas frequências vibracionais e que se observa em frequências dadas por $n_1v_1 + n_2v_2 + \dots$, onde n são números inteiros e v são as frequências das transições que contribuem para a banda de combinação, as quais se acoplam em uma molécula, originando uma nova frequência de vibração dentro da molécula (NAES et al., 2002).

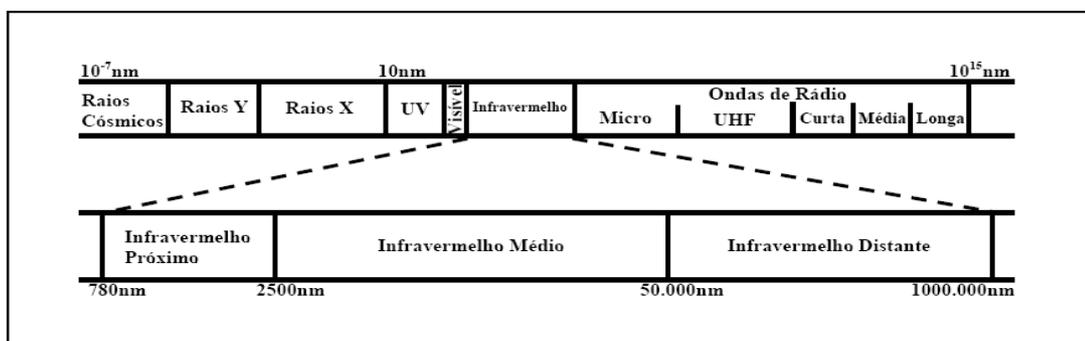
Nesta região do infravermelho próximo são detectadas as vibrações de primeiro, segundo e terceiro sobretons (*overtones*) de bandas fundamentais observadas no infravermelho médio bem como as bandas de combinação. Os compostos são identificados a partir do tipo de vibrações moleculares localizadas em uma faixa de comprimento de onda específica, e são quantificados através do valor de absorção em função do comprimento de onda. Para isto, necessita-se de equipamentos específicos destinados a estes fins (VOLLHARDT; SCHORE, 2004).

2.1.2 espectroscopia de absorção no infravermelho

2.1.2.1 Radiação infravermelha

A radiação infravermelha corresponde aproximadamente à parte do espectro eletromagnético situada entre as regiões do visível e das microondas (**Figura 3**) (SILVERSTEIN et al., 2006; BRUICE, 2006).

Figura 3 - Espectro eletromagnético.



Fonte: KNIGHT, 2009

O espectro infravermelho fornece um rico agregado de bandas de absorção, os quais fornecem um conjunto de informações estruturais sobre a molécula (DYER, 1969).

Uma vez que cada tipo de ligação covalente apresenta uma diferente frequência de vibração natural, então duas moléculas diferentes não deverão apresentar um idêntico comportamento de absorção no infravermelho, ou espectro de infravermelho (SILVERSTEIN et al., 2006).

Porém nem toda molécula absorve a radiação no infravermelho, pois é necessário que ocorra a variação do momento de dipolo da ligação em função do tempo, o qual é determinado pela magnitude da diferença de carga e pela distância entre dois centros de carga. Desta forma, não ocorre variação no momento de dipolo durante a vibração ou rotação de espécies homonucleares, tais como O₂, N₂ ou Cl₂, que impede estas moléculas de absorver radiação no infravermelho (SKOOG et al., 2005).

A molécula pode ser identificada de acordo com sua posição espectral e, utiliza-se tanto o comprimento de onda (nm), como a posição de uma determinada absorção no infravermelho (cm⁻¹). As absorções que ocorrem em comprimentos de onda menores (maior frequência) são as de maior energia. O número de onda é diretamente proporcional à energia absorvida

$$K = \frac{E}{hc} \quad (1)$$

e o comprimento de onda é inversamente proporcional à energia absorvida

$$\lambda = \frac{hc}{E} \quad (2)$$

$$\lambda = \frac{1}{K} \quad (3)$$

Todos os comprimentos de onda do espectro eletromagnético são associados a uma certa quantidade de energia, dada por.

$$E = h\nu = h\frac{c}{\lambda} \quad (4)$$

Onde, K = número de onda, E = energia absorvida, h = constante de Planck, c = velocidade da Luz, λ = comprimento de onda (DYER, 1969).

Para que ocorra a absorção de energia de radiação no infravermelho, é necessário que a molécula tenha a mesma frequência que a vibração da ligação (SILVERSTEIN et al., 2006), pois quando absorvida, a radiação fornece energia suficiente apenas para alterar as vibrações entre os átomos em uma molécula, e durante o movimento rotacional ou vibracional ocorre variação no momento dipolo de algumas espécies moleculares. Assim, a molécula passa para um estado de energia excitado ocorrendo variações na amplitude do movimento vibracional ou rotacional (SILVERSTEIN et al., 2006).

2.1.3 Espectroscopia de absorção no infravermelho próximo (NIR)

As aplicações da espectroscopia de infravermelho ocorrem em três principais categorias do espectro eletromagnético: nas regiões espectrais do infravermelho próximo (NIR), infravermelho médio (MIR) e infravermelho distante (FIR) (HOLLER et al., 2009).

A espectroscopia no infravermelho próximo é um tipo de espectroscopia vibracional situada em uma faixa entre o infravermelho médio (MIR) e Microondas. A **Tabela 1** apresenta maiores informações sobre a faixa da região espectral correspondente a região NIR, as quais são diferentemente delimitadas por alguns autores.

Tabela 1 - Regiões espectrais do infravermelho próximo (NIR) segundo autores

Fonte	Comprimento de onda (nm)
Dyer, 1969	800 a 2500
Pasquini, 2003	750 a 2500
Skoog et al., 2005; Workman, 2012*	780 a 2500
Silverstein et al., 2006; Nielsen, 2010.	700 a 2500
Workman, 2012*	690 a 3000

* Propõem duas faixas de região espectral para NIR.

Não existe um limite específico definindo onde termina uma região e começa outra, é comum encontrar na literatura diferentes valores para cada faixa, entretanto, a IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) define a região NIR sendo de 780 a 2500 nm. Para que a espectroscopia na região do infravermelho próximo possa ser utilizada em análises qualitativas e quantitativas é importante a interpretação e o conhecimento sobre as bandas espectrais nessa região do espectro.

As bandas de absorção na região NIR estão normalmente muito sobrepostas e são de baixa intensidade. A intensidade das bandas de combinação e sobretons dependem do grau de anarmonicidade da ligação química. O átomo de hidrogênio, por ter uma massa menor, vibra com maior amplitude numa vibração de *estiramento*, fazendo com que este movimento se desvie apreciavelmente do modelo do oscilador harmônico. Como consequência, quase todas as bandas de absorção observadas na região do NIR provêm de sobretons das vibrações de estiramento de grupos XH_n (onde $X = C, S, N, O$), ou bandas de combinação destes grupos (NUNES, 2008).

O **Quadro 1** mostra os comprimentos de onda em **nm** aproximados na região do NIR em que ocorrem as absorções de combinações e sobretons dos agrupamentos C-H, N-H, S-H e O-H.

A partir destas informações, é possível identificar as absorções nos espectros medidos em NIR.

Quadro 1 - Comprimentos de onda em nm na faixa do infravermelho próximo (NIR) em compostos orgânicos e sulfurados e seus respectivos compostos relacionados.

Comprimento de onda (nm)	Atribuição	Compostos relacionados
2500	Combinação de estiramento S-H	grupos sulfurados
2200-2460	Combinação de estiramento C-H	aldeídos, alcanos, alcenos, alcinos, compostos aromáticos
2000-2200	Combinação de estiramento N-H	amidas e aminas
	Combinação de estiramento O-H	álcoois (com ligação de hidrogênio, de ácidos carboxílicos, compostos fenólico)
1620-1800	Primeiro sobretom do estiramento C-H	aldeídos, alcanos, alcenos, alcinos, compostos aromáticos
1400-1600	Primeiro sobretom do estiramento N-H	amidas e aminas
	Primeiro sobretom do estiramento O-H	álcoois (com ligação de hidrogênio, de ácidos carboxílicos, compostos fenólico)
1300-1420	Combinação do estiramento C-H	aldeídos, alcanos, alcenos, alcinos, compostos aromáticos
1100-1225	Segundo sobretom do estiramento C-H	aldeídos, alcanos, alcenos, alcinos, compostos aromáticos
1020-1060	Combinação do estiramento S=O	grupos sulfurados
950-1100	Segundo sobretom do estiramento N-H	amidas e aminas
	Segundo sobretom do estiramento O-H	álcoois (com ligação de hidrogênio, de ácidos carboxílicos, compostos fenólico)
850-950	Terceiro sobretom do estiramento C-H	aldeídos, alcanos, alcenos, alcinos, compostos aromáticos
775-850	Terceiro sobretom do estiramento N-H	amidas e aminas

Fonte: STUART, 2204; Workman, 2012 (Adaptado)

Técnicas que utilizam a região espectral do infravermelho próximo são utilizadas principalmente para determinação quantitativa em análises de rotina de certas espécies moleculares e sua utilização vem crescendo por consequência de suas inúmeras vantagens (HOLLER et al., 2009). O **Quadro 2** lista algumas vantagens assim como possíveis desvantagens da utilização de espectroscopia no infravermelho próximo quando comparado aos métodos de referência.

Quadro 2 - Vantagens e desvantagens da utilização de espectroscopia NIR em relação aos métodos de referência.

VANTAGENS	DESVANTAGENS
<ul style="list-style-type: none"> ✓Técnica não destrutiva e não invasiva; ✓Necessita de pouca ou nenhuma manipulação da amostra; ✓Possibilita medidas tanto no estado líquido como sólido; ✓Baixo custo de análise; ✓Permite a determinação de vários analitos da amostra sem a necessidade de um procedimento analítico para cada um deles separadamente; ✓Em muitos campos de aplicação, a exatidão da técnica NIR é comparável a outras técnicas analíticas. 	<ul style="list-style-type: none"> ✓A complexidade do sinal NIR obriga a aplicação de métodos quimiométricos para modelar os dados e permitir a quantificação das propriedades de interesse; ✓A etapa de calibração é geralmente exigente, pois é necessária uma grande quantidade de amostras para assegurar a variabilidade na complexidade da matriz das amostras; ✓Torna-se difícil analisar uma amostra problema que apresente variabilidade (física ou química) não contemplada na etapa de calibração; ✓A técnica é pouco sensível, especialmente em medidas de reflectância difusa, impossibilitando geralmente a determinação de componentes minoritários.

Fonte: NUNES, 2008.

2.2 ESPÉCIES DE PEIXES ESCOLHIDAS PARA AVALIAÇÃO POR ESPECTROSCOPIA NIR

Os peixes selecionados para realização deste trabalho foram: peixe pedra (*Genyatremus luteus*); pargo (*Lutjanus purpureus*); pescada gó (*Macrodon ancylodon*); pescada amarela (*Cynoscion acoupa*) e corvina (*Micropogonias furnieri*). Estas são espécies de hábitos alimentares semelhantes, podendo ser encontradas em regiões de águas costeiras no litoral amazônico, em fundos arenosos ou lamosos (BARLETTA, 1998; CARVALHO-FILHO, 1999).

Estas espécies foram escolhidas por apresentarem grande importância para a indústria pesqueira local, uma vez que estão entre mais comercializadas na região amazônica (TAVARES *et al.*, 2005). Suas características particulares serão comentadas a seguir:

2.2.1 *Genyatremus luteus* (Bloch, 1795)

Figura 4 - Peixe Pedra (*Genyatremus luteus*)



Genyatremus luteus (**Figura 4**) pertence à ordem: Perciformes, família: Haemulidae e gênero: *Genyatremus*, com hábito demersal, conhecido vulgarmente por peixe pedra ou roncador. Os indivíduos medem cerca de 30 cm de comprimento (BARLETTA, 1998; GIARRIZZO & KRUMME, 2007), sendo encontrados na plataforma continental da Guiana Francesa entre 25 a 30 m de profundidade (ARTIGAS *et al.*, 2003) e às vezes, em águas marinhas do Atlântico Ocidental, mais precisamente entre a Colômbia e o Brasil, sob profundidade de até 40 m, porém vivem, principalmente, em águas salobras dos estuários e zonas adjacentes, sobre fundos arenosos ou lamosos (FURTADO-NETO *et al.*, 2005; CERVIGÓN 1966).

Alimenta-se de um amplo espectro de presas, provavelmente de itens mais abundantes no ambiente, como, por exemplo, de organismos bentônicos

(crustáceos, bivalves e equinodermos) com menos de 10 cm de comprimento (WOLFF et al., 2000) e preferencialmente de vegetais (ALMEIDA et al., 2005).

No estado do Pará, compreende uma das espécies dentre as mais capturadas (TAVARES et al., 2005).

2.2.2 *Lutjanus purpureus* (Poey, 1876)

Figura 5 - Pargo (*Lutjanus purpureus*)



Lutjanus purpureus (**Figura 5**), pertence à ordem: Perciformes, família: Lutjanidae e gênero: *Lutjanus*, com hábito demersal, conhecido vulgarmente como, pargo, pargo colorado, *red snapper* ou *Caribbean red snapper*. É encontrado nas regiões costeiras em águas profundas nas proximidades de áreas rochosas, arenosas ou de recifes, principalmente em profundidades entre 30 e 160 metros, em áreas com fundo arenoso ou rochoso (PAIVA, 1997), mas é especialmente comum em 70-120 m (ALLEN, 1985). Espécies da família podem ser ainda encontradas em regiões estuarinas e em águas oceânicas, em profundidades de até 650 metros (MENEZES; FIGUEIREDO, 1980).

Alimentam-se de pequenos peixes, moluscos, caranguejos, camarões e outros crustáceos (CARVALHO-FILHO, 1999).

Esta espécie é distribuída em todo o Caribe, ao sul de Cuba e no Brasil a partir de nordeste até o sul da Bahia (CERVIGÓN 1993; ALLEN, 1985).

Os adultos são normalmente solitários ou encontrados em pequenos grupos, enquanto os juvenis se reúnem em grandes cardumes podendo estes serem encontrados em águas mais rasas (SZPILMAN, 2000). Os maiores indivíduos desta espécie pode atingir um comprimento total de 100 cm, embora a maioria dos peixes adultos são cerca de 65 cm (Allen , 1985).

2.2.3 *Macrodon ancylodon* (Bloch & Schneider, 1801)

Figura 6 - Pescada gó (*Macrodon ancylodon*)



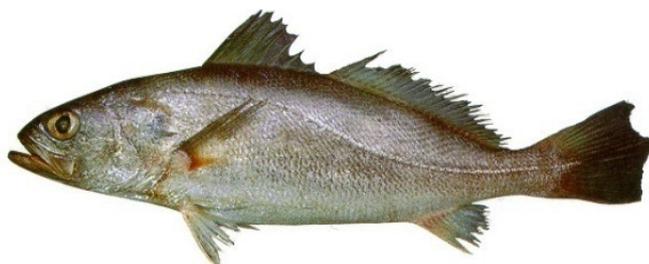
Macrodon ancylodon (**Figura 6**), pertence à ordem: Perciformes, família: Sciaenidae e gênero: *Macrodon*, com hábito demersal, conhecido vulgarmente como pescadinha gó, pescada foguete, pescadinha real, dentre outros nomes. Constitui uma das espécies mais encontradas ao longo da costa brasileira, comum em ambiente com fundo de areia e lama, em profundidades que variam de 25 a 60 m. Sua distribuição é restrita a parte ocidental do oceano Atlântico, ocorrendo da Venezuela até a Argentina (CARVALHO-FILHO, 1999).

Medem cerca de 45 cm de comprimento, possuindo uma coloração prateada com dorso azul-esverdeado e ventre esbranquiçado (CARVALHO-FILHO, 1999).

Estudos concluem que *Macrodon ancylodon* é uma espécie carnívora generalista com variação nas características morfológicas associadas com alimentação possuindo evidências de canibalismo (PIORSKI et al., 2004).

2.2.4 *Cynoscion acoupa* (Lacepède, 1802)

Figura 7 - Pescada amarela (*Cynoscion acoupa*)



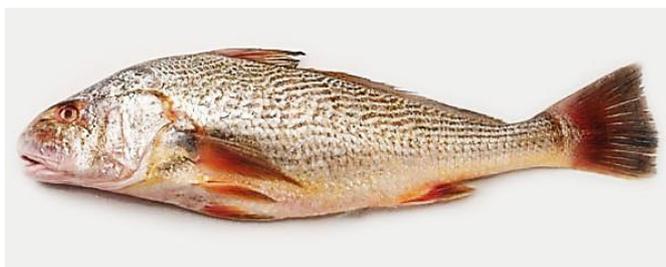
A *Cynoscion acoupa* (**Figura 7**), pertence à ordem: Gadiformes, família: Sciaenidae e gênero: *Cynoscion*, com hábito demersal, é vulgarmente conhecida pelos nomes de pescada amarela, pescada-cascuda, pescada-de-escama, pescada-

dourada, pescada-ticupá, pescada-verdadeira, dentre outras (BARLETTA-BERGAN, 2002; MATOS; LUCENA, 2006).

É uma espécie encontrada em águas costeiras do litoral brasileiro, principalmente em regiões com desembocaduras de grandes rios. Nos manguezais é encontrado em poções profundos ou locais com mais de 20m de profundidade, crescem acima de 20 kg de peso. Alimentam-se de pequenos peixes, até camarões, siris, caranguejos e outros seres (CARVALHO-FILHO, 1999). Chegam a medir até 1,30 m de comprimento (SZPILMAN, 2000).

2.2.5 *Micropogonias furnieri* (Desmarest, 1823).

