

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DIRETORIA DE GRADUAÇÃO E EDUCAÇÃO PROFISSIONAL
COORDENAÇÃO DO CURSO DE TECNOLOGIA EM PROCESSOS QUÍMICOS

ALEX JUNIOR DE OLIVEIRA SANTOS

**DESENVOLVIMENTO DE MODELO DE CALIBRAÇÃO
MULTIVARIADA POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO
PRÓXIMO PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE
EM HIDROLISADOS DE PEIXE**

TRABALHO DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

TOLEDO
2019

ALEX JUNIOR DE OLIVEIRA SANTOS

**DESENVOLVIMENTO DE MODELO DE CALIBRAÇÃO
MULTIVARIADA POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO
PRÓXIMO PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE
EM HIDROLISADOS DE PEIXE**

Trabalho de conclusão de Curso apresentado a Coordenação do Curso Superior de Tecnologia em Processos Químicos – COPEQ – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR *Campus* Toledo, como requisito parcial para obtenção do título de Tecnólogo em Processos Químicos.

Orientador: Prof. Dr. Clayton Antunes Martin

TOLEDO
2019

**TERMO DE APROVAÇÃO
DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

ALEX JUNIOR DE OLIVEIRA SANTOS

**DESENVOLVIMENTO DE MODELO DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA POR
ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO PARA DETERMINAÇÃO
DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM HIDROLISADOS DE PEIXE**

Trabalho apresentado como forma de avaliação de Trabalho de Conclusão de Curso II do curso de Tecnologia em Processos Químicos da UTFPR, *Campus* Toledo, e aprovado pela banca examinadora abaixo.

Prof. Dr. Clayton Antunes Martin

Profa. Dra. Solange Maria Cottica

Profa. Me. Daieni Alves Vieira Amado

Toledo, Junho de 2019

Dedicatória...

“Dedico a Deus por sempre estar ao meu lado nos momentos mais difíceis desse trabalho”.

“A todos os meus professores da graduação, e iniciação científica que foram de fundamental importância na construção deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Clayton Antunes Martin, pela sua paciência conselhos e ensinamentos que foram essenciais para o desenvolvimento do TCC.

Dedico este projeto à minha família e amigos que sempre estiveram presentes direta ou indiretamente em todos os momentos de minha formação.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente e imensamente a Deus, pela minha vida e todas graças alcançadas em minha vida.

Ao meu professor orientador, Prof. Dr. Clayton Antunes Martin pela orientação, por todos os ensinamentos pessoais e profissionais, por ter me recebido e acreditado e pelo seu belo exemplo de Amor a profissão.

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná Campus Toledo, por suas instalações e pelo corpo docente que contribuiu para a minha formação acadêmica.

Aos professores que me auxiliaram na elaboração do projeto Profa. Dra. Solange Maria Cottica, Ortência.L.G.S. Nunes.

Ao laboratório Multiusuário da UTFPR campus Toledo, por ceder o espaço e equipamentos para a realização das análises.

À minha família e, em especial aos meus pais Paulo e Roseli Santos por terem me concedido a vida, por todos ensinamentos e amor que foram essenciais para construir meu caráter e minha história.

À minha esposa Franciele por ter me ajudado a superarmos os momentos difíceis juntos e ainda ter me dado o melhor presente da minha vida meu filho Heitor.

Enfim a todos que participaram direto e indiretamente durante toda essa caminhada.

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

AA	Atividade antioxidante
DPPH	2,2- difenil-1-picril-hidrazil
FRAP	Ferric Reducing Ability Power - Poder antioxidante de redução do ferro
NIR	Near Infrared – Infravermelho Próximo
PLS	Partial least squares – Mínimos Quadrados Parciais
PRESS	Soma dos quadrados do erro de previsão
RMSECV	Root Mean Square Error of Cross Validation - Raiz quadrada do erro médio quadrático de validação cruzada
RMSEP	Root Mean Square Error of Prediction - Erro Quadrático Médio da Raiz de Validação Cruzada
KS	Kennard-Stone

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Tipos de vibrações moleculares	19
Figura 2- Princípio ótico do analisador infravermelho próximo	20
Figura 3- Representação procedimento calibração multivariada espectral utilizada em espectroscopia e cromatografia.	22
Figura 4- Representação matriz organizacional amostras e respostas.	22
Figura 5- Gráfico análise por segmento	34
Figura 6- Gráfico resíduos studentizados versus leverage primeira exclusão <i>outliers</i>	36
Figura 7- Gráfico preditos versus medidos para o modelo por segmentações para o método DPPH.	37
Figura 8- Resíduos studentizados versus leverage do modelo PLS, no intervalo espectral selecionado, para o conjunto de calibração	39
Figura 9- Gráfico preditos versus medidos para o modelo Global para o método FRAP intervalo selecionado 1650-950 nm	40
Figura 10- Gráfico análise por segmento.	41
Figura 11- Resíduos studentizados versus leverage do modelo PLS, no intervalo espectral selecionado, para o conjunto de calibração primeiras amostras excluídas.	43
Figura 12-Resíduos studentizados versus <i>leverage</i> do modelo PLS, no intervalo espectral selecionado, para o conjunto de calibração final.	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Regiões do espectro de infravermelho	18
Tabela 2- Valor médios da capacidade antioxidante para a metodologia da captura de radicais livres pelo DPPH, para os ensaios de hidrólise após 60 minutos de reação com enzima Alcalase®	31
Tabela 3- Valores médios de capacidade antioxidante para o método FRAP (Ferric Reducing Ability Power), para os ensaios de hidrólise após 60 minutos de reação com enzima Alcalase®	32
Tabela 4- Modelo inicial e modelos obtidos após a exclusão de <i>outliers</i> para todo intervalo espectral, com o método DPPH	33
Tabela 5- Modelo inicial e modelos obtidos após a exclusão de <i>outliers</i> para o intervalo espectral selecionado, com o método DPPH	35
Tabela 6- Modelo inicial e modelos obtidos após a exclusão de <i>outliers</i> para todo intervalo espectral, com o método FRAP	38
Tabela 7 – Modelo inicial e modelos obtidos após a exclusão de <i>outliers</i> para o intervalo espectral selecionado, com o método FRAP	42

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. OBJETIVO GERAL.....	14
1.2. Objetivos específicos.....	14
1.3. JUSTIFICATIVA	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1. Antioxidantes.....	15
2.1.1. Antioxidantes sintéticos	15
2.1.2. Antioxidantes naturais.....	16
2.2. Hidrolisados.....	16
2.3. ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO.....	17
2.3.1. Histórico e aplicações.....	17
2.3.2. Princípios	18
2.3.3. Princípio ótico dos analisadores de matriz de diodo.....	20
2.4. TÉCNICAS DE ANÁLISE MULTIVARIADA.....	21
2.4.1. Calibração multivariada	21
2.4.2. Algoritmo Kennard-Stone.....	23
2.4.3. Avaliação de <i>Outliers</i>	23
2.4.4. Métodos de regressão multivariada.....	25
2.4.5. Regressão por mínimos quadrados parciais (PLS)	25
2.4.6. Seleção do número de variáveis latentes	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
3.1. Obtenção das amostras	27
3.2. Capacidade antioxidante dos hidrolisados de peixe.....	27
3.3. Obtenção dos espectros.....	28
3.4. Divisão das amostras em conjuntos de calibração e validação.....	29
3.5. Obtenção dos modelos pelo método dos mínimos quadrados parciais PLS...29	
3.6. Avaliação de <i>Outliers</i> para os conjuntos de calibração e validação	30
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1. Atividade antioxidante	31

4.2. Atividade antioxidante pelo método FRAP (Ferric Reducing Ability Power)	32
4.3. Modelo global de calibração multivariada para o método DPPH.....	33
4.4. Modelo selecionado de calibração multivariada para o método DPPH	34
4.5. Modelo global de calibração multivariada para o método FRAP	37
4.6. Resultados análise de calibração multivariada para o modelo por segmentações para os resultados do método FRAP	40
5. CONCLUSÃO	44
6. REFERÊNCIAS.....	45

RESUMO

SANTOS, ALEX.JUNIOR. OLIVEIRA. **DESENVOLVIMENTO DE MODELO DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM HIDROLISADOS DE PEIXE.** 2019. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso Superior de Tecnologia em Processos Químicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR.

O tema deste trabalho foi o desenvolvimento de modelo de calibração multivariada com auxílio de espectroscopia no infravermelho próximo para determinação de antioxidantes em hidrolisados de peixe. Avaliaram-se as atividades antioxidantes em hidrolisados de peixe obtidos das aparas de cortes em “V” de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), por meio das metodologias de DPPH e FRAP. Foram desenvolvidos modelos de calibração multivariada, empregando a espectroscopia no infravermelho próximo e a regressão por mínimos quadrados parciais, para a determinação da atividade antioxidante a partir do espectro no infravermelho. A melhor condição encontrada para o método DPPH resultou na atividade antioxidante de 3,41 mg EAG g⁻¹ extrato, (pH 9,5; 0,25% p p⁻¹ enzima; 75°C). Para o método FRAP os maiores valores de atividade antioxidante encontrados foram 38,65 μmol de Fe (II) g⁻¹ de extrato (pH 9,5; 0,25 % p p⁻¹; 75°C) e 36,80 μmol de Fe (II) g⁻¹ de extrato (pH 8,5; 0,15% p p⁻¹; 65°C). Foram obtidos os espectros no infravermelho na região de 750 a 1650 nm, para 102 amostras de hidrolisados de peixe. Este conjunto de amostras foi separado em conjunto de calibração (n = 82) e validação (n =20). A partir dos espectros das amostras do conjunto de calibração e de suas respectivas concentrações de atividade antioxidante foram construídos modelos de calibração multivariada. O modelo global para o método DPPH apresentou 11 *outliers*, que após a exclusão apresentou os valores de 0,623 para a RMSECV e 0,793 para o coeficiente de correlação, tendo 10 variáveis latentes. Para o modelo obtido a partir de segmentações do espectro foram observados 11 *outliers*. Após a exclusão destas amostras o modelo final apresentou o coeficiente de correlação de 0,800 e o valor de 0,556 para a RMSECV. O modelo global para o método FRAP apresentou um RMSECV de 4,417, *R* 0,914 e 9 variáveis latentes. Para o modelo obtido a partir de segmentações foi obtido um RMSECV de 5,010 e *R* 0,897 e 8 variáveis latentes. Em geral, os modelos construídos para o método FRAP (Global e segmentado) se mostraram mais promissores em relação aos modelos para o método DPPH.

Palavras chave: Quimiometria, mínimos quadrados parciais, piscicultura.

ABSTRACT

SANTOS, ALEX.JUNIOR. OLIVEIRA. **DEVELOPMENT OF MULTIVARIATE CALIBRATION MODEL BY SPECTROSCOPY IN NEAR INFRARED FOR DETERMINATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY IN FISH HYDROLYSIS.** 2019. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso Superior de Tecnologia em Processos Químicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR.

The purpose of this study was the development of a multivariate calibration model with near-infrared spectroscopy to determine antioxidants in fish hydrolysates. Determination of antioxidant activity in fish hydrolysates obtained from Nile tilapia "V" cuttings (*Oreochromis niloticus*) was by DPPH and FRAP methods. Multivariate calibration models were developed using near-infrared spectroscopy and partial least squares regression to determine antioxidant activity from the infrared spectrum. The best condition found for DPPH method resulted in the antioxidant activity of 3.41 mg EGA g⁻¹ extract, (pH 9.5; 0.25% p.p⁻¹ enzyme; 75°C). For the FRAP method, the highest values of antioxidant activity were 38.65 μmol of Fe(II) g⁻¹ extract (pH 9.5; 0.25 % p.p⁻¹; 75°C) and 36.80 μmol of Fe(II) g⁻¹ extract (pH 8.5; 0.15% p.p⁻¹; 65°C). Infrared spectra were obtained in the region of 750 to 1650 nm for 102 samples of fish hydrolysates. This set of samples was separated by calibration (n = 82) and validation (n = 20). From the spectra of the samples of the calibration set and their respective concentrations of antioxidant activity, multivariate calibration models were constructed. The global model for the DPPH method presented 11 outliers, which after exclusion presented values of 0.623 for the RMSECV and 0.793 for the correlation coefficient, with 10 latent variables. For the model obtained from segmentations of the spectrum were observed 11 outliers. After exclusion of these samples, the final model showed a correlation coefficient of 0.800 and a value of 0.556 for RMSECV. The global model for the FRAP method presented a RMSECV of 4.42, R 0.914 and 9 latent variables. For the model obtained from segmentations it was obtained an RMSECV of 5.01 and R 0.897 and 8 latent variables. In general, the models built for the FRAP method (Global and segmented) were more promising than the models for the DPPH method.