Figura 8 - Corvina (*Micropogonias furnieri*)



Micropogonias furnieri (**Figura 8**), pertence à ordem: Perciformes, família: Sciaenidae e gênero: *Micropogonias*, com hábito demersal, conhecida vulgarmente como corvina, cascudo, corvina-crioula, corvina-de-linha, corvina-de-rede, corvina-marisqueira, corvineta, cupá, cururuca, guatucupá, marisqueira, murucaia, tacupapirema, dentre outros (SZPILMAN, 2000; PAIVA, 1997).

É uma espécie costeira; vive nos fundos arenosos ou barrentos, de preferência em profundidades até 100m. Os jovens e alguns adultos frequentam os manguezais e estuários, onde se alimentam principalmente de crustáceos, não desprezando os peixes pequenos. Também podem ser encontrados na água doce, formando pequenos cardumes. É uma espécie comercial muito importante e apreciada pelos pescadores amadores (SZPILMAN, 2000).

É uma espécie de peixe comum no sul do continente americano. Tais animais medem cerca de 80 cm de comprimento, possuindo o corpo alongado e comprimido, de tonalidade prateada a marrom. Alimentam-se principalmente de crustáceos, não desprezando os peixes pequenos (SZPILMAN, 2000; PAIVA, 1997).

2.3 APLICAÇÕES DA ESPECTROSCOPIA NIR EM PESCADOS

Análise por NIR tem se apresentado bastante eficiente em análises de rotina em peixes (HUANG et al, 2003;. LIN et al., 2003; VOGT et al., 2002), tornando-se uma ferramenta útil na indústria de beneficiamento de pescados, e à medida que a indústria pesqueira cresce, métodos convencionais utilizados para determinar a composição química do pescado são demorados e onerosos, tornan-se inadequados para recolher dados de rotina (PLA et al., 2007; FERNÁNDEZ-CABAÑAS et al., 2011). Portanto, a avaliação da composição química por análise não destrutiva é requerida para estimativas rápidas, evitando danos no peixe comercial ou produtos de peixe (UDDIN; OKAZAKI, 2010).

Além de análises quantitativas, análise de reconhecimento e classificação de espécies também são realizadas utilizando a técnica de espectroscopia NIR, estas técnicas são realizadas sobre os peixes com pele e sem pele (O'BRIEN et al, 2013), em filés congelados (UDDIN et al, 2005), e termicamente tratados (UDDIN, 2002).

A diversidade de tratamentos analíticos em pescados utilizando NIR é ampla. Para isto as técnicas NIR estão associadas a tratamento de dados multivariados. Estes procedimentos são conceituados como tratamentos quimiométricos, os quais auxiliam na identificação e discriminação dos compostos químicos em questão.

Análises multivariadas através de tratamentos quimiométricos serão mais detalhadas a seguir.

2.4 TRATAMENTO QUIMIOMÉTRICO DE SINAIS ESPECTRAIS

Denomina-se quimiometria, “a ciência relacionada a medidas realizadas em um sistema ou processo químico, obtendo informações sobre o estado do sistema com ajuda de ferramentas matemáticas e estatísticas” (BRERETON, 2009). A quimiometria permite um estudo com várias espécies presentes ao mesmo tempo, não importando diferenças espectrais marcantes entre elas, nem a existência de alta correlação nos dados (FERREIRA et al., 1999).

Métodos espectroscópicos em análise quantitativa estão de forma geral associados ao uso de ferramentas quimiométricas, as quais auxiliam na identificação e quantificação de componentes de interesse. Processos quimiométricos envolvendo calibração multivariada são ideais para o monitoramento e controle de qualidade de produtos, pois proporcionam respostas rápidas e não destrutivas, de grande interesse para a indústria (VARMUZA et al., 2009).

2.4.1 Análise multivariada a partir de dados espectroscópicos

A análise multivariada de dados se refere a todas técnicas estatísticas que simultaneamente analisam múltiplas medidas (variáveis) sobre indivíduos ou objetos em investigação. Essas técnicas são apontadas, atualmente, como a melhor alternativa para a interpretação de dados e para a aquisição do máximo de informação sobre o sistema. A área da química analítica vem utilizando cada vez mais o método de calibração multivariada, principalmente na área de espectroscopia (HAIR, et al. 2009).

2.4.1.1 Pré-processamento dos sinais.

Bandas na região NIRs são relativamente amplas e várias bandas de absorção se sobrepõem significativamente, isso pode dificultar a interpretação do espectro (BARANSKA et al, 2010). Devido à baixa resolução dos espectros NIR, estes necessitam de um pré-tratamento, o qual removerá ruídos e proporcionará resultados mais confiáveis (UDDIN; OKAZAKI, 2010).

Em análises espectroscópicas, os pré-tratamentos são aplicados às variáveis e/ou às amostras para reduzir ou remover os efeitos em dados que não carregam informações relevantes para a modelagem do sistema (SJÖBLOM et al., 1998).

As transformações podem reduzir a complexidade de um modelo (menos fatores necessário) e melhorar a capacidade de interpretação dos dados e modelos. Transformações incluem a aplicação de derivadas aos dados espectrais para reduzir os efeitos e compensar a inclinação da linha de base, acentuando pequenas diferenças espectrais. Correções de espalhamento são frequentemente utilizadas como transformações de espectros de reflectância difusa para reduzir as diferenças, como a dispersão de luz e comprimento do caminho. Estas transformações podem ser realizadas apenas em dados numéricos (SJÖBLOM et al., 1998). Alguns exemplos de pré-tratamentos que podem ser utilizados neste estudo são:

2.4.1.1.1 Derivadas

As derivadas são utilizadas para minimizar possíveis contribuições não desejadas dos sinais, que diminuem a capacidade de previsão dos modelos. A derivada é um dos pré-processamentos mais utilizados (CAMO, 2011, ESBENSEN, 2002). São úteis para eliminar os sinais de base, melhorando a resolução visual dos picos (OTTO, 2007).

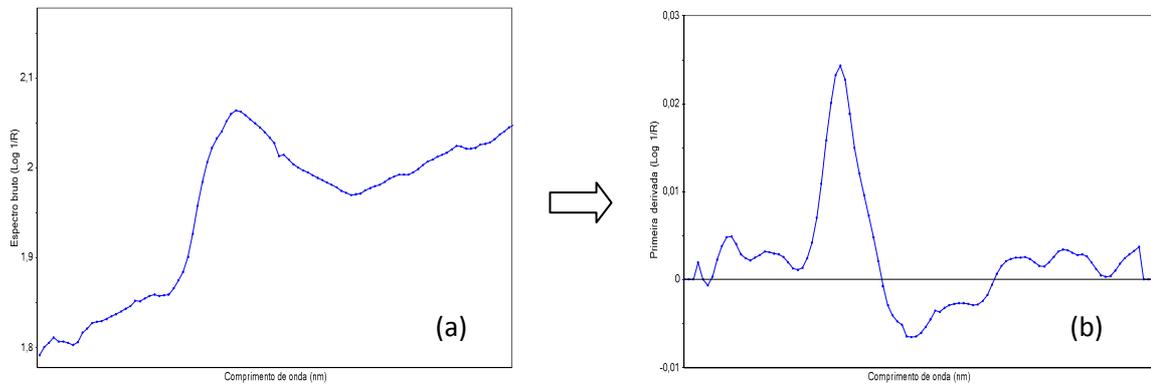
A primeira derivada de um espectro é simplesmente uma medida do declive da curva espectral em cada ponto. A inclinação da curva não é afetada por deslocamentos de linha de base do espectro, e, assim, a primeira derivada é um método muito eficaz para remover deslocamentos de linha de base. No entanto, os picos de espectros brutos geralmente tornam-se pontos de travessia de zero no primeiro espectros derivados, que podem ser difíceis de interpretar (CAMO, 2011).

Por exemplo, a primeira derivada, y'_k , obtida com base na filtragem polinomial quadrática utilizando 5 pontos, por:

$$y'_k = -\frac{2}{10}y_{k-2} - \frac{1}{10}y_{k-1} + \frac{0}{10}y_k + \frac{1}{10}y_{k+1} + \frac{2}{10}y_{k+2} \quad (5)$$

A **Figura 9.1** apresenta graficamente o pré-processamento aplicando a primeira derivada em dados espectrais brutos.

Figura 9.1 – Gráfico da primeira derivada (b) sobre o espectro bruto (a) utilizando filtro de Savitzky-Golay (5,5,11,2).



A numeração (5, 5, 11, 2) indica que se utiliza janela otimizada de 5 pontos para a direita, 5 pontos para a esquerda, com o total de 11 pontos, utilizando-se o polinômio de ordem 2.

A segunda derivada elimina os termos que variam linearmente com a linha de base, normalmente devidos a efeitos de espalhamento. É um método muito eficaz para a remoção do deslocamento da linha de base e inclinação de um espectro, e pode ajudar a aguçar características espectrais. Quando tratados, os picos positivos em espectros brutos se voltam para baixo, dando origem também a picos positivos com lóbulos de cada lado na segunda derivada (CAMO, 2011, OTTO, 2007).

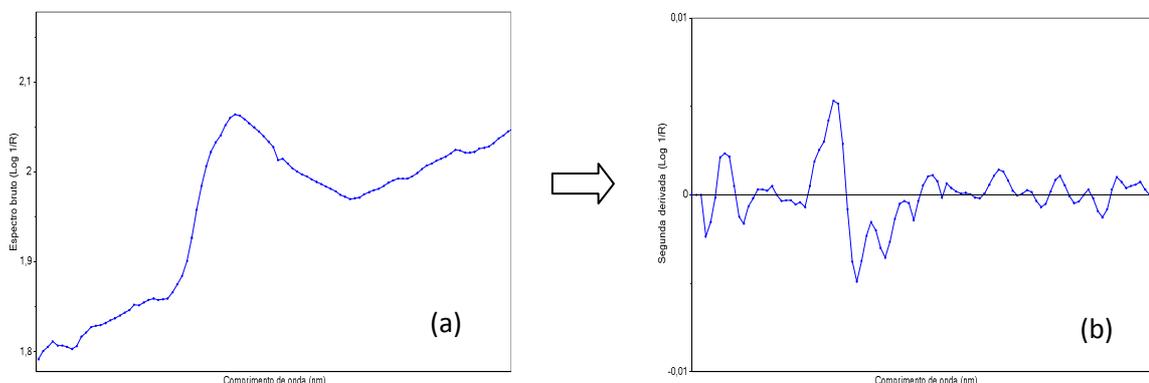
Por exemplo, a segunda derivada, y''_k , obtida com base na filtragem polinomial quadrática utilizando 5 pontos, por:

$$y''_k = \frac{1}{7}y_{k-2} - \frac{1}{7}y_{k-1} - \frac{2}{7}y_k - \frac{1}{7}y_{k+1} + \frac{2}{7}y_{k+2} \quad (5)$$

Onde K , são os pontos (espectrais) utilizados.

A **Figura 9.2** apresenta graficamente o pré-processamento aplicando a segunda derivada em dados espectrais brutos.

Figura 9.2 – Gráfico da segunda derivada (b) aplicado sobre o espectro bruto (a) utilizando filtro de Savitzky-Golay (5,5,11,2).



A maior limitação do uso dos métodos derivativos é a diminuição na relação sinal/ruído que se produz quando aumenta o grau da derivada, devido à alta sensibilidade do método à presença de ruído no espectro original. Por isto, antes da derivatização, é comum aplicar-se aos dados algum tipo de suavização. O algoritmo mais utilizado nas derivadas para este fim é o de Savitzky-Golay (SAVITZKY e GOLAY, 1964; OTTO, 2007).

2.4.1.1.2 Correção de espalhamento multiplicativo de luz

Correção de espalhamento multiplicativo de luz (Multiplicative Scatter Correction - MSC) é um método de transformação com o intuito de remover flutuações aditivas e multiplicativas relacionadas a parâmetros físicos das amostras, como por exemplo, diferenças de tamanho de partícula visando minimizar a interferência relativa ao espalhamento de luz com base no espalhamento médio de todos os espectros empregados na calibração multivariada (GELADI et al., 1985; CAMO, 2011).

A equação de MSC é dada por:

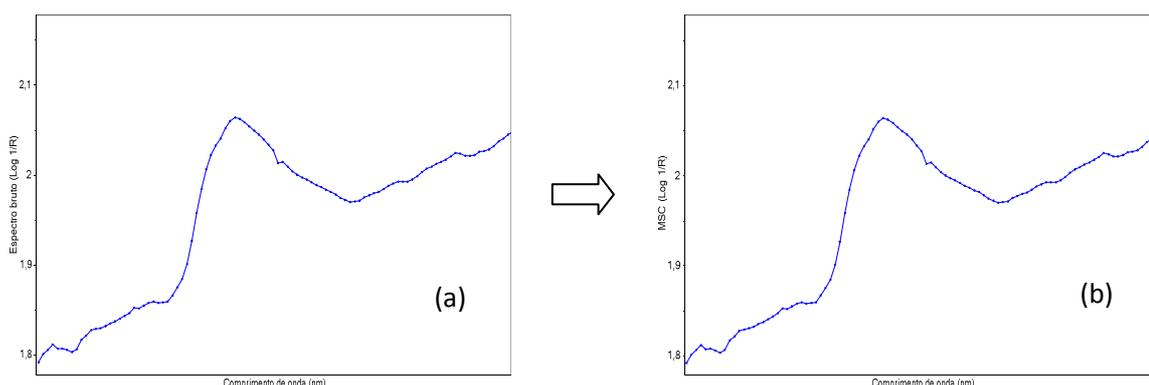
$$x_i = a + b\bar{x}_j + e \quad (6)$$

Onde, x_i = é o espectro medido sobre a amostra, \bar{x}_j = simboliza o espectro de referência (espectro do conjunto de calibração), e = termo de erro. Para cada amostra a e b = são determinados por regressão por mínimos quadrados simples de x_i versus \bar{x}_j ao longo dos comprimentos de ondas disponíveis. Cada valor x_{ij} da correção x_i (MSC) é dado por:

$$x_{ij}(MSC) = \frac{x_{ij}^{-a}}{b}; j = 1, 2, \dots, p \quad (7)$$

A **Figura 10** apresenta graficamente o pré-tratamento aplicando MSC nos dados espectrais brutos, onde aparentemente não apresenta diferenças.

Figura 10 – Gráfico do pré-tratamento com MSC (b) sobre o espectro bruto (a).



O MSC normaliza com base no espectro médio do conjunto de dados, que é o mais adequado para conjuntos de amostras similares (CAMO, 2011).

2.4.1.1.3 Variação normal padrão

A Variação normal padrão (Standard Normal Variate -SNV) é uma transformação geralmente aplicado a dados espectroscópicos, para remover os efeitos de dispersão por centralização e dimensionamento de cada espectro individualmente (ou seja, uma padronização da orientação da amostra) (CAMO, 2011, VARMUZA, 2009). SNV usa apenas os dados referentes aos espectros individuais, não utilizando a média dos espectros de algum conjunto (CAMO, 2011).

O pré-processamento SNV é dado pela seguinte equação:

$$x_i = \bar{x}_i + SD\bar{x}_j + e \quad (8)$$

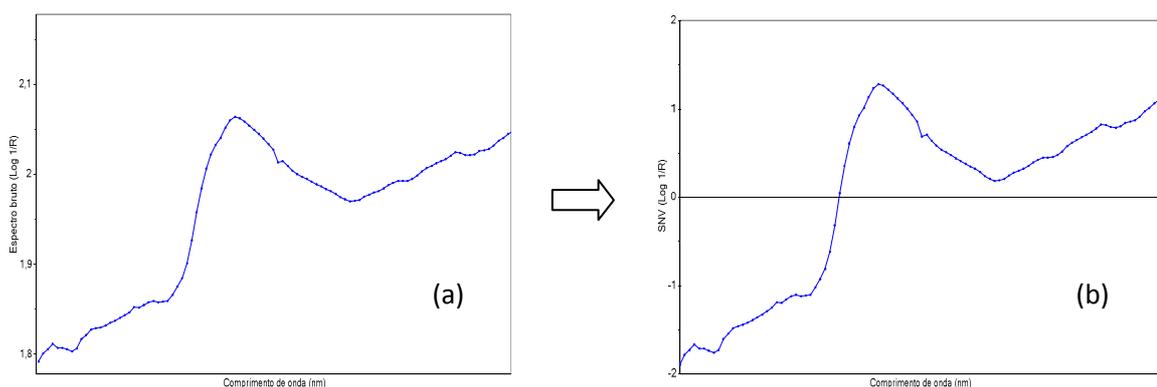
Onde, x_i = é o espectro medido sobre a amostra, \bar{x}_j = simboliza o espectro de referência (espectro do conjunto de calibração), e = termo de erro, SD= desvio padrão. A transformação SNV ajusta-se cada espectro a partir do seu próprio desvio padrão:

$$x_{ij}(SNV) = \frac{x_{ij} - \bar{x}_i}{SD}; j = 1, 2, \dots, p \quad (9)$$

Como MSC, o resultado prático da SNV é que ele remove interferências multiplicativas de dispersão e de efeitos de tamanho de partícula de dados espectrais. Estas transformações para correções de dispersão são normalmente usados com dados de reflectância difusa (BARNES et al., 1993).

A **Figura 11** apresenta graficamente o pré-processamento aplicando SNV nos dados espectrais brutos.

Figura 11 – Gráfico do SNV (b) sobre o espectro bruto (a) utilizando filtro de Savitzky-Golay



Um efeito de SNV é que na escala vertical, cada um dos espectros é centrada no zero, e varia aproximadamente de -2 a 2. Para além do dimensionamento diferente, o resultado é semelhante ao do MSC.

2.4.1.2 Métodos de Reconhecimento de Padrões e Classificação

Os métodos de reconhecimento de padrões são métodos quimiométricos que se utilizam de modelos multivariados permitindo identificar as semelhanças e diferenças nas propriedades físicas ou químicas das amostras e/ou variáveis podendo também identificar a presença de amostras anômalas (YÜDEL; DEMIR, 2004).

Utiliza-se esse método com o intuito de reduzir um conjunto de dados complexos em outro mais simples (com menos dimensões), levando a uma fácil interpretação dos dados (HAIR et al., 2009, ESBENSEN, 2002, YÜDEL; DEMIR, 2004).

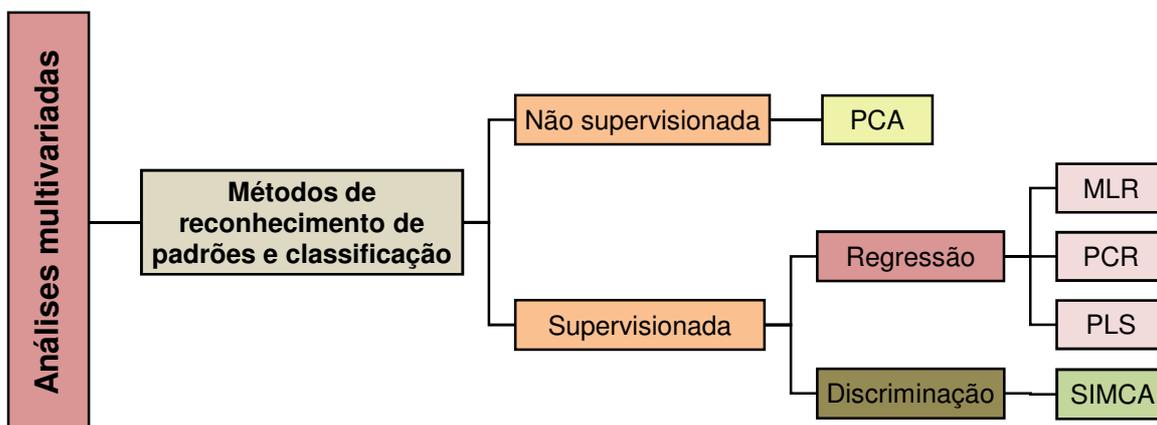
Os métodos de reconhecimento de padrões podem ser divididos em duas classes: não supervisionadas e supervisionadas. Os métodos não supervisionados, denominados também de métodos de análise exploratória, são aqueles usados apenas para examinar a similaridade ou diferença entre as amostras, bem como para identificar a formação de padrões no espaço multidimensional. Possuem a finalidade de verificar a formação natural de conjunto de amostras similares. Um dos métodos de análise exploratória mais utilizado é de análise por componentes principais (*Principal Components Analysis -PCA*) (BRERETON, 2009, YÜDEL; DEMIR, 2004).

Os métodos supervisionados são aqueles usados para prever se uma amostra futura pertence a uma classe ou agrupamento, utilizando informação prévia sobre um conjunto de amostras. Eles estão divididos em duas classes, métodos de regressão e de discriminação.

Alguns métodos de regressão utilizados são: regressão linear múltipla (*Multiplicative Linear Regression -MLR*), regressão de Componentes Principais (*Principal Componente Regression -PCR*), regressão por mínimos quadrados parciais (*Partial Least Squares -PLS*) dentre outros, e um exemplo clássico de método de discriminação, é o de modelagem independente e flexível por analogia de classes (*Soft Independent Modelling of Class Analogy- SIMCA*) (BRERETON, 2009, HAIR et al., 2009). O fluxograma da **Figura 12** apresenta de forma mais detalhada

os métodos de reconhecimento de padrões e classificação que serão utilizados neste trabalho.

Figura 12 - Fluxograma dos métodos de reconhecimento de padrões e classificação que serão aplicados.



2.4.1.2.1 *Análise dos componentes principais*

O método dos componentes principais (Principal Component Analysis- PCA) é a base da maioria dos métodos modernos para tratamento de dados multivariados. Esta técnica permite extrair de um determinado conjunto de dados informações relevantes para que sejam mais bem entendidas (FERREIRA et al., 1999). Proporciona uma visão geral da informação interpretável principal contida em uma tabela multidimensional.

Através da PCA, calcula-se um novo sistema de coordenadas dos dados formado por vetores ortogonais chamados de componentes principais (principal components - PCs) (VARMUZA et al., 2009). Cada PC explica uma certa quantidade do total das informações contidas nos dados originais e o primeiro PC contém a maior fonte de informação no conjunto de dados. Cada PC subsequente contém, por ordem, menos informação que o anterior (JACKSON, 1991, YÜDEL; DEMIR, 2004).

Coordenadas das amostras no novo sistema ortogonal de eixos (PCs) são denominadas escores. Os escores fornecem a composição das PCs em relação às amostras, enquanto os *loadings* (cargas ou pesos) fornecem essa mesma composição em relação às variáveis. O peso de cada variável original sobre uma

determinada PC (*loading*) pode ser definidos como o cosseno do ângulo entre o eixo da variável e o eixo da PC e refletem a correlação existem entre as variáveis originais e as PCs (BEEB, et al., 1998; BRERETON, 2009).

Na representação da matriz, o modelo com um determinado número de componentes tem a seguinte equação:

$$X = TP^T + E \quad (10)$$

Onde, T = escores da matriz, P = loadings e E = erro .

Um dos objetivos principais da PCA é eliminar as componentes principais associadas a ruídos, reduzindo a dimensionalidade do problema e minimizando o efeito dos erros da medida. A redução da dimensão dos dados através das PCs é utilizada para facilitar a visualização de dados multivariados em gráficos de dispersão, transformar a alta correlação entre as variáveis, em um conjunto de menor número de variáveis correlacionadas, as quais podem ser utilizadas por outros métodos, separar a informação relevante (descrita por uma determinada variável) do ruído e combinar diversas variáveis que caracterizam uma substância química ou um processo tecnológico em uma única ou poucas variáveis (VARMUZA et al., 2009).

2.4.1.2.2 Regressão linear múltipla

O método de regressão linear múltipla (Multiplicative Linear Regression – MLR) busca estabelecer uma relação linear entre sinal e concentração aplicando o método dos mínimos quadrados. Para isso, faz uso tanto na calibração clássica como na calibração inversa. O modelo MLR pode ser obtido a partir de uma matriz X de respostas instrumentais com dimensão $(M \times K)$, onde M representa o número de amostras e K o número de variáveis (no caso de espectros K = comprimentos de onda). Além disso, utiliza os dados de um vetor y de dimensão $(m \times 1)$ que contém as concentrações (ou outra propriedade) obtidas por um método de referência das amostras. Cada variável dependente de y é expressa como uma combinação linear das variáveis independentes da matriz X por intermédio da expressão:

$$y = Xb \quad (11)$$

onde o vetor b contém os coeficientes da regressão e é calculado por mínimos quadrados a partir da pseudo-inversa de X :

$$b = (X^T X)^{-1} X^T y \quad (12)$$

os índices sobrescritos -1 e T representam a inversão e transposição da matriz, respectivamente. Com o modelo determinado, as concentrações de novas amostras podem ser estimadas a partir da seguinte equação:

$$y_{previsto} = X^* b \quad (13)$$

X^* representa a matriz de dados para as novas amostras.

Não obstante seu grande potencial, o método MLR apresenta alguns problemas que limitam sua aplicação. Um deles é que o número de amostras deve ser igual ou superior ao número de variáveis. Uma vez que o modelo consiste na resolução de um sistema de equações lineares simultâneas, a essa condição necessita ser satisfeita. Caso contrário, o sistema torna-se indeterminado. Um problema importante em calibração MLR é que a matriz $(X^T X)$ pode não ser invertida ou promover a propagação de erros quando existir forte correlação ou multicolinearidade entre as variáveis.

2.4.1.2.3 Regressão por Componentes Principais

A Regressão por Componentes Principais (*Principal Component Regression – PCR*) decompõem os dados originais (matriz X) em Componentes Principais e realiza uma regressão múltipla inversa relacionando os escores desta matriz com a propriedade de interesse (JACKSON, 1991).

Se cada amostra contenha p analitos, tem-se p variáveis $y(1), y(2), y(3), \dots, y(p)$ referentes à concentração. Isto permite definir um vetor de concentrações y ($y = y(1), y(2), y(3), \dots, y(p)$) que descreve a concentração de cada um dos p componentes da amostra. O espectro de cada amostra é dado pelas

absorbâncias nos diferentes comprimentos de onda, k . Por tanto, cada amostra é definida por um vetor x que contém k variáveis independentes ($x = x(1), x(2), x(3), \dots, x(k)$). Quando se constrói um conjunto de calibração com m amostras, o sistema pode ser descrito por meio de uma matriz de dados: uma matriz X , que contém os dados espectrais (de dimensão $m \times k$) e uma matriz Y contendo os valores das concentrações (de dimensão $m \times p$) (JACKSON, 1991).

Uma vez escolhido o número de Componentes Principais ideal para descrever a matriz X , esta pode ser representada por sua matriz de escores T :

$$T = XP \quad (14)$$

Onde, P = componentes da amostra, X = matriz com dados espectrais, T = matriz de escores.

A matriz de concentração Y é então relacionada com os escores de X :

$$Y = TB + E \quad (15)$$

Onde, Y = matriz de concentração, E = erro, B = é a matriz dos coeficientes da regressão e é calculada pela pseudo-inversa de T $[(T^T T)^{-1} T^T]$, conhecendo-se os valores das concentrações do conjunto de calibração:

$$B = (T^T T)^{-1} T^T Y \quad (16)$$

Uma vez estabelecido o modelo da calibração, este é utilizado para prever as concentrações de novas amostras a partir dos espectros registrados. Este procedimento é realizado da seguinte forma:

$$T^* = X^* P \quad (17)$$

Onde P = matriz dos pesos calculada na etapa de calibração, T^* = escores, das X^* = amostras de previsão.

E a partir da matriz dos coeficientes de regressão B , também calculada na etapa de calibração, calcula-se a propriedade a ser determinada das novas amostras:

$$Y_{\text{previsto}} = T^*B \quad (18)$$

Algumas vezes a variância relacionada a Y (concentrações) é uma parcela importante da variância global. Por usar apenas a matriz X na modelagem, PCR pode falhar ao encontrar as combinações lineares apropriadas das variáveis que modelam as concentrações. Além disso, se a escolha do número ótimo de PCs não for realizada corretamente, o modelo PCR pode apresentar uma baixa capacidade de previsão.

2.4.1.2.4 Regressão por Mínimos Quadrados Parciais

A Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (Partial least squares regression –PLS Regression) é outro método de regressão que utiliza a modelagem de componentes principais, que contorna a dificuldade característica do PCR descrita acima usando a informação das concentrações na obtenção dos fatores, o que só é justificável se tais concentrações tiverem valores confiáveis. O primeiro fator, neste caso chamado de variável latente, descreve a direção de máxima variância que também se correlaciona com a concentração. Estas variáveis latentes são na realidade combinações lineares das componentes principais calculadas pelo método PCR (GELADI, 1986).

A PLS utiliza a técnica de análise dos dados para posterior correlação entre os espectros (matriz X) e as propriedades de interesse (matriz Y). Quando existe apenas uma propriedade, Y é um vetor e, neste caso, o método é denominado PLS 1. A propriedade de interesse muitas vezes é a concentração de um analito, porém não limitada a esta, podendo até mesmo ser propriedades físico-químicas, tais como densidade e viscosidade, as quais são relacionadas a composição da amostra. As matrizes X e Y são decompostas por PCA por meio das equações abaixo (GELADI, 1986).

$$X = TP^T + E \quad (19)$$

$$Y = UQ^T + F \quad (20)$$

Sendo, X e Y = matrizes, P e Q = pesos de X e Y , respectivamente, T e U =os escores de X e Y , respectivamente, E e F = representam as matrizes de resíduos de X e Y , respectivamente.

Os escores e pesos representam, respectivamente, as coordenadas das amostras no sistema de componentes principais e a contribuição relativa de cada variável original (comprimento de onda) para a formação dos mesmos. No PLS, os valores dos escores nas matrizes T e U são alterados até que o melhor modelo linear seja estabelecido entre eles e assim, a maior covariância entre X e Y seja alcançada. Isso é feito em uma série de etapas, que são repetidas para cada componente principal estimada por meio de um processo iterativo. Desta maneira, no PLS existe um compromisso entre a explicação da variância em X e a obtenção da maior correlação com Y . Uma vez que no cálculo de cada componente principal os valores de concentração dos analitos também são levados em consideração, as componentes principais passam a ser denominadas variáveis latentes. Quando existe mais de uma coluna na matriz e a regressão é realizada empregando todas as colunas simultaneamente, o método passa a ser denominado PLS 2. Este método é interessante em situações nas quais as propriedades de interesse estão correlacionadas. Caso contrário, é preferível realizar uma regressão empregando PLS 1 para cada coluna da matriz Y , gerando um modelo ótimo para a previsão de cada analito (GELADI, 1986).

2.4.1.2.5 Modelagem Independente Flexível por Analogia de Classes

A Modelagem Independente Flexível por Analogia de Classes (*Soft Independent Modelling of Class Analogy- SIMCA*) é a técnica de análise mais utilizada que usa PCA para cada classe definida e testa a distância das amostras em relação a cada uma das classes, para determinar se pode ser situada em alguma classe e em qual ou quais delas (MASSART et al., 2005).

A quantidade ótima de componentes principais deve ser escolhida para cada modelo separadamente, de acordo com um procedimento de validação adequado. Em cada modelo, deve ser verificados possíveis valores atípicos (*outliers*) e melhorado, se possível (como se faria para qualquer modelo PCA) (ESBENSEN, 2002, MASSART et al., 2005). Esse modelo é dado por:

$$x_{ij}^K = \bar{x}_{kj} + \sum_{r=1}^{P_K} v_{jr}^K u_{ir}^K + e_{ij}^K \quad (21)$$

Onde, \bar{x}_{kj} = média da variável j na classe K , P_K = número de componentes principais significativos na classe K , v_{jr}^K = *loadings* da variável j do componente r na classe K , u_{ir}^K = *score* do objeto i , no componente r da classe K .

O símbolo K adicionado significa apenas que os dados da classe K são considerados para construir o modelo.

SIMCA é uma das ferramentas mais utilizadas principalmente para discriminação de espécies, e se apresenta como ferramenta eficiente na identificação de espécies.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1. OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

No período de junho a agosto de 2013 foram coletadas na feira livre do Ver-o-Peso, em Belém-Pa, Brasil, indivíduos de cinco espécies de peixes tradicionalmente comercializados na região amazônica: peixe pedra (*Genyatremus luteus*); pargo (*Lutjanus purpureus*); pescada gó (*Macrodon ancylodon*); pescada amarela (*Cynoscion acoupa*); corvina (*Micropogonias furnieri*), sendo 10 indivíduos por espécie. Após a coleta os indivíduos foram imediatamente transportados sob refrigeração (média de 7°C) em caixa térmica para o Laboratório de carnes e pescados da Universidade Federal do Pará (UFPA) para o início imediato das análises espectroscópicas. Os peixes foram filetados e analisados sob três condições: filés frescos intactos, filés frescos triturados e triturados liofilizados. Todo o processo de análises espectroscópicas e preparação das amostras se deu sob temperatura ambiente entre 24 e 26 °C.

3.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

As análises físico-químicas foram realizadas em triplicata seguindo os métodos de referência para umidade (secagem em estufa a 105°C, AOAC 2002), proteína bruta (Kjedahl f= 6,25, AOAC 2002) e lipídios (BLIGH e DYER, 1959).