Keywords: Chemometrics, partial least square, fish farming.

1. INTRODUÇÃO

Com a crescente demanda por alimentos de qualidade e com valor nutricional elevado, destaca-se novas buscas em pesquisa e desenvolvimento dos mesmos. Segundo (FAO, 2018) a produção pesqueira no mundo em 2016 foi de aproximadamente 54 milhões de toneladas, onde 86,2% são destinados ao consumo humano, e os 13,8% restantes destinados a outros usos, como fabricação de ração animal. A parcela destinada a fabricação de ração pode conter elevados teores de antioxidantes e outros nutrientes, possibilitando a agregação de valor a estes subprodutos. Nesse sentido, os hidrolisados de peixe constituem uma alternativa importante para ampliar a aplicação dos resíduos da piscicultura.

Na contramão desta realidade estão as técnicas de análises para quantificação destes nutrientes, em especial os antioxidantes, que são de complexidade moderada a alta, dependem de solventes tóxicos para realização, elevado tempo de análise e baixa reprodução de resultados. As análises por infravermelho próximo (NIR) vem com o intuito de obter resultados rápidos e confiáveis, necessitando de pouca manipulação e possibilitando o seu uso posterior. O infravermelho próximo possui alta taxa de penetração da radiação sendo aplicada a uma grande gama de compostos orgânicos (SANTOS, 2011).

Na calibração multivariada várias respostas do instrumento se relacionam com o objeto de importância. Para calibrações em primeira ordem obtêm-se um conjunto de valores medidos instrumentalmente na amostragem, ou seja, em cada amostra o seu respectivo espectro. Com este dispositivo tem-se o benefício de efetuar a análise na matriz mesmo com interferentes, no entanto estes devem estar em todas amostras utilizadas na calibração (VALDERRAMA, 2009).

Com a tecnologia cada vez mais presente em nosso cotidiano e na química, o uso de computadores para tratar grandes quantidades de dados tem crescimento exponencial devido aos avanços de hardware e software. Com isso facilita o tratamento da grande quantidade de dados fornecidos pela química analítica promovendo a interface entre instrumental e computadores (FERREIRA et al., 1999). Assim a utilização dos métodos utilizando a espectroscopia no infravermelho próximo e a calibração multivariada com auxílio da técnica de Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (*Partial Least Squares Regression* -PLS), tem promovido

resultados satisfatórios em especial para análises de produtos alimentícios (SOUZA et al., 2013) , mostrando-se adequada para ser utilizada no presente trabalho.

1.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver um modelo para quantificação da atividade antioxidante em hidrolisados de peixe obtidos de cortes em “V” de aparas de Tilápia do Nilo, por meio de calibração multivariada por mínimos quadrados parciais e espectroscopia no infravermelho próximo.

1.2. Objetivos específicos

Determinar a atividade antioxidante dos hidrolisados pelos métodos DPPH e FRAP
Selecionar o intervalo espectral mais adequado para a obtenção do modelo de calibração.

Avaliar a presença de *outliers* nos modelos de calibração e validação.

Determinar os erros de predição para os conjuntos de calibração e validação.

1.3. JUSTIFICATIVA

A busca por novas técnicas que alinhem rapidez e qualidade dos resultados são importantes para o avanço de pesquisas, desenvolvimento e aperfeiçoamento dos métodos de análise. Nas pesquisas no meio acadêmico é comum diversos problemas como de reprodução de resultados, escassez de reagentes, tempo limitado entre outros. Com o avanço das tecnologias surge alguns equipamentos que facilitam e auxiliam, o NIR é um deles, porém é necessário a construção de modelos de calibração para tratar determinada substância. A calibração multivariada surge como uma boa opção para construções de modelos de calibração para estes equipamentos.

Os antioxidantes são objeto de estudo crescente por serem de grande importância para a saúde e prevenção de doenças. As técnicas de análise utilizadas para estes estudos são de complexidade moderada a alta, e algumas utilizam solventes tóxicos em sua aplicação sendo técnicas destrutivas. As análises NIR vem

com o intuito de obter resultados rápidos e confiáveis, necessitando de pouca manipulação possibilitando o seu uso posterior (SANTOS, 2011).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Antioxidantes

Substâncias antioxidantes são definidas por retardar ou inibir consideravelmente a oxidação, mesmo em pequenas concentrações em relação ao substrato a ser oxidado (THOMAS, 2000). Diversos estudos propõem que antioxidantes exógenos, em quantidades significativas presentes na dieta diária, colaboram para a prevenção de doenças graves e crônicas, como cardiopatias alguns tipos de câncer, algumas neurodegenerativas, distúrbios metabólicos e enfermidades inflamatórias ligadas ao desenvolvimento de radicais, através do processo de oxidação (BIANCHI; ANTUNES, 2005)

2.1.1. Antioxidantes sintéticos

Esta classe de antioxidantes é usada em bases alimentares com a intenção de prolongar a manifestação da transformação oxidativa no alimento, durante todo o processo de fabricação, transporte armazenagem ou manipulação (ANVISA, 1997).

Os antioxidantes sintéticos de maior utilização na indústria são de constituintes fenólicos butil-hidroxianisol (BHA), butil-hidroxitolueno (BHT), terc-butilhidroquinona (TBHQ) e galato de propila, sendo que estes tiveram seu uso autorizado em quantidades específicas, sendo incluso um limite de ingestão diária (TAKEMOTO; FILHO; GODOY, 2009).