3.3. COLETA DOS ESPECTROS

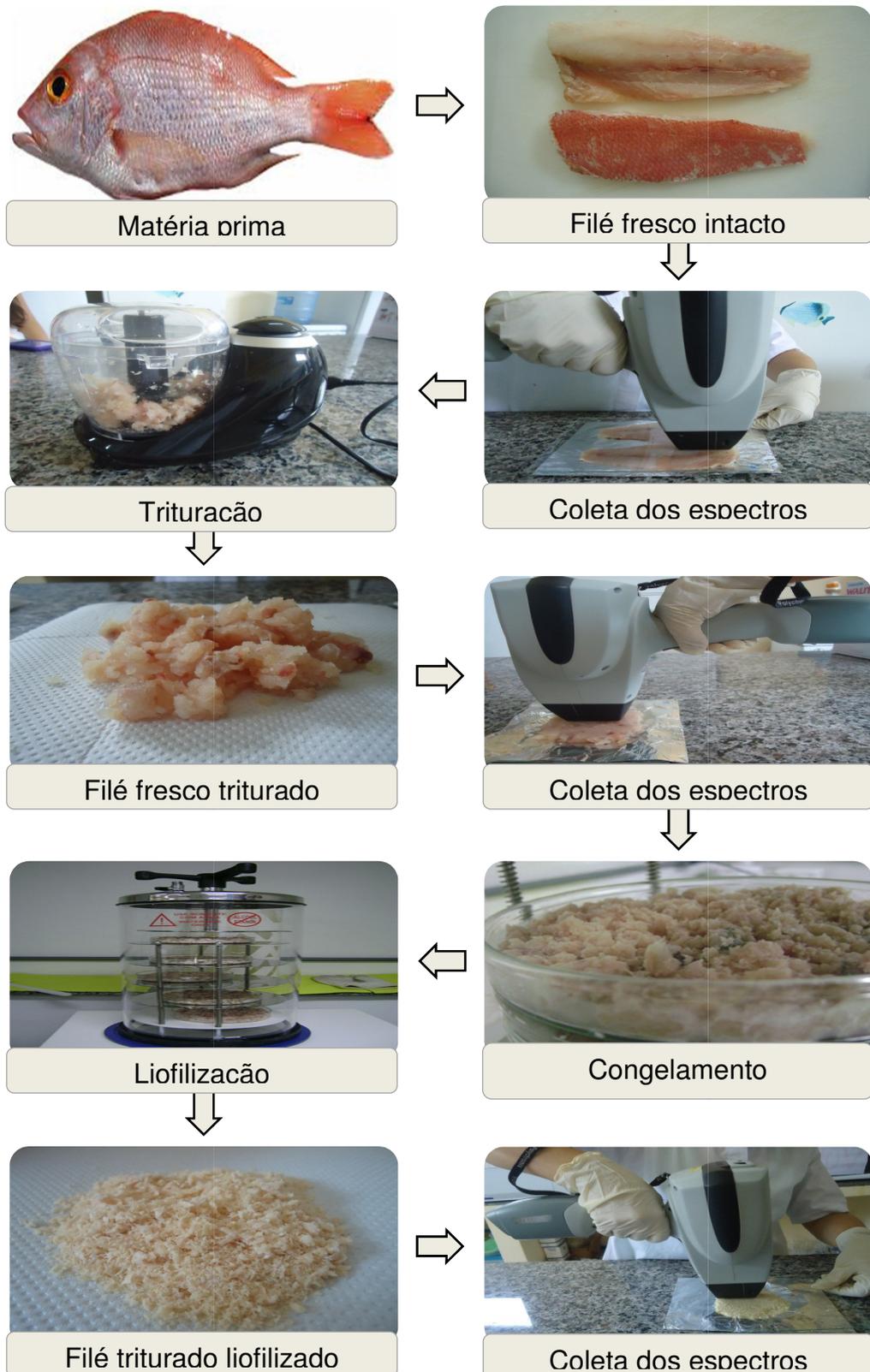
Os espectros foram coletados e registrados em modos de medidas espectrais de reflectância ($R = I_r / I_0$) utilizando um espectrômetro portátil MEMS-NIRS (Phazir™ 1624, Polychromix Inc., Wilmington, MA, USA) (**Figura 13**), na faixa de comprimento de onda de 1600 a 2400 nm a intervalos que variam de 7,3 e 8,7 nm e resolução óptica de 11nm, sendo os dados obtidos na forma do logaritmo da recíproca da reflectância ($A = \log 1/R$).

Figura 13 - Espectrômetro portátil utilizado nas análises espectroscópicas.



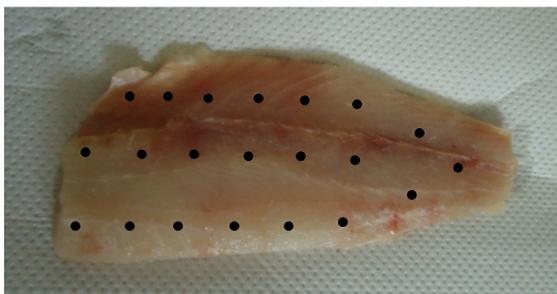
As amostras foram colocadas sobre uma superfície metálica e analisadas através de uma placa de vidro com 2mm de espessura. As etapas de preparação e medida das amostras podem ser bem visualizadas no fluxograma da **Figura 14**.

Figura 14 - Fluxograma de etapas de preparação das amostras e análises por espectroscopia no infravermelho próximo (NIR)



Os pontos de leitura foram delimitados em partes estratégicas de forma que abrangessem toda a superfície das amostras, principalmente no filé fresco intacto (**Figura 15**), no qual se utilizaram os dois filés obtidos de cada peixe, com a coleta de espectros em 21 pontos de cada filé, sendo 42 pontos para filés frescos intactos.

Figura 15 - Delimitação de pontos de coleta de espectros nos filés frescos intactos.



Os dois filés frescos intactos de cada indivíduo foram triturados juntamente utilizando um processador de alimentos. De cada amostra triturada, coletaram-se seis espectros de forma aleatória, por estarem bastante homogêneos. Os filés triturados foram congelados e liofilizados. Após a liofilização dos filés triturados, estes foram novamente homogêneos. De cada amostra liofilizada, coletaram-se três espectros em pontos escolhidos aleatoriamente.

O conjunto de espectro por amostra foi adquirido através de duas leituras. Ao todo foram coletados 4.200 espectros dos filés intactos, 600 dos filés triturados, 300 do filé liofilizado. Para análise de dados, utilizou-se dois espectros por amostra referentes à primeira e segunda leitura

3.4 ENSAIOS PRELIMINARES PARA ESCOLHA DE MATERIAL DE REVESTIMENTO.

Devido à alta umidade do peixe fresco e à presença de partículas muito pequenas na amostra liofilizada, as quais poderiam danificar o equipamento NIR utilizado, necessitou-se da aplicação de uma placa de material transparente sobre as mostras durante a coleta dos espectros. Desta forma, foram realizados testes preliminares com uma única amostra de *Cynoscion acoupa*, utilizando três diferentes materiais, como: filme de policloreto de polivinila transparente, placas de vidro e placa de quartzo. Utilizou-se duas placas de vidro com espessuras diferentes (1 e

2mm) e uma placa de quartzo (com 2 mm de espessura). Avaliou-se o impacto da composição do material sobre os espectros coletados da amostra, a fim de utilizar o material que proporcionou menos ruído aos espectros.

3.5 TRATAMENTO QUIMIOMÉTRICO DOS DADOS

Para análise quimiométrica dos dados, testou-se um conjunto de pré-processamentos e combinações entre pré-processamentos: como suavização de sinais analíticos (*Smoothing*), primeira derivada, segunda derivada, linha de base (*Baseline*), MSC (*Multiplicative Scatter Correctio*), SNV (*Standard Normal Variate*). O alisamento Savitzky Golay foi utilizado para remover dos espectros a presença de ruídos instrumentais aleatórios, aumentando, assim, a razão sinal/ruído tendo-se janelas otimizadas entre 3 e 21 pontos. Estes foram seguidos de análise de componentes principais (PCA) e de modelagem independente por modelo de analogia de classes (SIMCA) para avaliação do melhor modelo de discriminação de espécies.

Modelos de regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) e por Componentes Principais (PCR) também foram aplicados a cada pré-processamento para avaliação do melhor modelo de predição da composição química. Para isto, avaliaram-se os valores dos coeficientes de determinação de calibração (R^2) e de validação cruzada (r^2), erro padrão médio de calibração (RMSEC) e de validação cruzada (RMSECV).

O software utilizado tanto para a construção dos modelos de discriminação e predição assim como para aplicação dos pré-processamentos foi o The Unscrambler® v10.1 (CAMO PROCESS AS, Oslo, Norway)..

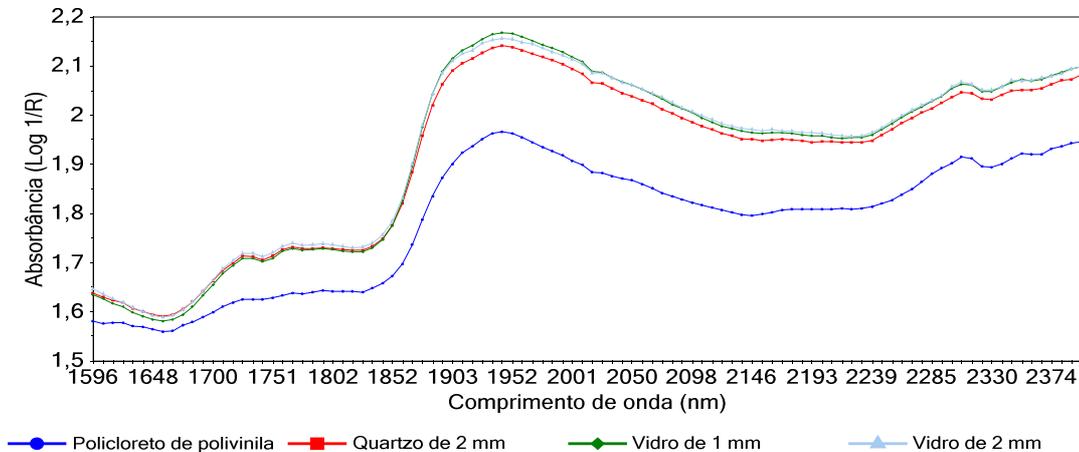
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ENSAIOS PRELIMINARES PARA ESCOLHA DE MATERIAL DE REVESTIMENTO.

Os materiais de revestimentos testados foram avaliados após os tratamentos quimiométricos dos dados espectrais, apresentados graficamente nas **Figuras 16, 17 e 18**.

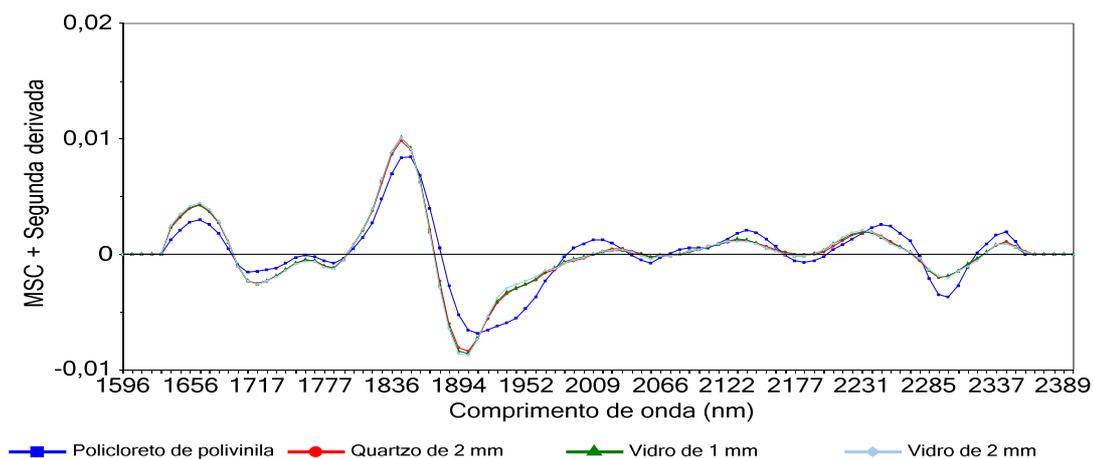
A figura (**Figura 16**) apresenta quatro medidas espectrais, cada espectro refere-se à média de 30 espectros brutos coletados de *Cynoscion acoupa* utilizando revestimentos de policloreto de polivinila transparente, placas de vidro (de 1 e 2mm de espessura) e placa de quartzo (de 2 mm de espessura).

Figura 16 - Média dos espectros brutos obtidos de *Cynoscion acoupa* utilizando policloreto de polivinila transparente, placa de quartzo (de 2 mm de espessura), placas de vidro (de 1 mm e 2 mm de espessura) como material de revestimento.



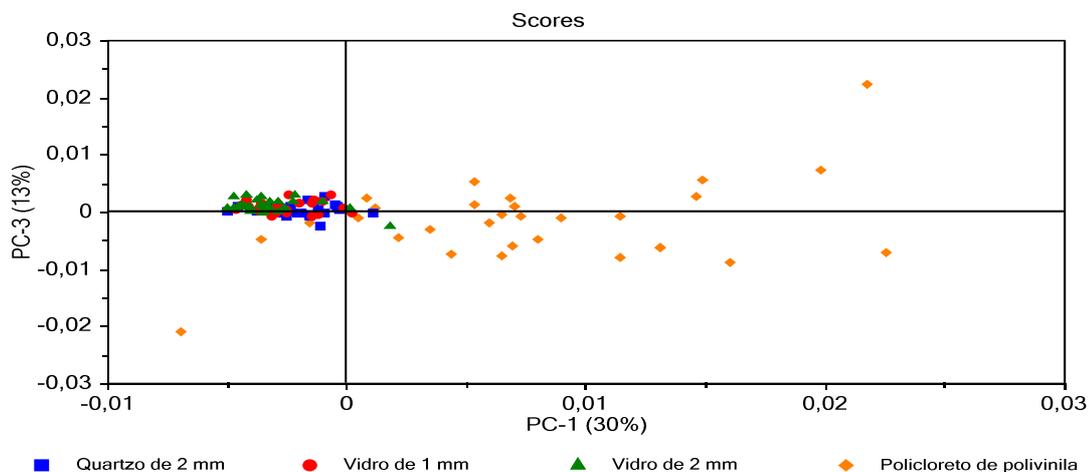
Os espectros brutos obtidos foram pré-processados utilizando a correção de espalhamento multiplicativo de luz (MSC), seguido de uma segunda derivada (5, 5, 11, 2) aplicando-se o filtro de Savitzky-Golay (**Figura 17**).

Figura 17 - MSC seguido de segunda derivada utilizando o filtro de Savitzky-Golay (5, 5, 11, 2) aplicados sobre a média dos espectros brutos de *Cynoscion acoupa* utilizando policloreto de polivinila transparente, placa de quartzo (de 2 mm de espessura), placas de vidro (de 1 mm e 2 mm de espessura) como material de revestimento.



Após o pré-processamento dos espectros, também se realizou análise dos componentes principais (PCA) abrangendo a região espectral entre 1600-2400 nm (**Figura 18**).

Figura 18 - Scores dos componentes principais para PC1 e PC3 utilizando os dados espectrais pré-processados de *Cynoscion acoupa* utilizando policloreto de polivinila transparente, placa de quartzo (de 2 mm de espessura), placas de vidro (de 1 mm e 2 mm de espessura) como material de revestimento.



De acordo com os resultados que podem ser visualizados nas **Figuras 16 e 17**, observa-se a disparidade da linha espectral referente ao uso de filme de policloreto de polivinila transparente como material de revestimento, quando comparadas aos revestimentos de vidro e de quartzo. Por outro lado, as três placas utilizadas (vidros com 1 e 2 mm de espessura e quartzo com 2 mm de espessura) apresentaram linhas espectrais com elevada semelhança.

O mesmo ocorreu no gráfico dos componentes principais (PCs) dos materiais em questão (**Figura 18**). Pois neste, observou-se a formação de um grupo composto por pontos referentes aos materiais de revestimento de vidro e de quartzo, e observou-se também, outro grupo de pontos bastante espalhados, referentes ao revestimento de policloreto de polivinila. Não houve diferenças marcantes entre revestimentos de vidro e quartzo, mesmo quando se utilizou placas de vidro com espessuras diferentes (1 e 2 mm). Em contrapartida, as diferenças com a utilização de revestimento de filme de policloreto de polivinila transparente em relação aos demais materiais apresentaram-se bastante evidentes.

A partir da análise dos espectros brutos (**Figura 16**), pré-processados (**Figura 17**), e da análise dos seus componentes principais (**Figura 18**), pode-se deduzir que filme de policloreto de polivinila transparente apresentou-se inadequado para análises por NIR, enquanto que as placas de vidro de 2 mm e de 1 mm de espessura e a placa de quartzo de 2 mm de espessura apresentaram semelhança tanto em relação aos espectros brutos (**Figura 16**) e pré-processados (**Figura 17**), quanto aos componentes principais (**Figura 18**), sendo que ambos poderão ser utilizadas para análises NIR em filés de peixes.

Geralmente se utilizam placas de quartzo para coletas de espectros em análises espectroscópicas. Alguns estudos apresentam análise em filés de peixe intacto (XICCATO et al., 2004) e farinha de peixe (COZZOLINO et al., 2002a), utilizando pequenas placas de quartzo, dificultando análises de amostras de maior tamanho.

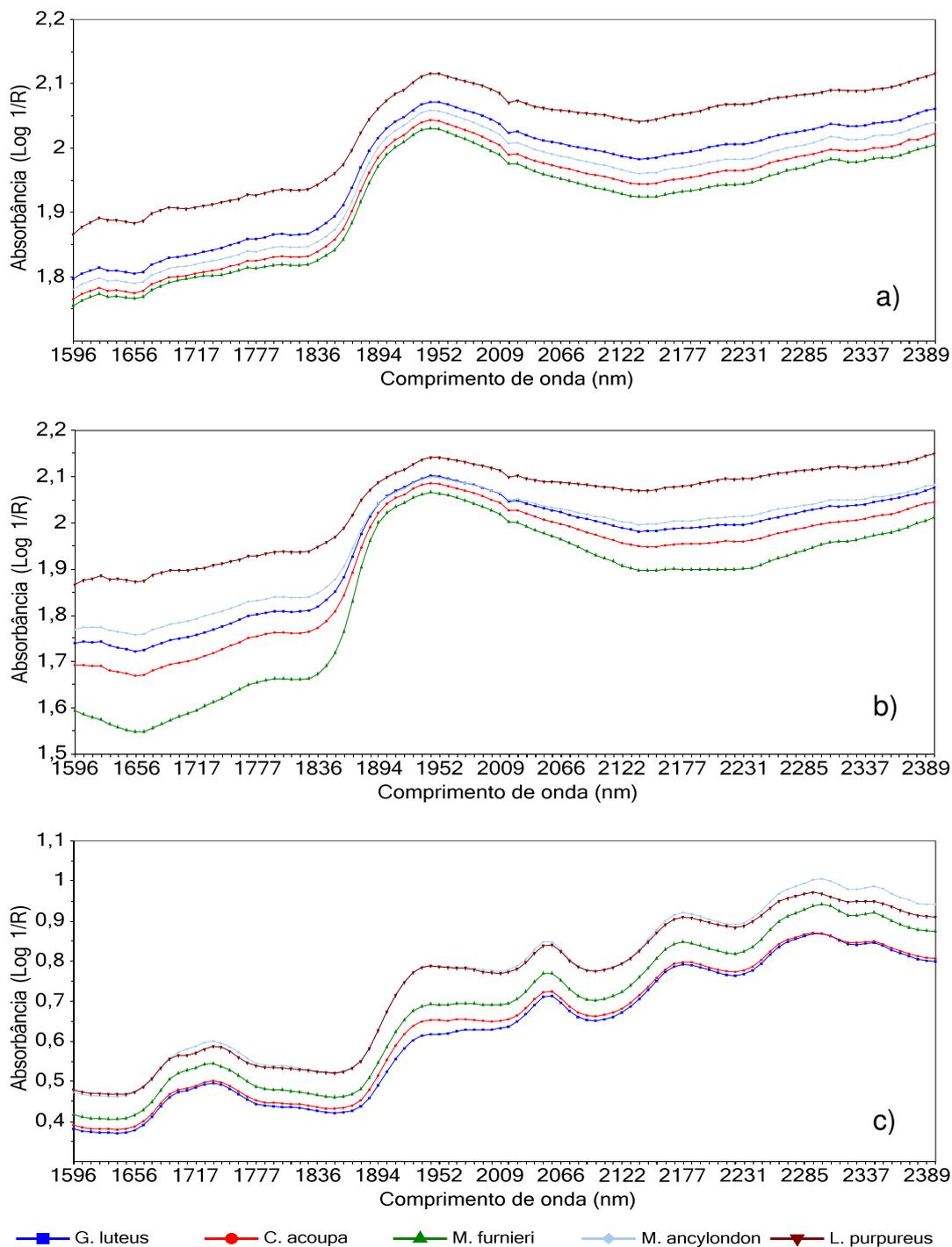
Dentre as três placas testadas, a placa de vidro de 2 mm é a de mais fácil acesso, podendo ser adquirida mais facilmente no mercado local de tamanho proporcional ao material de análise, além de ser economicamente mais acessível que a placa de quartzo, facilitando as análises em filés intactos de peixes. Desta

forma, a placa de vidro de 2 mm de espessura foi escolhida para ser utilizada nas próximas etapas de coleta de espectros em filés de peixe frescos intactos, triturados e liofilizados.

4.2 TRATAMENTOS DOS DADOS ESPECTRAIS PARA A DISCRIMINAÇÃO DE ESPECIES

A partir da média de espectros brutos coletados sobre os filés frescos intactos, filés frescos triturados, filés triturados liofilizados (As **Figuras 19 a, b e c**). Visualiza-se a diferença das linhas espectrais de amostras frescas (**Figuras 19 a e b**) e liofilizadas (**Figuras 19 c**). Isso ocorre, pois, as vibrações de uma elevada concentração de moléculas de água presente nas amostras frescas causam a sobreposição de muitos dos picos de absorção presente nos espectros, e assim praticamente apenas o pico situado em 1940 nm, relacionado à combinação das vibrações O-H de água conseguem ser visualizados (NIELSEN, 2010, WORKMAN; WEYER, 2012).

Figura 19 - Média dos espectros brutos coletados sobre a) filés frescos intactos, b) frescos triturados, c) triturados liofilizados, ambos de *M. ancylondon*, *G. luteus*, *C. acoupa*, *L. purpureus* e *M. furnieri* utilizando a faixa de 1600 a 2400nm da região espectral do infravermelho próximo.

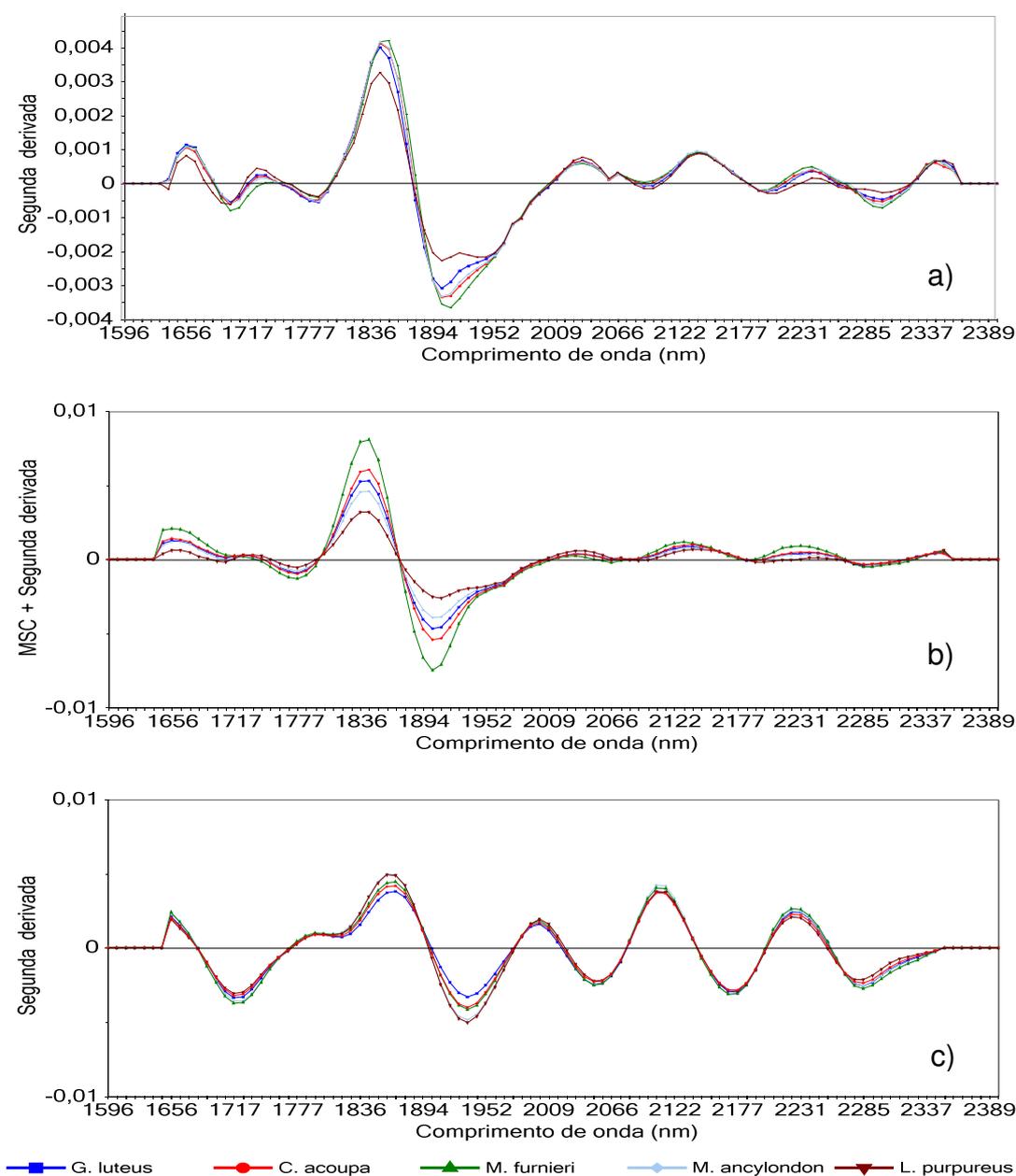


Quando se remove maior parte de água através da liofilização (**Figura 19 c**), nota-se o surgimento de novos picos de absorção, referentes aos demais componentes presentes nas amostras, como em 1734 nm relacionados ao estiramento C-H₂, da região e do primeiro sobretom de bandas relacionadas com conteúdo de óleo, 2050, 2058 e 2177nm relacionados à combinação -NH de proteínas, 2292 nm relacionados a combinação de tons C-H e C=C, características de ácidos graxos insaturados, além de resíduos de água ainda presente nas amostras liofilizadas em 1936 nm (MURRAY, 1986, NIELSEN, 2010, WORKMAN; WEYER, 2012).

Os espectros brutos visualizados nas **Figuras 19 a, b e c** ainda apresentam ruídos instrumentais e efeitos de espalhamento de luz, os quais provocam o deslocamento do espectro vertical e espalhamentos multiplicativos. Fazendo-se necessária a aplicação de pré-processamentos de modo a facilitar a interpretação das propriedades relacionadas aos sinais analíticos. O alisamento Savitzky Golay foi utilizado para remover dos espectros a presença de ruídos instrumentais aleatórios, aumentando, assim, a razão sinal/ruído. Realizaram-se sobre os espectros os cálculos da segunda derivada, visando o ajuste da linha de base, além da correção de espalhamento multiplicativo de luz (MSC).

As **Figuras 20 a, b e c** apresentam os espectros de amostras frescas intactas, frescas trituradas e trituradas liofilizadas, respectivamente, após os pré-processamentos. O conjunto de pré-processamentos foram avaliados após a aplicação de PCA. Os modelos PCA que apresentaram maior discriminação foram selecionados para cada condição de tratamento das amostras.

Figura 20 – Pré-processamentos aplicados através de: a) segunda derivada utilizando o filtro de Savitzky-Golay (5, 5, 11, 2) da média dos espectros brutos obtidos a partir dos filés frescos intactos; b) correção multiplicativa de sinal (MSC), função *common offset* seguida de uma segunda derivada utilizando o filtro Savitzky-Golay (6, 6, 13, 2), da média dos espectros brutos obtidos a partir dos filés frescos triturados; c) Segunda derivada utilizando o filtro de Savitzky-Golay (7, 7, 15, 2) da média dos espectros brutos obtidos a partir dos filés triturados liofilizados, ambos de *M. ancylondon*, *G. luteus*, *C. acoupa*, *L. purpureus* e *M. furnieri*.



Espectros pré-processados de filés frescos intactos (**Figura 20 a**) apresentaram picos de absorção em 1911 e 1852 nm relacionado com bandas O-H, relativo ao primeiro sobretom de grupos hidroxila de água; em 2034, 2138 nm relacionados à combinação das vibrações -NH e O-H de proteínas; 1665 e 1708 nm relacionados ao estiramento C-H₂ região do primeiro sobretom de bandas relacionadas principalmente a ácidos graxos saturados; 2231 e 2300 nm relacionados à combinação de tons C-H e C=C, características de ácidos graxos insaturados (MURRAY, 1986; MILLER, 2001; NIELSEN, 2010, WORKMAN; WEYER, 2012).

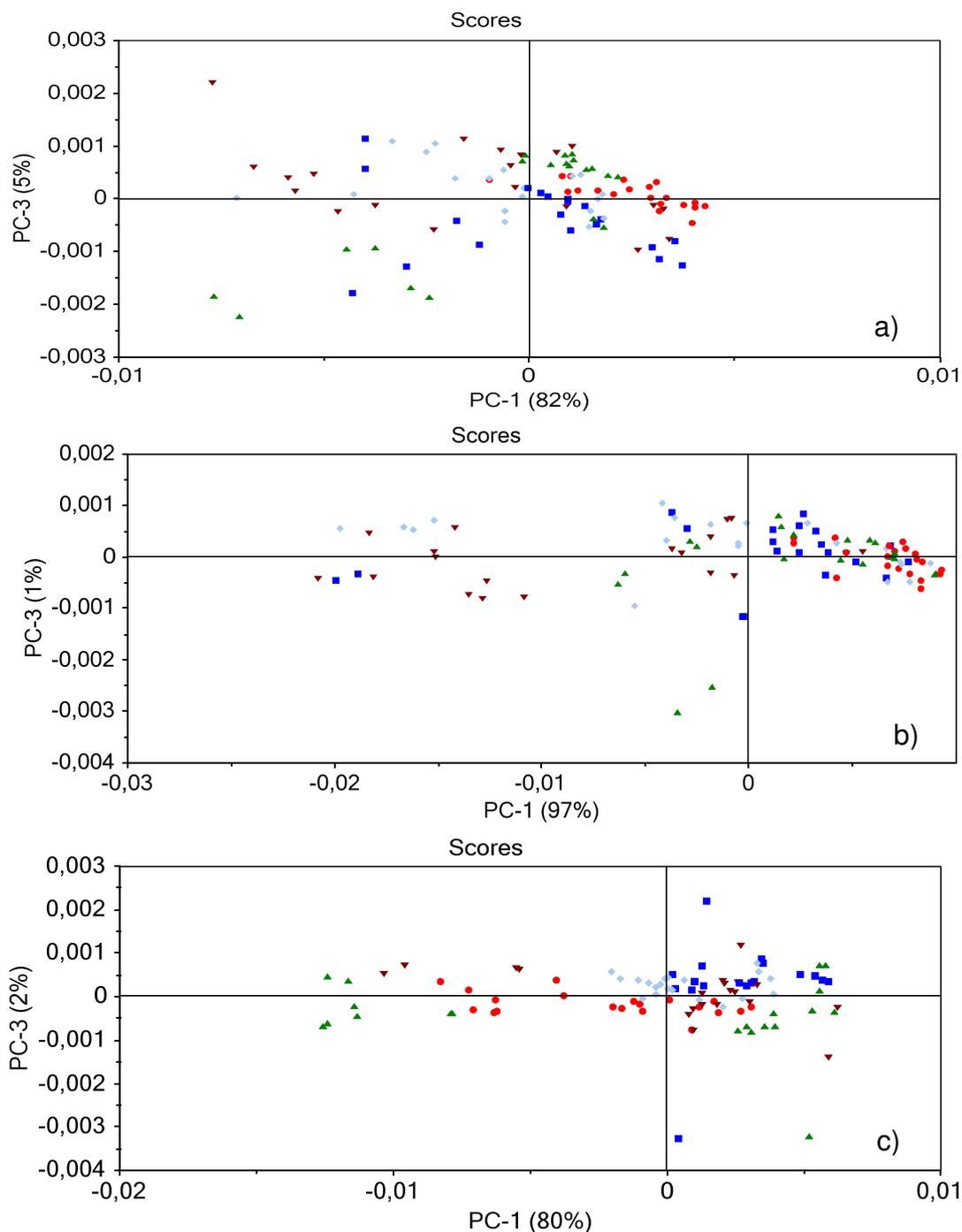
Espectros pré-processados de filés frescos triturados (**Figura 20 b**) também apresentara em 1903 e 1844 nm, picos de absorção para água; em 1650, 2231, 2352 nm relacionados ao conteúdo de óleo (MURRAY, 1986); 2130 nm relacionadas a proteínas (MURRAY, 1986; MILLER, 2001; NIELSEN, 2010, WORKMAN; WEYER, 2012).

Para amostras liofilizadas, os espectros pré-processados (**Figura 20 c**) apresentaram picos de absorção em 1861 e 1936 nm relacionados a grupos hidroxila de água, 1656, 1725, 2224 e 2283 nm característicos de óleo e em 2001, 2050, 2106 e 2169 nm relacionados à combinação -NH de proteínas (MURRAY, 1986, NIELSEN, 2010, WORKMAN; WEYER, 2012).

4.3 ANÁLISES DE PCA

A aplicação de PCA à matriz dos espectros pré-processados resultou nos *scores* apresentado na **Figura 21 a**, para os filés dos peixes frescos intactos, **Figura 20 b** para os frescos triturados e **Figura 21 c** para os triturados liofilizados, ambos utilizando uma pequena região do NIR de 1600 a 2400 nm.

Figura 21 - Scores dos componentes principais para PC1 e PC3 para filés a) frescos intactos, b) frescos triturados e c) triturados liofilizados, ambos de *M. ancylodon*, *G. luteus*, *C. acoupa*, *L. purpureus* e *M. furnieri*.



A PCA aplicada nos espectros coletados de filés frescos intactos mostrou a PC1 (que contém 82% de variância explicada) *versus* PC3 (que contém 5 % de variância explicada). Observa-se que ocorre principalmente a separação entre as

espécies de *G. luteus* e, *L. purpureus* e *M. ancylodon*. As demais espécies apresentaram-se bastante espalhadas no gráfico.