2.1.2. Antioxidantes naturais

Os antioxidantes sintéticos tem sido substituídos pela adição dos antioxidantes naturais, principalmente na indústria de alimentos com o intuito de minimizar os efeitos tóxicos que os antioxidantes sintéticos podem causar (SILVA et al., 2009). Entre os antioxidantes naturais tem-se as vitaminas, compostos fenólicos e enzimas. Nos resíduos de pescado ocorre o processo proteolítico, em que proteínas são clivadas e modificadas em peptídeos de tamanhos diferentes e aminoácidos livres (LUNELLI, 2015). Os antioxidantes encontrados em maior número na natureza fazem parte do grupo dos compostos fenólicos, e estes abrangem um grande conjunto de substâncias, no qual contém no mínimo um anel aromático com um ou vários substituintes hidroxílicos (SOUZA; VIEIRA; PUTTI, 2018).

2.2. Hidrolisados

O processo de hidrólise proteica compõe-se pela quebra de ligações peptídicas das proteínas, e assim libera peptídeos de várias dimensões e aminoácidos livres, e esta pode ser acelerada por ácidos bases ou enzimas. O processo de hidrólise enzimática traz como benefício a especificidade, o domínio do grau de hidrólise, ação controlada, produto final com baixo teor de sódio e geração insignificante de subprodutos (BIASUTTI et al., 2008).

Diariamente a indústria de filetagem de tilápia gera porções como cabeça, carcaça, víscera, escama, pele e aparas que correspondem a aproximadamente 65 % do peixe integral. Segundo Boscolo et.al, (2007) este subproduto é rico em minerais, proteínas e gordura e assim se torna um coproduto proveitoso para a extração de moléculas bioativas como: aminoácidos, lipídios, que trazem benefícios para a alimentação e saúde humana.

2.3. ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO

2.3.1. Histórico e aplicações

Segundo Santos, (2011) a região do infravermelho próximo (NIR), foi a primeira região não-visível de radiação eletromagnética a ser conhecida. Essa técnica foi descrita no início da década de 1930, e uma das primeiras aplicações práticas ocorreu durante a década de 1960 com uma equipe de pesquisadores do professor Karl Norris (PASQUINI, 2003). Neste estudo foi determinado o teor de teor de umidade em produtos agrícolas com o uso de refletância difusa. Assim o trabalho revolucionou o uso do artifício, pois foi pioneiro em efetuar uma determinação quantitativa, usufruindo de medidas em mais de um comprimento de onda (análise multivariada), se contrapondo ao emprego clássico de somente um comprimento de onda estabelecido pela lei de Beer Lambert (SANTOS, 2011).

O desenvolvimento dos microcomputadores e o avanço na instrumentação na década de 1980 e 1990, teve considerável importância no avanço da espectroscopia NIR, contribuindo no aprimoramento da quimiometria e por conseguinte com a análise multivariada (FERREIRA et al., 1999). Na atualidade, a aplicação da espectroscopia NIR tem se difundido, pois consegue atender de maneira eficaz a prescrição de moléculas orgânicas e variáveis qualitativas (SANTOS, 2011).

Pode-se citar diversas vantagens que a espectroscopia NIR denota como a possibilidade de determinações diretas, agilidade na obtenção de resultados, técnica não destrutiva, não invasiva, aplicação numa vasta gama de compostos orgânicos, possibilidade de determinações simultâneas com o uso de métodos de calibração multivariada. Contudo deve-se levar em consideração que a espectroscopia NIR depende de técnicas quimiométricas para a extração de informações, além de apresentar baixa sensibilidade e seletividade (PASQUINI, 2003)

É importante ressaltar que o trabalho com o NIR, poderia ser de simples interpretação se os espectros se manifestassem de forma clara e distinta para os múltiplos componentes presentes no analito, em contrapartida do que acontece nos espectros do infravermelho médio, onde as bandas de absorção são interpretadas e associadas diretamente aos componentes químicos de interesse (LIRA, 2010)

2.3.2. Princípios

O infravermelho corresponde a região espectral na faixa de comprimentos de onda entre 780 a 1.000.000 nm. Divide-se essa região em três porções, que são denominadas conforme a proximidade do espectro visível (SKOOG WEST HOLLER et al., 2005). São apresentadas na tabela 1 as propriedades das três regiões do espectro infravermelho.

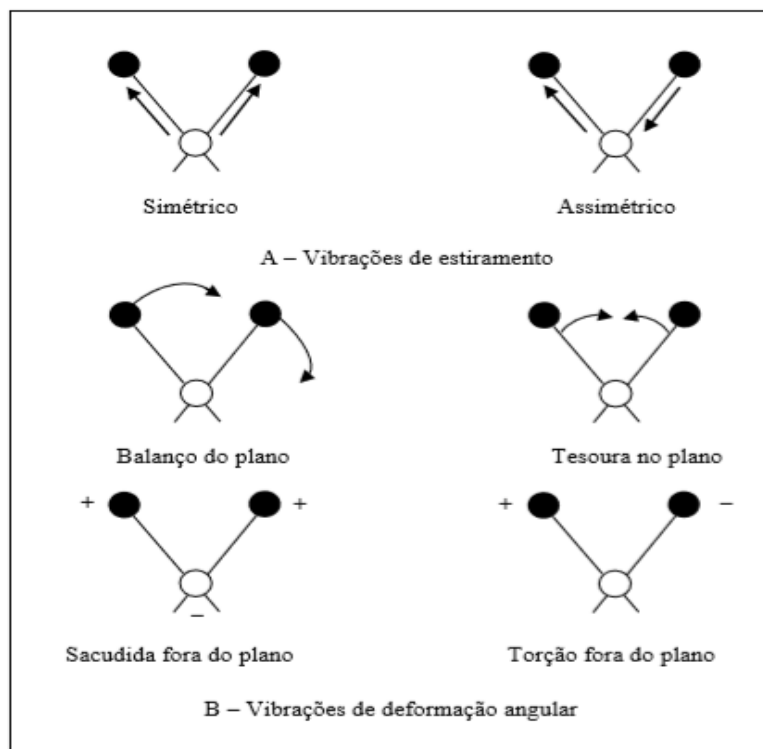
Tabela 1- Regiões do espectro de infravermelho

Região	Número de onda ($\bar{\nu}$), cm ⁻¹	Comprimento de onda (λ), nm	Frequência (ν), Hz
Próximo	12.800 a 4000	780 a 2.500	3,8.10 ¹⁴ a 1,2.10 ¹⁴
Médio	4000 a 200	2.500 a 50.000	1,2.10 ¹⁴ a 6,0.10 ¹²
Distante	200 a 10	50.000 a 1.000.000	6,0.10 ¹² a 3,0.10 ¹¹

Fonte:(SKOOG WEST HOLLER et al., 2005).

Comumente a intensidade da radiação na região do infravermelho próximo não é capaz de promover transições eletrônicas em uma molécula, intervindo apenas no modo vibracional das ligações químicas como mostrado na Figura 1. É essencial para a molécula absorver radiação com comprimento de onda no infravermelho, sofrer uma variação no momento dipolo e conseqüentemente um movimento vibracional ou rotacional. Nessas condições o campo elétrico alternado da radiação consegue relacionar-se com a molécula e provocar oscilação na amplitude de um de seus movimentos (DIAS, 2011).

Figura 1- Tipos de vibrações moleculares



Fonte: (NASCIMENTO et al., 2010). Legenda: += vibração para fora do plano; - = vibração para dentro do plano

Determina-se o momento dipolo pela magnitude da diferença de carga e a distância entre os dois centros de carga, então se não ocorrer mudança efetiva no momento dipolo ou enquanto ocorrer vibração ou rotação de uma molécula homonuclear, como O_2 , N_2 ou Cl_2 , esta matéria não absorve radiação na região do infravermelho (COZZOLINO, 2014).

A região de absorção NIR, apresenta algumas especificações para que ocorra absorção da radiação, uma dessas é que a energia do fóton deve ser igual a diferença de energia entre os níveis vibracionais que são dois. É preciso também que o campo carregado eletricamente oscile com a radiação incidente e este consiga sofrer interação com a molécula. Sendo assim a força de absorção da radiação NIR pelo conjunto ou sistema provém de quanto pode variar o momento dipolo, e assim a medida da frequência que a radiação absorveu é igual ao da oscilação do dipolo (SOUZA et al., 2013).

Em síntese, para que uma molécula possa absorver radiação NIR, é preciso que o deslocamento dos átomos em uma vibração provoque uma alteração no momento dipolo, compondo assim um mecanismo de comunicação entre o modo

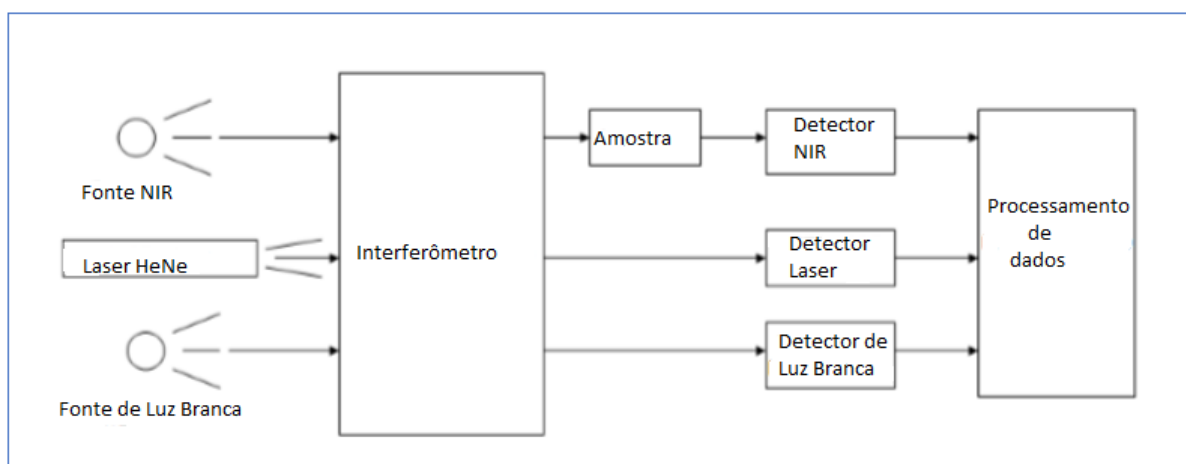
vibracional e a radiação eletromagnética (SANTOS, 2015). É necessário também que a molécula adquira radiação em uma frequência hábil para proporcionar precisamente a energia necessária para acontecer sobretons ou bandas de associação de duas ou mais vibrações (PASQUINI, 2003).

Segundo Souza et al., (2013) as bandas de absorção situadas no infravermelho próximo apresentam grande anarmonicidade e momento dipolo elevado. Com isso bandas de combinação em transições vibracionais somadas a sobretons estão relacionadas com grupos fundamentais como: C-H, N-H, O-H e S-H.

2.3.3. Princípio óptico dos analisadores de matriz de diodo

O sistema de matriz de diodo apresenta uma grande vantagem onde o torna preferido nas indústrias, este apresenta rapidez na aquisição dos espectros pois todo sistema não apresenta partes móveis (BUENO, 2011). Na Figura 2 apresenta-se um esquema básico de um espectrofotômetro com transformada de Fourier (FT-NIR).

Figura 2-Princípio óptico do analisador infravermelho próximo



Fonte: Bueno (2011)

Uma lâmpada produz luz branca que ilumina a amostra, com uma porção da luz em um comprimento de onda específico sendo absorvida pela amostra e o restante refletido de volta para o analisador. No analisador uma rede de difração estacionário é usado para dividir a luz branca em comprimentos de onda distintos. Cada comprimento de onda é então medido por um detector designado (no total são 256 detectores) determinando quanta luz é refletida. Durante a coleta dos dados que

dura em torno de 6 segundos, uma linha base é coletada, o ruído é monitorado, a precisão do comprimento de onda é padronizada e os espectros completos são coletados (BUENO, 2011).