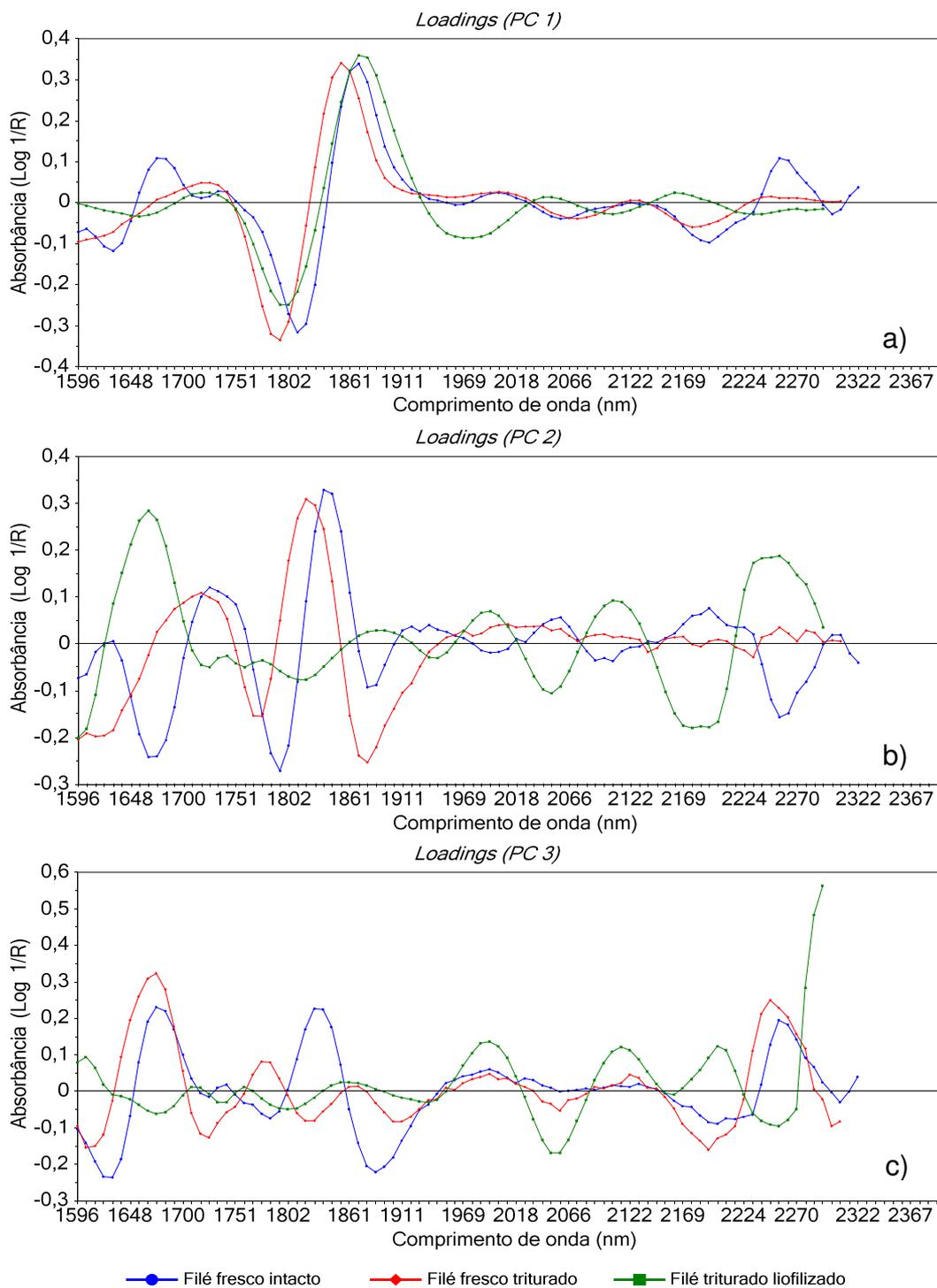
A PCA aplicada nos espectros coletados de filés frescos triturados mostrou a PC1 (que contém 97 % de variância explicada) *versus* PC3 (que contém 1 % de variância explicada). Nesta, apesar das amostras não terem sofrido tratamentos bruscos em relação à primeira, apresentou formação de grupos misturados, menos nítidos quando comparadas aos grupos formados na **Figura 21 a** de filés intactos.

Para a PCA aplicada nos espectros coletados de filés triturados liofilizados também apresentou PC1 (que contém 80 % de variância explicada) *versus* PC3 (que contém 2 % de variância explicada), também apresentou dois grupos formados por de *G. luteus* e, *L. purpureus*, além disso, apresentou mais dois pequenos grupos formados por *M. furnieri*. As demais espécies apresentaram-se espalhadas no gráfico.

A formação de grupos relaciona-se com a diferença na composição entre as espécies. A composição química em peixes varia amplamente, mesmo entre indivíduos da mesma espécie (XICCATO et al., 2004), sendo que a composição lipídica é a que mais influencia na formação de grupos (COZZOLINO, 1998; COZZOLINO et al, 2002a).

Os *loadings* apresentados nas **Figuras 22 a, b e c** apresentam as variáveis que mais influenciam nos gráficos dos PCs das **Figuras 21 a, b e c**, respectivamente, sendo os PCs apresentadas nos gráficos as combinações de três PCs (PC1, PC2 e PC3).

Figura 22 - Gráfico de *Loadings* do a) primeiro componente principal PC1, b) segundo componente principal PC2 e c) terceiro componente principal PC3, ambos das amostras de filés frescos intactos, frescos triturados e triturados liofilizados.



Para o primeiro componente principal (**Figura 22 a**), picos positivos e negativos entre 1844 a 1911 relacionados ao grupo hidroxila (O-H) de água, foram os que mais influenciaram no gráfico dos *scores* das **Figuras 21 a, b e c**, para amostras intactas, trituradas e liofilizadas. Além disso, filés frescos intactos também apresentaram influência de outras variáveis que apresentaram picos de absorbância em 1674, 1677, 1725 nm relacionados ao estiramento C-H₂ região do primeiro sobreton de bandas relacionadas com ácidos graxos saturados e, 2292 nm relacionado à combinação de tons C-H e C=C de ácidos graxos insaturados (MURRAY, 1986, NIELSEN, 2010, WORKMAN; WEYER, 2012).

Para o PC2 (**Figura 22 b**), o qual é a soma de PC1 e PC2, pode-se observar que neste gráfico a água continua sendo a variável que mais influencia no gráfico principalmente para as amostras frescas intactas e frescas trituradas. Porém já não é mais a variável de maior influência para amostras liofilizadas, pois nestas, novos picos de absorção são visualizados em 1656 e 1727 nm, relacionadas aos ácidos graxos saturados e 2231, 2247, 2307 nm aos ácidos graxos insaturados e 2106 nm relacionado ao estiramento N-H de proteínas (MURRAY, 1986, NIELSEN, 2010, WORKMAN; WEYER, 2012).

Para o PC3 (**Figura 22 c**), o qual apresenta as variáveis que mais influenciam através da soma dos PCs 1, 2 e 3, novos picos foram observados em amostras trituradas em 1656 nm de bandas C-H₂ relacionadas com conteúdo graxo saturado, e em 2239 e 2292 nm aos insaturados. Em amostras liofilizadas as bandas de absorção referente a proteínas se tornam mais visíveis em 2050, 2106, 2114 e 2169. (MURRAY, 1986, NIELSEN, 2010, WORKMAN; WEYER, 2012)

4.4 ANÁLISES POR SIMCA

A modelagem SIMCA foi realizada utilizando modelos de PCA para cada espécie. O número ideal de fatores utilizados para *G. luteus*, *L. purpureus*, *M. ancylondon*, *C. acoupa* e *M. furnieri*, respectivamente, foi de 4, 3, 3, 5 e 3 em filés frescos intactos, de 2, 2, 2, 1 e 1 em filés frescos triturados e de 5, 3, 2, 4 e 2 em filés triturados liofilizados respectivamente.

A **Tabela 2** apresenta valores da distância entre os modelos obtidos para cada espécie, em amostras intactas e amostras liofilizadas. Filés frescos triturados não apresentaram distância significativa entre os modelos (mínimo de 1,01 e máximo de 2,67) e não foram tabelados, pois a distância mínima requerida para separação adequada de grupos é 3,00 (XICCATO et al., 2004).

Tabela 2 - Distância de modelo para modelo em SIMCA para clusters de filés frescos intactos (acima da diagonal) e triturados liofilizados (abaixo da diagonal).

	<i>G. luteus</i>	<i>L. purpureus</i>	<i>M. ancylondon</i>	<i>C. acoupa</i>	<i>M. furnieri</i>
<i>G. luteus</i>	1	7,33	5,14	4,82	4,16
<i>L. purpureus</i>	52,05	1	11,91	8,84	13,31
<i>M. ancylondon</i>	6,67	6,56	1	6,00	4,38
<i>C. acoupa</i>	26,24	13,79	4,77	1	3,42
<i>M. furnieri</i>	6,19	8,34	3,00	2,90	1

A partir dos dados obtidos e visualizados na **Tabela 2**, observa-se que a distância de modelo a modelo aumentou substancialmente em espectros obtidos de filés triturados liofilizados quando comparado aos espectros obtidos de filés frescos intactos. A maior distância entre modelos foi encontrada em espectros obtidos de filés triturados liofilizados, entre os grupos de *G. luteus* e *L. purpureus* de 52,05 (**Figura 23**), ao passo que a menor distância obtida foi entre os grupos *M. furnieri* e *C. Acoupa* de 2,90 (**Figura 24**).

Figura 23 - Gráfico SIMCA da distância entre *G. lúteus* versus *L. purpureus* em um conjunto de modelos PCAs de cinco espécies (*M. ancylondon*, *G. luteus*, *C. acoupa*, *L. purpureus* e *M. furnieri*).

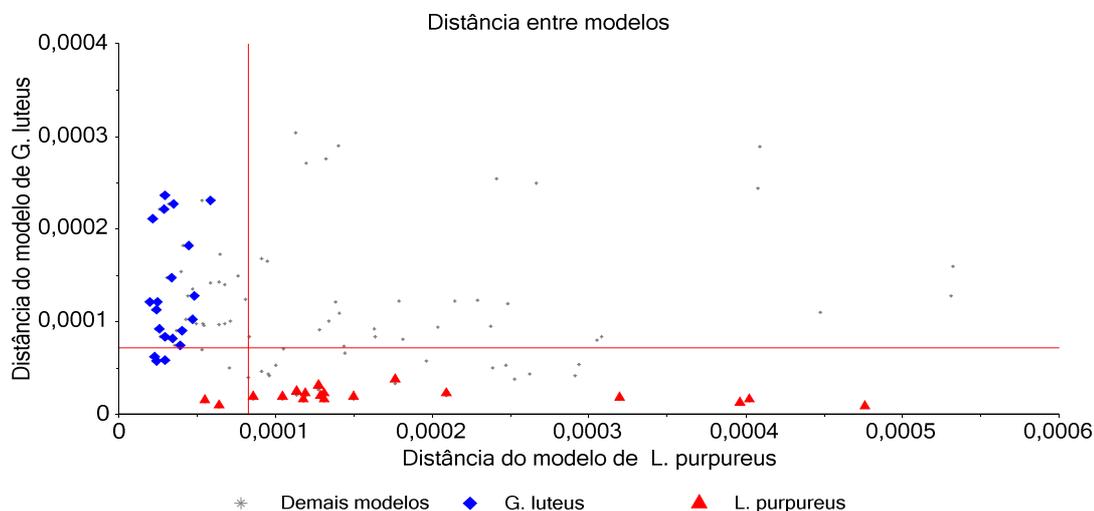
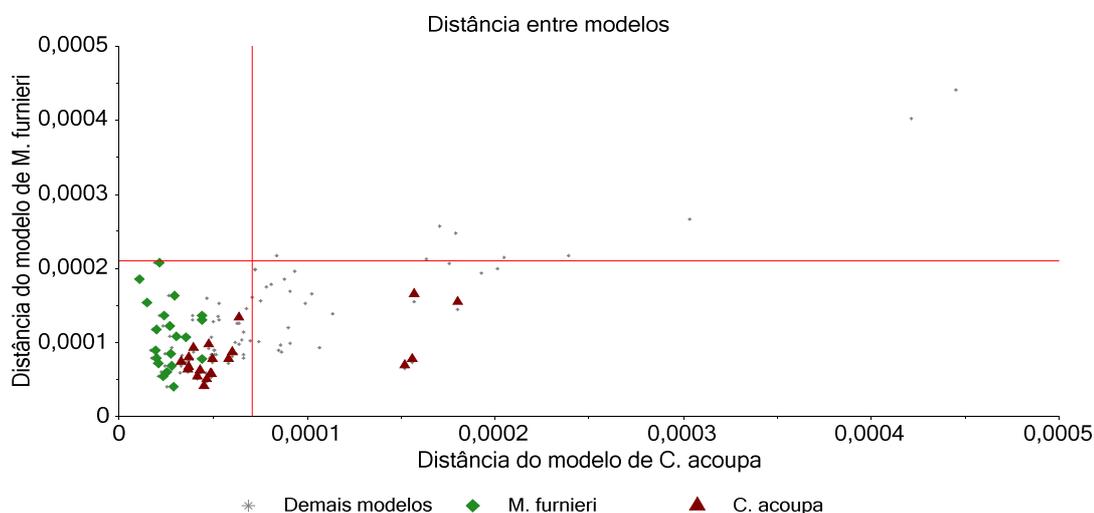


Figura 24 - Gráfico SIMCA da distância entre *C. acoupa* versus *M. furnieri* em um conjunto de modelos PCAs de cinco espécies (*M. ancylondon*, *G. luteus*, *C. acoupa*, *L. purpureus* e *M. furnieri*).



Apesar de as amostras liofilizadas apresentarem valores iguais e abaixo de 3,00 (para *M. furnieri* versus *M. ancylondon* e *M. furnieri* versus *C. acoupa* respectivamente), seus valores estão dentro ou muito próximo do limite requerido.

Xiccato et al., 2004, avaliaram peixes em quatro sistemas de criação sobre amostras intactas, trituradas e liofilizadas, porém obteve melhores distâncias entre modelos obtidos de amostras trituradas e liofilizadas, com valor de maior distância

de 30,04 (em amostras liofilizadas) e menor distância de 1,9 (em amostras trituradas).

Uddin et al., 2005 avaliaram a discriminação entre peixes frescos e congelados-descongelados, utilizando 54 amostras frescas e 30 amostras congeladas-descongeladas, utilizando o intervalo de comprimento de onda de 400 a 1100 nm. PCA e SIMCA mostraram claramente a diferença entre os dois grupos, obtendo resultados satisfatórios.

O'Brien et al., 2013, utilizaram a espectroscopia no infravermelho próximo em filés intactos de quatro espécies de peixes com o intuito de investigar possíveis fraudes na comercialização de espécies parecidas, porém de qualidades distintas (alta qualidade e baixa qualidade), utilizando um espectrômetro portátil na faixa de comprimento de onda de 887 a 1667 nm e de baixo custo, e obtiveram maior sucesso quando aplicou SIMCA nos espectros coletados sobre a pele dos peixes. Pois, técnicas de reconhecimento de espécies usando DNA são bastante onerosas e demoradas, dificultando a fiscalização destes tipos de fraudes (O'BRIEN et al., 2013).

4.5 PREDIÇÃO NIR DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA

Para obtenção de um modelo de predição confiável da composição química das cinco espécies, um conjunto de pré-processamentos e combinações de pré-processamentos foram aplicados seguidos de modelos de regressão PLS e PCR.

A preferência entre PLS ou PCR não pode ser aconselhada de uma forma genérica, uma vez que ambos são em geral igualmente eficientes e as pequenas variações dependem de caso para caso (FERREIRA et al., 1999). Porém, a maioria dos trabalhos realizados para predição da composição química em peixes utiliza-se do modelo PLS (XICCATO et al., 2004; COZZOLINO et al., 2005; HUANG et al., 2003; KHODABUX et al., 2007).

Os resultados da calibração e validação cruzada para a previsão de composição química são apresentados na **Tabela 3**. O número de fatores utilizados como variáveis independentes foi fixado no máximo de 10, ou seja, igual a 10% do

numero de espectros utilizados na calibração, com o intuito de evitar auto ajustes (XICCATO et al., 2004).

Dentre os pré-processamentos avaliados, destacaram-se a correção do fator multiplicativo do sinal (MSC), primeira e segunda derivada utilizando filtro de Savitzky-Golay. Além disso, modelos de calibração também foram avaliados utilizando os dados brutos.

Tabela 3 - Estimativa dos coeficientes de determinação de calibração (R^2) e de validação cruzada (r^2), erro médio de calibração (RMSEC) e de predição para o conjunto de validação cruzada (RMSEP_{CV}) e desvio preditivo residual (RDP) avaliados utilizando os métodos de regressão de mínimos quadrados parciais (PLS) e de componentes principais (PCR) para prever a composição química dos filés sob três condições: filés frescos intactos, filés triturados e liofilizados.

Pré-processamento		PCR						PLS					
		Calibração			Predição			Calibração			Predição		
		PC	R ²	RMSEC	r ²	RMSEP _{CV}	RDP (SD/SEP)	Fator	R ²	RMSEC	r ²	RMSEP _{CV}	RDP (SD/SEP)
Filés frescos intactos													
Umidade	MSC ¹	7	0,63	1,04	0,57	1,12	1,56		0,66	1,00	0,56	1,14	1,49
Lipídios	+ 1 ^a derivada ²	4	0,64	3,11	0,60	3,37	1,57	7	0,77	2,53	0,59	3,40	1,55
Proteína bruta			0,58	3,37	0,53	3,59	1,45		0,76	2,56	0,59	3,35	1,55
Filés frescos triturados													
Umidade	1 ^a derivada ³	10	0,65	1,01	0,58	1,12	1,56	7	0,64	1,01	0,55	1,15	1,52
Lipídios			0,89	1,70	0,86	2,01	2,62		0,89	1,68	0,86	2,00	2,54
Proteína bruta			7	0,75	2,06	0,71	2,84	2,02	3	0,74	2,67	0,71	2,83
Filés triturados liofilizados													
Umidade	2 ^a derivada ⁴	10	0,65	1,01	0,54	1,16	1,50	10	0,68	0,96	0,58	1,11	1,40
Lipídios			0,96	1,03	0,95	1,14	4,61		0,97	0,96	0,96	1,09	4,82
Proteína bruta			9	0,88	1,78	0,86	1,96	2,66	0,89	1,70	0,86	1,96	2,66

1- Correção do fator multiplicativo do sinal (MSC) utilizando a função comum amplificada (*common amplification*); 2- Primeira derivada utilizando o filtro de Savitzky-Golay (3,3,7,2); 3- Primeira derivada utilizando o filtro de Savitzky-Golay (6,6,13,2); 4- Segunda derivada utilizando o filtro de Savitzky-Golay (6,6,13,2).

De acordo com os valores apresentados na **Tabela 3**, PCR e PLS não apresentaram diferenças expressivas quanto aos critérios de qualidade dos modelos. PLS envolveu um menor número de fatores na predição da composição química em amostras trituradas (3-7), enquanto que PCR envolveu um menor número de fatores para as amostras intactas (4-7). Porém, em amostras liofilizadas maior números de fatores são observados em PLS.