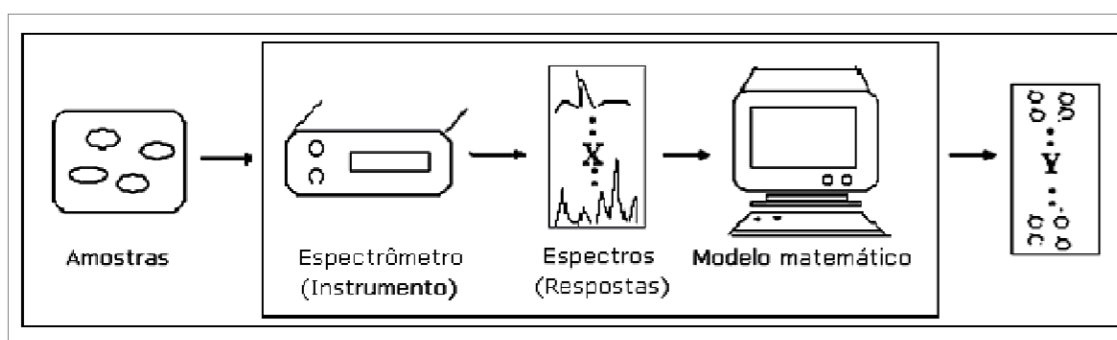
2.4. TÉCNICAS DE ANÁLISE MULTIVARIADA

É imprescindível considerar que o espectro na região do NIR não aponta bandas específicas, tornando sua interpretação e uso como técnica qualitativa ou quantitativa, complexo. Ao associar a espectroscopia na região do NIR com técnicas quimiométricas é possível ampliar as potencialidades desta técnica (SANTOS, 2011). Com o crescimento da informatização nos laboratórios, bem como a disponibilização de softwares capazes de propiciar a interface entre ferramentas sofisticadas, com grande capacidade de calcular e extrair informações complexas, favoreceram o advento e desenvolvimento da quimiometria; Este segmento da química utiliza ferramentas estatísticas e matemáticas para o planejamento e otimização das condições experimentais, e para a extração de informação química relevante de dados químicos multivariados (BLANCO; VILLARROYA, 2002; NETO; BRUNS, 2006).

2.4.1. Calibração multivariada

A calibração multivariada envolvendo a espectroscopia NIR, permite estabelecer uma relação matemática entre os dados espectrais e o parâmetro físico ou químico de importância, empregando uma técnica autônoma como ilustrado na Figura 3. É definido ainda por um método para descobrir um algoritmo matemático que reproduza com qualidade propriedades de investigação, através dos dados colhidos pelo instrumento (FERREIRA et al., 1999).

Figura 3- Representação procedimento calibração multivariada espectral utilizada em espectroscopia e cromatografia.



Fonte: Ferreira et al., (1999)

Nesta associação entre algoritmo e instrumento o algoritmo se torna um novo “instrumento”. A previsão de concentrações de componentes químicos no analito de composição desconhecida utilizando sinais instrumentais se torna possível quando se encontra um algoritmo adequado. A organização é de uma matriz \mathbf{X} ($n \times m$) com variáveis independentes, como ilustrado na Figura 4, em que os espectros um para cada amostra são dispostos e cada linha representa uma amostra e as medidas das respostas.

Figura 4- Representação matriz organizacional amostras e respostas.

$$\mathbf{X} = \begin{bmatrix} x_{11} & x_{12} & \dots & x_{1m} \\ x_{21} & x_{22} & \dots & x_{2m} \\ \vdots & \vdots & & \vdots \\ x_{n1} & x_{n2} & \dots & x_{nm} \end{bmatrix}$$

Fonte: Ferreira et al., (1999)

O método de calibração é elaborado em três etapas: calibração, validação e previsão. Sendo a primeira construir os modelos de calibração, com os dados correlacionados entre a matriz das variáveis medidas, com a matriz de dados com as características de interesse, que corresponde as concentrações dos analitos ou propriedades do material (FERREIRA et al., 1999).

A segunda etapa consiste em avaliar o modelo utilizando-se de ferramentas estatísticas de validação, e então validar e aplicar o modelo para prever propriedades

de interesse do analito, desde que possuam a mesma natureza das amostras do grupo de calibração, a partir do espectro obtido (FERREIRA et al., 1999). A calibração multivariada é uma ferramenta robusta advinda da calibração univariada, onde o modelo preditivo é construído com fundo em múltiplos valores do espectro (OLIVIERI et al., 2006)

2.4.2. Algoritmo Kennard-Stone

O propósito do algoritmo KS é de definir uma subclasse expressiva em um grupo de N amostras. Para garantir a distribuição semelhante para cada subclasse na extensão do grupo de dados \mathbf{X} (respostas instrumentais), o algoritmo utiliza o método *stepwise* onde uma recente escolha é realizada em partes do espaço distantes de amostras já escolhidas. Para efetuar esta tarefa o algoritmo KS adota a distância Euclidiana entre $d(x, p)$, os transmissores \mathbf{X} de cada par (p, q) como mostrado na equação 1:

$$d(x, p) = \sqrt{\sum_j^I [1x_p(j) - x_q(j)]^2}; \quad p, q \in [1, N] \quad (1)$$

Para informações espectrais, $x_p(j)$ e $x_q(j)$ são as respostas instrumentais no j -ésimo comprimento de onda para os analitos p e q , nesta ordem, e j denota o número de comprimentos de onda no espectro segundo (SOUZA, 2011).

Algumas ferramentas poderiam ser utilizadas como a de seleção aleatória (Random Search -RS), que utiliza o artifício pelo qual o grupo em estudo é retirado do grupo maior conforme o arranjo estatístico do conjunto completo. Porém esta metodologia pode não ser expressiva e não garante que aconteça problemas de extravasamento. Neste aspecto o algoritmo KS apresenta grande robustez pois seu método de seleção das amostras é conforme as suas distâncias (SOUZA, 2011).

2.4.3. Avaliação de *Outliers*

Define-se como *outliers* amostras anômalas pois possuem conduta diferente em relação ao conjunto de informações. Estas podem se manifestar nos conjuntos de calibração e validação. A evidência de *outliers* no conjunto de calibração

pode vim denegrir a capacidade de previsão do modelo, sujeitando a valores altos de erro. Com isso a avaliação destas amostras anômalas é uma etapa importante para a melhoria do modelo, onde a exclusão destas possibilitam a criação de modelos mais eficazes e precisos com bom poder preditivo (VALDERRAMA, 2009).

As amostras *outliers* na calibração são geralmente examinados com referência na *leverage* extremo, que contém resíduos fora do modelo no conjunto de dados espectrais e na variável dependente. O *leverage* caracteriza o quanto uma determinada amostra está longe da média do grupo de dados. Ao usar o conjunto de informações espectrais de exemplo, este parâmetro avalia o quanto o espectro de determinada amostra está em desacordo com os espectros das outras amostras contidas no grupo de dados (VALDERRAMA, 2009).

Em relação a descrição dos resíduos não modelados e a variável latente, os *outliers* são detectados pela comparação do erro médio quadrático de validação cruzada (RMSECV) com o erro absoluto daquela amostra. Quando a amostra manifestar erro absoluto ($y - \hat{y}$) maior que (3x RMSECV), esta é estabelecida como *outlier* (MARTENS, et al 1996). O RMSECV é determinado pela equação 2:

$$RMSECV = \frac{1}{n-A-1} \sqrt{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)} \quad (2)$$

Onde, y_i , é o valor de referência e \hat{y}_i é o valor estimado

Para a avaliação de *outliers* na validação utilizou-se o método de validação cruzada, que consiste na remoção da i -ésima amostra do conjunto de calibração e criação de um modelo. Após a previsão do modelo este é comparado com o valor obtido pelo método de referência. Com as exclusões de N amostras, calcula-se o RMSEP (Raiz Quadrada dos Erros Médios de Predição) equação 3:

$$RMSEP = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{N}} \quad (3)$$

Sendo que \hat{y}_i é o valor estimado da concentração da i -ésima amostra e $PRESS = \sum (y_i - \hat{y}_i)^2$ é o *Prediction Error Sum of Square* (PRESS – Somatório Quadrático dos Erros de Predição). É observado que o PRESS contém unidades de variância e o RMSEP pode ser interpretado como um desvio-padrão médio.

2.4.4. Métodos de regressão multivariada

2.4.5. Regressão por mínimos quadrados parciais (PLS)

Diversos métodos de regressão vem sendo utilizado para construção de modelos de calibração multivariada (SANTOS, 2011). A regressão por mínimos quadrados parciais (*partial least squares regression* - PLS), é vista como o método de regressão de maior utilização para a construção de modelos de calibração multivariada com conjuntos de informações de primeira ordem. Isto deve-se ao aspecto deste método não necessitar de um conhecimento exato da composição das amostras, podendo então produzir previsões mesmo que as amostras possuem interferentes, no entanto estes também devem estar presentes no modelo construído (SOUZA et al., 2013).

O método de regressão por mínimos quadrados parciais PLS normalmente utiliza toda faixa espectral selecionada a partir da matriz espectral (matriz \mathbf{X}) para correlaciona-las com os dados presentes do conjunto de informações de referência (vetor \mathbf{y}) (BARCELLOS et al., 2007). Por meio de combinações lineares das informações espectrais (\mathbf{X}) e os dados de referência (\mathbf{y}), é obtido o número de variáveis latentes necessários para relacionar os espectros e as concentrações (SOUZA et al., 2013).

Segundo Spiegelman et al., (1998) a seleção da região espectral a ser usada para modelagem melhora o desempenho de forma significativa quando comparadas aos modelos que adotam o uso do espectro inteiro. Selecionar regiões específicas onde existe linearidade, propondo modelos mais robustos visando a otimização da regressão multivariada, identificando os subconjuntos dos dados completos, que quando juntos ou não, amenizam os erros de previsão (BARCELLOS et al., 2007).

2.4.6. Seleção do número de variáveis latentes

A seleção do número adequado de variáveis latentes a ser usado no modelo PLS é um critério de grande importância afim de alcançar alto desempenho nas previsões. Assim esta análise propicia um modelamento ideal do sistema o que evita superestimar ou subestimar o modelo. Um alto número de variáveis latentes no modelo propicia a adição de informações desnecessárias como ruídos e interferências além de diminuir a capacidade preditiva do modelo. Ao contrário a inserção de um baixo número de variáveis latentes pode excluir muitas informações relevantes ocasionando um ajuste inferior (SOUZA et al., 2013).

O número de variáveis latentes adequado para o modelo pode ser determinado com base na análise da soma dos quadrados do erro de previsão (PRESS), e empregando a validação cruzada. Este processo consiste em exclusões sucessivas de amostras do conjunto de calibração e analisando a melhoria do modelo de previsão da propriedade de interesse. Este processo é repetido com todas as amostras até que cada amostra tenha sido excluída ao menos uma vez da calibração. A obtenção do erro de previsão ocorre quando se compara a concentração prevista de cada amostra e o seu valor real indicado no vetor \mathbf{y} . A expressão da somatória dos quadrados do erro de previsão PRESS (Equação 4) é definida como:

$$PRESS = \sum (y_i - \hat{y}_i)^2 \quad (4)$$

Onde y_i é o valor calculado e \hat{y}_i é o valor conhecido.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Obtenção das amostras

As amostras de peixe usadas para análise de antioxidantes, foram adquiridas em frigorífico de pescado localizado na região oeste do Paraná. Estas amostras foram obtidas a partir das aparas de cortes em V de tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus*. Para a reação de hidrólise, empregou-se a enzima alcalase, utilizando planejamento experimental 2³, com pH variando de 7,5, 8,5 e 9,5, e as concentrações da enzima variaram de 0,05, 0,15 e 0,25 g por 100 g de amostras e temperatura de 55, 65 e 75 °C. Foi padronizado o tempo de hidrólise em 60 minutos para todas combinações e durante o tempo de hidrólise foram coletadas as amostras em um total de dez para cada combinação.