Nas amostras frescas intactas e frescas trituradas, PLS apresentou variação positiva para R2 e RDP, em contrapartida os resultados de r2 apresentam variação positiva em PCR. Porém, quando se avaliou amostras liofilizadas, PLS apresentou melhores valores tanto de R2 e r2 como de RDP.

Além disso, os valores de RMSEC, RMSEPCV se apresentaram mais elevados em PCR, principalmente para predição de proteína bruta dos filés frescos intactos fazendo com que este modelo se apresentasse menos eficiente que PLS.

Dentro do modelo PLS, observaram-se resultados parecidos de r2 em amostras de filés frescos intactos e frescos triturados e triturados liofilizados para água, um aumento significativo quanto aos valores de r2 para lipídios e proteína bruta.

O desvio preditivo residual (RDP), apresentado na **Tabela 3**, compara os dados calculados com dados de referência, apresentando boa previsão de calibração quando $\geq 2,5$ (FEARN, 2002). Salguero-Chaparro et al. (2013), por outro lado, afirmam que RDP entre 1,5 e 2,0 indica a possibilidade de distinguir entre valores altos e baixos, enquanto que um valor entre 2,0 e 2,5 torna valores quantitativos aproximados, para possíveis previsões, e um valor RDP entre 2,5 e 3,0 revela uma boa previsão desta calibragem.

RDP apresentaram-se melhores para lipídios, em amostras trituradas e liofilizadas, e para proteína bruta nas amostras liofilizadas. Valores de RDP para previsão de umidade apresentou-se baixo, entre 1,40 a 1,56.

Mesmo com a utilização de um espectrômetro operando na faixa de 1600 a 2400 nm neste estudo, bons valores de r^2 foram obtidos para proteína bruta em amostras trituradas e liofilizadas para os dois modelos de predição. Além disso, os melhores resultados de predição obtidos para os componentes químicos foram os de

lipídios, tanto em amostras intactas, como amostras trituradas e liofilizadas, utilizando os dois modelos (PCR e PLS).

Vogt et al. (2002), compararam quatro métodos de quantificação de lipídios, dentre eles o método utilizando NIR na faixa de comprimento de onda entre 1100 e 2498 nm, com o método referência (Soxhlet), obtendo excelentes resultados para NIR com R^2 de 0,90 e erro padrão de previsão de RMSEP: 0,80, os demais métodos como Torry Fatmeter, micro-ondas e fexIKA, apresentaram valores de R^2 0,71 , 0,90 e 0,71.

Além dos modelos PCR e PLS apresentados na **Tabela 3** que utilizou os 100 pontos ao longo da faixa de 1600 a 240 nm NIR do equipamento utilizado, também se realizou testes utilizando um número menor de variáveis escolhidas pela análise dos *loadings* a partir dos dados pré-processados, apresentados **Tabela 3**. 14 de 100 variáveis foram escolhidas por terem apresentado maiores picos de absorção nas regiões correspondentes aos grupos O-H de água, C-H de lipídios e N-H de proteínas no gráfico dos *loadings*. Neste, o modelo de regressão linear (MLR) também foi testado para compará-lo com PCR e PLS (**Tabela 4**).

Para as amostras intactas e trituradas, os modelos apresentaram valores de R^2 e r^2 parecidos ou inferiores que os apresentados na **Tabela 3** e, desta forma, não foram tabelados. Por outro lado, para as amostras liofilizadas, estes valores apresentaram-se parecidos ou superiores aos obtidos anteriormente na **Tabela 3** e estão reportados na **Tabela 4**.

Os comprimentos de onda selecionados para as amostras liofilizadas foram de 1656, 1725, 1852, 1861, 1927, 2050, 2106, 2114, 2169, 2231, 2247, 2254, 2307 e 2345 nm. Os números de fatores utilizados para PCR foram 10, 8 e 9 e para PLS 10, 8 e 8 para umidade, lipídios e proteína bruta respectivamente.

Tabela 4 - Estimativa dos coeficientes de determinação de calibração (R^2) e de validação cruzada (r^2) avaliados utilizando 14 variáveis para aplicação dos modelos de regressão de mínimos quadrados parciais (PLS) e de componentes principais (PCR), regressão linear múltipla (MLR) para prever a composição química de filés triturados liofilizados.

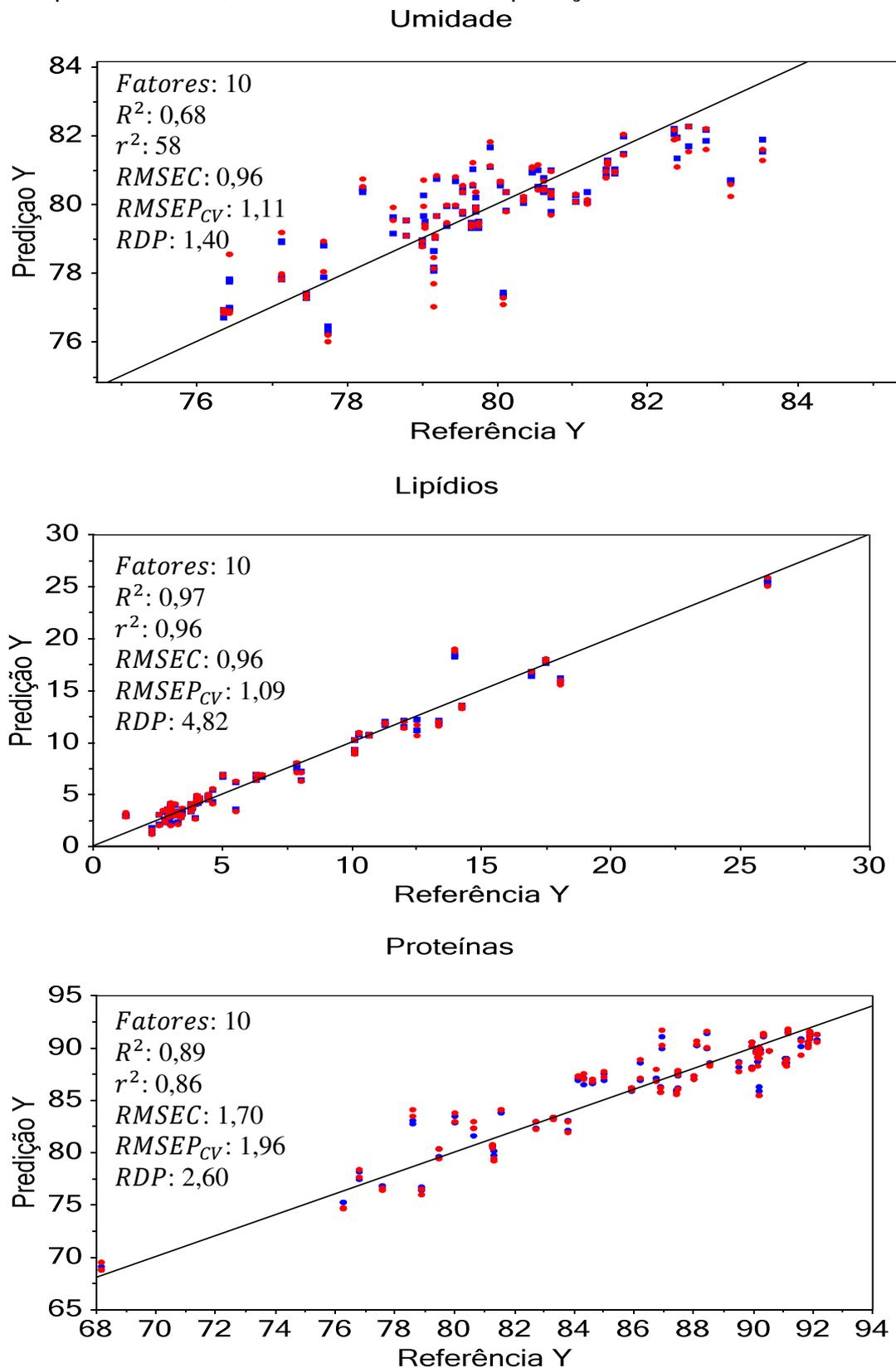
	MLR		PCR		PLS	
	R^2	r^2	R^2	r^2	R^2	r^2
Umidade	0,74	0,64	0,65	0,57	0,72	0,63
Lipídios	0,97	0,96	0,95	0,94	0,95	0,94
Proteína bruta	0,89	0,86	0,88	0,86	0,88	0,86

Quando se compara os valores obtidos da **Tabela 3** das amostras liofilizadas com os da **Tabela 4**, pode-se observar que apenas os coeficientes de determinação de umidade obtiveram melhores, coeficientes de determinação para lipídios e proteínas de PCR e PLS apresentaram-se um pouco abaixo, porém muito próximos das análises anteriores utilizando as 100 variáveis. Porém os valores obtidos por MLR foram maiores que os valores de PLS (**Tabela 4**), apresentando-se como um bom modelo para análises de amostras liofilizadas de peixes e, principalmente, por não necessitar de toda a faixa de comprimento de onda para a predição da composição química.

Vogt et al. (2002) também avaliaram a diferença entre análise completa NIR e utilizando apenas 6 dos 1.050 comprimentos de onda em que o equipamento utilizado operava (1680, 1940, 2100, 2180, 2230, 2310 nm), simulando a utilização de um equipamento portátil mais acessível, pois os equipamentos NIR de alta resolução são de alto custo limitando-se a laboratórios sofisticados. Estes autores obtiveram coeficiente de determinação (r^2) de 0,71 e erro padrão de predição (SEP) de 1,2 para lipídios, também se apresentando eficiente para predição da composição lipídica em peixes.

A **Figura 25** apresentam os gráficos referentes aos dados de predição versus dados de referência do teor de umidade, lipídios e proteína bruta das cinco espécies simultaneamente, utilizando o modelo de predição PLS.

Figura 25 - Dados NIR previstos versus dados de referência do teor de umidade, lipídios e proteína bruta, utilizando o modelo de predição PLS.



A **Tabela 5** compara os resultados da composição química obtidos pelo método AOAC e predição da composição química por NIR para o conjunto das cinco espécies.

Tabela 5 - Composição química obtida pelo método AOAC e por predição NIR de 50 peixes de cinco espécies (*G. luteus*, *L. purpureus*, *M. ancylondon*, *C. acoupa* e *M. furnieri*) oriundos da costa Amazônica.

	AOAC (2002)				NIR			
	Min	Máx	Média	DP	Min	Máx	Média	DP
<i>G. luteus</i> (n=10)								
Umidade (%)	77,75	83,11	80,21	1,53	76,38	81,26	79,83	1,45
Lipídios* (% M.S.)	1,30	14,02	5,09	3,63	1,48	18,30	5,81	4,75
Proteína bruta* (% M.S.)	78,92	91,89	87,70	3,98	86,01	91,27	88,47	1,96
<i>L. purpureus</i> (n= 10)								
Umidade (%)	77,75	82,40	80,22	1,41	79,76	81,63	80,51	0,57
Lipídios* (% M.S.)	2,75	3,84	3,14	0,31	2,70	3,72	3,16	0,29
Proteína bruta* (% M.S.)	88,12	91,93	90,34	1,02	88,09	91,23	89,95	0,91
<i>M. ancylondon</i> (n= 10)								
Umidade (%)	78,62	83,54	81,18	1,74	78,36	82,11	80,87	1,29
Lipídios* (% M.S.)	2,80	26,07	8,30	7,81	2,37	25,47	8,38	7,67
Proteína bruta* (% M.S.)	68,18	90,21	82,78	6,46	68,93	87,61	82,74	6,22
<i>C. acoupa</i> (n= 10)								
Umidade (%)	77,47	80,12	79,10	0,88	77,34	81,37	79,50	1,13
Lipídios* (%M.S.)	2,55	13,36	6,08	3,87	2,51	11,90	5,72	3,56
Proteína bruta* (%M.S.)	82,73	92,15	88,21	3,13	82,56	91,56	88,03	3,28
<i>M. furnieri</i> (n=10)								
Umidade (%)	76,37	80,73	78,21	1,68	76,82	80,69	78,47	1,29
Lipídios* (%M.S.)	4,03	18,10	11,13	4,67	4,45	16,54	10,67	4,10
Proteína bruta* (%M.S.)	76,84	89,55	81,16	3,74	76,76	88,39	82,16	3,66
Todas as amostras (n=50)								
Umidade (%)	76,37	83,54	79,78	1,76	76,38	82,11	79,83	1,42
Lipídios* (%M.S.)	1,30	26,07	6,75	5,30	1,48	25,47	6,75	5,20
Proteína bruta* (%M.S.)	68,18	92,15	86,04	5,24	68,93	91,56	86,04	4,94

* Analisados em g/100g de matéria seca (M.S.).

Valores estimados por NIR apresentaram-se muito próximos aos valores obtidos pelos métodos da AOAC, seja para o conjunto de cada espécie, como para

todo o conjunto de amostras. Isto aconteceu até mesmo para a estimativa do teor de umidade, a qual se mostrou com o menor valor do coeficiente de determinação de validação cruzada (r^2 : 0,58).

Excelentes resultados foram encontrados em literaturas utilizando a faixa de comprimento de onda de entre 1100 a 2500 nm, como por exemplo, Cozzolino et al., (2002a), que analisaram 1010 amostras de farinha de peixe e obtiveram R^2 :0,93 para umidade, R^2 :0,85 para proteína bruta, R^2 : 0,92 para lipídios, utilizando 3, 8, e 8 fatores para umidade, proteína bruta e lipídios respectivamente. Em outro trabalho, Cozzolino et al. (2002b) obtiveram para peixe fresco moído valor de R^2 :0,99 para umidade, de R^2 :0,96 para óleo e R^2 :0,96 para proteína bruta.

Assim como Cozzolino et al. (2002b), Khodabux et al (2007), obtiveram resultados parecidos na faixa de comprimento de onda de 900 -2300 nm em peixes descongelados, e obteve alta correlação com valores de R^2 : 0,98 para umidade, R^2 : 0,99 para proteína bruta e R^2 : 0,95 para teor de lipídios.

Xiccato et al. (2004) avaliaram filés frescos intactos dividindo em pequenas porções circulares, e obteve valores diferentes para cada porção (**a**, **b** e **c**) do filé analisado, obtendo nas partes intactas r^2 de 0,47 a 0,77 para umidade, r^2 de 0,49 a 0,69 para lipídios e $r^2 < 0,30$ para proteína bruta. Após a moagem juntamente das três porções, obteve melhores resultados, obtendo valores de coeficiente de determinação para umidade de r^2 : 0,95, para lipídios de r^2 : 0,97 e proteína bruta com r^2 : 0,30; enquanto nas porções liofilizadas obtiveram r^2 : 0,97 para umidade, r^2 : 0,97 para lipídios e r^2 : 0,68 para proteína bruta.

Roza-Delgado, et al. (2014), que também utilizaram um espectrômetro portátil operando na faixa de 1600 a 2400 nm para a previsão de características de qualidade de carne de porco intacta, obtiveram R^2 de 0,67 e r^2 de 0,58 para o teor de umidade e R^2 : 0,63 e r^2 : 0,53 para gordura intramuscular. Outros parâmetros como luminosidade, avaliação da cor vermelha, amarela, textura e pH também foram avaliadas, obtendo r^2 : 0,74, 0,60, 0,59, 0,48 e 0,55 respectivamente.

Além de Roza-Delgado, et al. (2014), outros trabalhos também foram realizados utilizando um equipamento portátil operando na faixa de 1600 a 2400 nm para a previsão de parâmetros de qualidade em vegetais como olivas (SALGUERO-

CHAPARRO et al., 2013), nectarinas (SÁNCHEZ et al., 2011) e mandarins (SÁNCHEZ et al., 2013).

As análises espectroscópicas para a predição da composição química em peixes não são recentes (MATHIAS et al 1987), e determinações de umidade, proteínas, lipídios (XICCATO et al., 2004; COZZOLINO et al., 2005; KHODABUX et al., 2007), ácidos graxos livres (COZZOLINO et al., 2005), sal (HUANG et al., 2003; COZZOLINO et al., 2002a), cinzas (COZZOLINO et al., 2002a) dentre outras são comumente e simultaneamente avaliadas a fim de obter resultados rápidos e seguros, os quais levariam horas para serem realizados pelos métodos tradicionais.

Apesar de que a maior parte das pesquisas realizadas utilizam espectrômetros na faixa de comprimento de onda de 1100 a 2500 nm (COZZOLINO et al., 2002a, COZZOLINO et al., 2002b, COZZOLINO et al., 2005, XICCATO et al., 2004; VOGT et al., 2002, UDDIN et al, 2002), bons resultados de predição e discriminação podem ser encontrados utilizando uma faixa de comprimento de ondas menor, não necessitando de equipamentos NIR altamente sofisticados com extensa faixa de comprimento de onda (VOGT et al., 2002).

5 CONCLUSÃO

A espectroscopia de infravermelho próximo utilizando um espectrofotômetro portátil com faixa mais curta de comprimento de onda mostrou-se satisfatória, tanto para a discriminação das espécies quanto para a predição das concentrações dos constituintes majoritários do pescado, principalmente lipídios e proteínas.

Para as análises exploratórias através de PCA, destacaram as espécies, de *G. luteus* e *L. purpureus*, porém quando se aplicou o método de discriminação SIMCA, praticamente todas as espécies apresentaram valores de distanciamento acima do limite requerido, exceto para amostras frescas trituradas.

Para as análises preditivas, PLS apresentou-se como melhor modelo para as amostras sob os três tratamentos. Os valores estimados por NIR apresentaram-se muito próximos aos valores obtidos pelos métodos de referência, seja para o conjunto de cada espécie, como para todo o conjunto de amostras. Isto aconteceu até mesmo para a estimativa do teor de umidade, a qual se mostrou com o menor valor do coeficiente de determinação de validação cruzada.

As Análises preditivas assim como as discriminativas realizadas sobre as amostras liofilizadas foram as que apresentaram os melhores resultados, quando comparadas as amostras frescas intactas e trituradas.

REFERÊNCIAS

ALLEN G. R. FAO SPECIES CATALOGUE: **Snappers of the world**. Vol. 6. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome 6: 208, 1985.

ALMEIDA, Z. S.; NUNES, J. L.S.; ALVES, M. G. F. S. Dieta alimentar de *Genyatremus luteus* (BLOCH, 1790) - (Teleostei, Perciformes: Haemulidae) na Baía de São José, Maranhão, Brasil. **Atlântica**, Rio Grande. vol. 27, n. 1, p. 39-47, 2005.

ANDO, R. A; **Espectroscopia vibracional, Raman ressonante e eletrônica de nitroderivados em sistemas conjugados**. São Paulo-SP, Brasil, 137p. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paul-USP, 2005.

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemistry**. 17thed. Washington. AOAC. 2002.

ARTIGAS, L. F.; VENDEVILLE, P.; LEOPOLD., M.; GUIRAL, D.; TERNON, J. Marine biodiversity in French Guiana: estuarine, coastal, and shelf ecosystems under the influence of Amazonian waters. **Gayana (Concepción)**. vol. 67, n. 2, p. 302-326, 2003.

BARANSKA, M.; SCHULZ, H.; STREHLE, M.; POPP, J. Applications of Vibrational Spectroscopy to Oilseeds Analysis. In. **Applications of Vibrational Spectroscopy in Food Science**. Edited by Eunice Li-Chan, Peter R. Griffiths and John M. Chalmers, 2010.

BARLETTA, M., BARLETTA-BERGAN, A.; SAINT-PAUL, U. Description of the fisheries structure in the mangrove-dominated region of Bragança (State of Pará, North Brasil). **Ecotropica**, 4: 41-53, 1998.

BARLETTA-BERGAN, A.; BARLETTA, M.; SAINT-PAUL, U. Structure and Seasonal Dynamics of Larval Fish in the Caete´ River Estuary in North Brazil. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, Londres, 54: 193–206, 2002.

BARNES, R.J.; DHANOA, M.S.; LISTER, S.J. Correction of the description of Standard Normal Variate (SNV) and De-Trend transformations in Practical Spectroscopy with Applications in Food and Beverage Analysis, 2nd. Edition, **Journal of Near Infrared Spectroscopy**. vol. 1, 185-186, 1993.

BEEB, K.R., PELL, R.J., SEASHOLTZ, M.B., **Chemometrics: A Practical Guide**. John Wiley & Sons, New York, 1998.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method for total lipid extraction and purification. **Canadian journal of biochemistry and physiology**. 37.911-917, 1959.

BRERETON, R. G. **Chemometrics for pattern recognition**, Wiley. Chichester, 2009.

BRUICE, P. Y. **Química Orgânica**. 4 ed. São Paulo. Pearson/Prentice Hall, 2006.

BÜNING -PFAUE, H. A revolution in analysis. **New Food**, 7(3), 41–47, 2004.

BUSSAD, W. O.; MIAZAKI, E. S.; ANDRADE, D. F. Introdução à análise de agrupamentos. In: **Simpósio Nacional de Probabilidade e Estatística**, 9., São Paulo, 105 p, 1990.

CAMO ASA. **The Unscrambler Software 10.1**, trial edn, 2011.

CARVALHO-FILHO, A. **Peixes da costa brasileira**. 3ª ed. São Paulo: Editora Melro. 320, 1999.

CERVIGÓN, F. **Los peces marinos de Venezuela**. vol. 4. 2ª ed. Venezuela, Caracas: Fundación Científica los Roques. 254p, 1996.

COZZOLINO, D. **Visible and near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) of flesh foods**. Ph.D. thesis, University of Aberdeen, Aberdeen, 1998.

COZZOLINO, D.; CHREE, A.; MURRAY, I.; SCAIFE, J. R. The assessment of the chemical composition of fishmeal by near infrared reflectance spectroscopy. **Aquaculture Nutrition**, 8; 149-155, 2002a.

COZZOLINO, D.; MURRAY, I.; CHREE, A.; SCAIFE, J. R. Multivariate determination of free fatty acids and moisture in fish oils by partial least-squares regression and near-infrared spectroscopy. **LWT – Food Science and Technology**, 38, 821–828, 2005.

COZZOLINO, D.; MURRAY, I.; SCAIFE, J. R. Near infrared reflectance spectroscopy en the prediction of chemical characteristics of minced raw fish. **Aquaculture Nutrition**, 1-6, 2002b.

DYER, J. R. **Aplicações da espectroscopia de absorção aos compostos orgânicos**. São Paulo. Edgard Blücher, 155 p, 1969.

ESBENSEN, K. **Multivariate Data Analysis - In Practice**, 5th ed, CAMO Process AS, Oslo, 2002

FEARN, T. **Assessing calibrations: SEP, RPD, RER and R²**. NIR News, 13, 12–14, 2002.

FERNÁNDEZ-CABANÁS, V. M.; POLVILLO, O.; RODRÍGUEZ-ACUÑA, R., BOTELLA, B.; HORCADA, A. Rapid determination of the fatty acid profile in pork dry-cured sausages by NIR spectroscopy. **Food Chemistry**. 124, 373–378, 2011.

FERREIRA, M. M. C.; ANTUNES, A. M.; MELGO, M. S.; VOLPE, P. L. O. Quimiometria I. calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**, São Paulo, vol. 22, n. 5, 1999.

GELADI, P.; KOWALSKI, B. R.; Partial least-squares regression: A tutorial. **Analytica Chimica Acta**, 185, 1, 1986.

GELADI, P.; MACDOUGALL D.; MARTENS, H. Linearization and scatter-correction for NIR reflectance spectra of meat. **Applied Spectroscopy**. 39, 491-500, 1985.

GIARRIZZO, T; KRUMME, U. Spatial differences and seasonal cyclicity in the intertidal fish fauna from four mangrove creeks in a salinity zone of the Curuçá estuary, North Brazil. **Bulletin of Marine Science** n. 80, p. 739-754, 2007.

HAIR, J. F.; BLACK, W. C; BABIN, B. J.; ANDERSON R. E.; TATHAM, R. L. **Análise multivariada de dados**. 6ª ed. Tradução Adonai Schlup Sant'Anna. Prentice-Hall. Upper Saddle River, New Jersey, 730p. 2009.

HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. **Princípios de Análise Instrumental**. Bookman. 6. ed. Porto Alegre. 2009.

HUANG, Y.; CAVINATO, A. G.; MAYES, D. M.; KANGAS, L. J.; BLEDSOE, G. E.; RASCO, B. A. Nondestructive determination of moisture and sodium chloride in cured atlantic salmon (*Salmo salar*) (Teijin) using short-wavelength near-infrared spectroscopy (SW-NIR). **Journal of Food Science**. 68, 482–486, 2003.

JACKSON, J.E., **A Users Guide to Principal Components**, Wiley & Sons Inc., New York, 1991.

KHODABUX, K.; L'OMELETTE, M. S. S.; JHAUMEER-LAULLOO, S.; RAMASAMI; P; RONDEAU, P. Chemical and near-infrared determination of moisture, fat and protein in tuna fishes. **Food Chemistry**, 102, 669–675, 2007.

KNIGHT, R. D., **FÍSICA: Uma abordagem estratégica** – vol. 1 e 2, 2ª ed, editora Bookman, 2009.

LEE, M. H.; CAVINATO, A. G.; MAYES, D. M.; RASCO, B. A. Noninvasive short-wavelength near-infrared spectroscopic method to estimate the crude lipid content in the muscle of intact rainbow trout. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 40, 2176–2181, 1992.

LIN, M.; CAVINATO, A. G.; HUANG, Y.; RASCO, B. A. Predicting sodium chloride content in commercial king (*Oncorhynchus tshawytscha*) and chum (*O. Keta*) hot smoked salmon fillet portions by short wavelength near-infrared (SW-NIR) spectroscopy. **Food Research International**, 36, 761–766, 2003.

MASSART D. L.; VANDEGINSTE, B. G. M.; DEMING, S. N.; MICHOTTE Y.; KAUFMAN L.. **Chemometrics: a textbook. Amsterdam Oxford**, New York - Tokyo, Elsevier. vol. 2, Sixth impression, 2005.

MATHIAS, J. A.; WILLIAMS, P. C.; SOBERING, D. C. The determination of lipid and protein in freshwater fish using near-infrared reflectance spectroscopy. **Aquaculture**, 61: 303-311, 1987

MATOS, I. P.; LUCENA, F. Descrição da pesca da pescada amarela *Cynoscion acoupa* da costa do Pará. **Arquivos de Ciência do Mar**, Fortaleza, 39: 66-73, 2006.

MENEZES, N. A.; FIGUEIREDO, J. L. **Manual de peixes do Sudeste do Brasil**, São Paulo, 96 p.,1980.

MILLER, C. H. E. Chemistry principles of near infrared technology. In Williams, P. C., & Norris, K. H. (Eds.), *Near infrared technology in the Agricultural and Food Industries* (pp. 19–37). USA. **American Association of Cereal Chemist**, 2001.

MURRAY, I. The NIR spectra of homologous series of organic compounds. In Hollo, J., Kaffka, K. J., & Gonczy, J. L. (Eds.), **Proceedings international NIR/NIT conference** (pp. 13–28). Budapest. Akademiai Kiado,. 1986.

NAES, T.; ISAKSON T.; FEARN, T; DAVIES T.A User-friendly Guide to Multivariate Calibration and Classification. **NIR Publications**, 2002.

NIELSEN, S. S. **Food analysis**. Fourth edition. Springer. 2010.

NUNES, Pedro Germano Antonino. Uma nova técnica para seleção de variáveis em calibração multivariada aplicada às espectrometrias uv-vis e nir. **Tese de doutorado**. Universidade Federal da Paraíba. Programa de pós graduação em Química. João Pessoa – PB – Brasil, 2008.

O'BRIEN, N.; HULSE, C. A.; PFEIFER F.; SIESLER H. W.; Near infrared spectroscopic authentication of seafood **Journal of Near Infrared Spectroscopy**. 21, 299–305, 2013.

OSBORNE, B. G.; FEARN, T., P; HINDLE, H. *Practical NIR Spectroscopy with Applications in Food and Beverage Analysis*, 2nd ed., **Longman Scientific & Technical**, 227 pp, 1993.

OTTO, M. **Chemometrics: Statistics and Computer Application in Analytical Chemistry** (2nd ed.). Wiley-VCH. 2007.

PAIVA, M. P. **Recursos Pesqueiros Estuarinos e Marinhos do Brasil**. Fortaleza, UFC Edições, Fortaleza, 278 p. 1997.

PASQUINI, C. Near Infrared Spectroscopy: Fundamentals, Practical Aspects and Analytical Applications. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, vol. 14, No. 2, 198-219, 2003

PIORSKI, N. M.; MARANHÃO, F. R. C. L.; ROCHA, R. M. V.; NUNES, J. L. S. Análise da Estratégia Alimentar de *Macrodon Ancylodon* (Bloch and Schneider, 1801) - (Perciformes: Sciaenidae) de um estuário do Litoral Ocidental do Maranhão - Brasil. **Boletim do Laboratório de Hidrobiologia**, 17: 49-52, 2004.

PLA, M.; HERNÁNDEZ, P.; ARIÑO, B., RAMÍREZ, J. A.; DÍAZ, I. Prediction of fatty acid content in rabbit meat and discrimination between conventional and organic production systems by NIRS methodology. **Food Chemistry**, 100, 165–170, 2007.

ROZA-DELGADO, B. DE LA; SOLDADO, A.; OLIVEIRA, A. F. G. de F.; MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ, A.; ARGAMENTERÍA, A. Assessing the Value of a Portable Near Infrared Spectroscopy Sensor for Predicting Pork Meat Quality Traits of “Asturcelta Autochthonous Swine Breed”. **Food Analysis Methods**. 7:151–156, 2014.

SALA, O. **Fundamentos da espectroscopia Raman e no Infravermelho**. Editora Unesp, São Paulo. 1995.

SALGUERO-CHAPARRO, L.; BAETEN, V.; FERNÁNDEZ-PIERNA, J. A.; PEÑA-RODRÍGUEZ, F. Near infrared spectroscopy (NIRS) for on-line determination of quality parameters in intact olives. **Food Chemistry**. 139, 1121–1126, 2013.

SÁNCHEZ, M. T.; LA HABA, M. J. de; MARÍN, D. P. Internal and external quality assessment of mandarins on-tree and at harvest using a portable NIR spectrophotometer. **Computers and Electronics in Agriculture**. 92, 66–74. 2013.

SÁNCHEZ, M-T.; HABA, M-J. de La; GUERRERO, J-E.; GARRIDO-VARO A.; PÉREZ-MARÍN D. Testing of a local approach for the prediction of quality parameters in intact nectarines using a portable NIRS instrument. **Postharvest Biology and Technology**. 60, 130–135, 2011.

SAVITZKY, A.; GOLAY, M. J. E. Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures. **Analytical Chemistry**, 36: 1627, 1964.

SILVA, E.M; PINTO, S. M; LARONDELLE, N; ROGEZ, H. Fatty and amino acid and minerals profiles in muscle of light fishes from the Brazilian Amazonian coast. **Food Chemistry**, 2013.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. Rio de Janeiro. Livros Técnicos e Científicos, c 2006. xiv, 490 p.

SJÖBLOM, J., SVENSSON, O., JOSEFSON, M., KULLBERG, H., WOLD, S., An evaluation of orthogonal signal correction applied to calibration transfer of near

infrared spectra, **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, 44, 51-61, 1998.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. "**Principles of Instrumental Analysis**", 5th Edition, Saunders College Publishing. Harcourt Brace College Publishers, p;725-750,840-848, 2005.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Química orgânica**. Rio de Janeiro. Livros Técnicos e Científicos, vol. 1, 2009.

STUART, B. H. Infrared Spectroscopy: **Fundamentals and applications**. Joh Wiley & Sons, New York, USA, 2004.

SZPILMAN, M. Peixes Marinhos do Brasil: **Guia Prático de Identificação**. Rio de Janeiro, 288 p, 2000.

TAVARES, M. C. S.; JÚNIOR, I. F.; SOUZA, R. A. L.; BRITO, C. S. F. A pesca de curral no Estado do Pará. **Boletim Técnico-científico do Cepnor**, Belém. vol. 5, n. 1, p. 115-139, 2005.

UDDIN, M.; ISHIZAKI, S.; OKAZAKI, E.; TANAKA, M. Near-infrared reflectance spectroscopy for determining end-point temperature of heated fish and shellfish meats. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 82: 286-292, 2002.

UDDIN, M.; OKAZAKI, E. Applications of Vibrational Spectroscopy to the Analysis of Fish and Other Aquatic Food Products. In. **Applications of Vibrational Spectroscopy in Food Science**. Edited by Eunice Li-Chan, Peter R. Griffiths and John M. Chalmers, 2010.

UDDIN, M.; OKAZAKI, E.; TURZA, S.; YUMIKO, Y.; TANAKA, M.; FUKUDA, Y. Non-destructive Visible/NIR Spectroscopy for Differentiation of Fresh and Frozen-thawed Fish. **Journal of food science**, vol. 70, Nr. 8, 2005

VALENTINI, H.; CASTRO, P. M. G. de; SERVO, G. J. M; CASTRO, L. A. B de. Evolução da pesca das principais espécies demersais da costa sudeste do Brasil, pela frota de arrasteiros de parelha baseada em São Paulo de 1968 a 1987. **Atlântica**, Rio Grande, 13(1):87-96.

NELSON, J.S. **Fishes of the World**, 4th ed. John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, pp. 622, 1991, 2006

VARMUZA, KURT e FILZMOSE, PETER. **Introduction to multivariate statistical analysis in chemometrics**. New York . CRC Press/Taylor & Francis Group, 2009.

VOGT, A.; GORMLEY, T. R.; DOWNEY, G.; SOMERS, J.A comparison of selected rapid methods for fat measurements in fresh herring (*Clupea harengus*). **Journal of Food Composition and Analysis**, 15, 205–215, 2002.

VOLLHARDT, K. P. C.; SCHORE, N. E. **Química orgânica**. estrutura e função. Porto Alegre. Bookman, 1112 p. 2004.

WOLFF, M.; KOCH, V.; ISAAC, V. A Trophic Flow Model of the Caeté Mangrove Estuary (North Brazil) with Considerations for the Sustainable Use of its Resources Estuarine, **Coastal and Shelf Science**. n. 50, p. 789-803, 2000.

FURTADO-NETO, M.; LOTUFO, T. M. C.; MARINHO, R. A.; FEITOSA, R. D.; BATISTA, W. F.; RIBEIRO, C.; CERQUEIRA, C.; OSÓRIO, F.; RUY, F. **Ictiofauna dos Estuários do Estado do Ceará**. ZEE da Zona Costeira. UFC - SOMA - SEMACE – LABOMAR. 200 p, 2005.

WORKMAN JR. J. WEYER, L. **Practical guide and spectral atlas for interpretative near infrared spectroscopy**. Second edition. CRC PRESS. 2012.

XICCATO, G.; TROCINO, A.; TULLI, F.; TIBALDI, E. Prediction of chemical composition and origin identification of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) by near infrared reflectance spectroscopy (NIRS). **Food Chemistry** 86, 275–281, 2004.

YÜDEL, Y.; DEMIR, C. Principal component analysis and cluster analysis for the characterization of marbles by capillary electrophoresis. **Talanta**, 63, 451. 2004.