Após o processo de hidrólise as amostras foram liofilizadas. Foi utilizado o liofilizador marca Liotop L101 Liobras, localizado no laboratório multiusuário da Universidade Tecnológica Federal do Paraná Câmpus Medianeira. Essa etapa do projeto foi realizada como parte de projeto de Pós-Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e engenharia de Pesca da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), campus de Toledo, de Ortência Leocádia Gonzalez da Silva Nunes, sob supervisão do Prof. Dr. Altevir Signor.

3.2. Capacidade antioxidante dos hidrolisados de peixe

As análises foram realizadas nos laboratórios de Química Orgânica e no laboratório Multiusuário Central Analítica da UTFPR, em parceria com empresa privada localizada no oeste do Paraná. A capacidade antioxidante dos hidrolisados de peixe foi avaliada pela capacidade de sequestro radical livre DPPH, conforme metodologia descrita por Bondet (1997) e pelo método de poder de redução do íon ferro, determinado pelo método FRAP, segundo Benzie (1996).

Para análises de antioxidante utilizando o método DPPH, foi construída curva de calibração com o padrão Trolox, com concentrações variando de 0 a 1000

($\mu\text{mol L}^{-1}$), e obtido o valor do coeficiente de determinação (R^2) de 0,9993. As concentrações de antioxidantes foram expressas em $\mu\text{mol ET g}^{-1}$ de extrato. As análises foram realizadas em triplicata, em que inicialmente foram sonicadas e em seguida filtradas em papel filtro, e utilizado o volume de 50 μL de amostra e 2 mL da solução de DPPH ao abrigo da luz. Foram utilizadas as concentrações de 50 g L^{-1} para cada amostra com o tempo de reação de trinta minutos. Para a quantificação usou-se espectrofotômetro Merck modelo Pharo-100 a 517 nm. Foi calculado o desvio padrão e o erro em % para cada amostra. Por padrão foi admitido erro máximo de 10% para os resultados em triplicata de cada amostra.

Para a determinação da atividade antioxidante FRAP, utilizou-se o complexo férrico de 2,4,6-tripiridil-1,3,5-triazina ($[\text{Fe}^{3+}(\text{TPTZ})_2]^{3+}$). O seu desenvolvimento foi voltado no início para calcular a força antioxidante em plasma sanguíneo (BENZIE, 1996). Para a quantificação usou-se espectrofotômetro Merck modelo Pharo-100 a 593 nm, utilizando a solução FRAP recém preparada como branco e a solução de TPTZ como controle positivo. Foi construída curva de calibração utilizando uma solução padrão de sulfato ferroso, com concentrações variando de 0 a 1500 ($\mu\text{mol/L}$), e obtido o valor do coeficiente de determinação (R^2) de 0,9996. As concentrações de antioxidantes foram expressas em $\mu\text{mol de Fe(II) g}^{-1}$ de extrato. As análises foram realizadas em triplicata e calculado o desvio padrão e o erro em % para cada amostra. Por padrão foi admitido erro máximo de 10% para os resultados em triplicata de cada amostra.

3.3. Obtenção dos espectros

Os espectros foram obtidos com um espectrofotômetro infravermelho próximo, com transformada de Fourier e módulo de refletância total atenuada da Perten Instruments modelo DA 7250™. Foi utilizada a faixa de 1650 a 950 cm^{-1} com resolução de 5 cm^{-1} e 102 varreduras.

Para a realização das varreduras as amostras foram homogeneizadas e espalhadas em bandeja rotatória com auxílio de régua deixando a superfície uniforme. Durante a coleta dos dados que dura em torno de 6 segundos, uma linha base foi coletada, o ruído foi monitorado, a precisão do comprimento de onda foi padronizada e os espectros completos foram coletados. Após a realização de cada leitura realizou-

se a limpeza da bandeja com auxílio de pincel e flanela. Para exportação dos espectros, utilizou-se o próprio software do equipamento *Results Plus*, versão 3.2.114.990.

3.4. Divisão das amostras em conjuntos de calibração e validação

As amostras foram divididas em conjuntos de calibração e validação utilizando o software MATLAB versão 7.8.0 com o pacote SPA_GUI, com algoritmo Kennard-Stone (KS). Este algoritmo é de grande relevância pois tem capacidade de trabalhar com um grande conjunto de amostras (SOUZA, 2011). Foram utilizadas oitenta e duas amostras para o conjunto de calibração e vinte amostras para o conjunto de validação.

3.5. Obtenção dos modelos pelo método dos mínimos quadrados parciais PLS

O grupo de espectros empregado para a calibração foi proveniente das amostras de hidrolisados de peixe, conforme descrito acima. Para a determinação de qual intervalo espectral é o mais adequado para a calibração pelo método do PLS, utilizou-se o software MATLAB versão 7.8.0, com o pacote iToolbox e função IPLS. O espectro foi dividido em segmentos variando de 1 a 35, onde aplicou-se a correção multiplicativa do sinal e centralização dos dados na média, respectivamente. Foi desenvolvido um modelo de calibração para cada intervalo das segmentações, com o número de variáveis latentes (VLs) sendo determinado através dos resultados da RMSECV. Em cada segmentação do espectro, determinou-se o intervalo que resultou no menor valor da RMSECV. A partir destes intervalos, selecionou-se o intervalo que apresentou o menor valor para a RMSECV.

3.6. Avaliação de *Outliers* para os conjuntos de calibração e validação

Para a avaliação das amostras anômalas *outliers* foi determinado o *leverage* das amostras e realizado a padronização dos resíduos conforme a distribuição de Student. Foram considerados *outliers* as amostras que apresentaram resíduos padronizados além dos valores de $\pm 2,0$, independentemente dos valores de *leverage*. As amostras cujos valores de *leverage* foram maiores que $3 k/n$ (onde: k =número de variáveis latentes e n = número de amostras de calibração) e apresentarem resíduos padronizados fora do intervalo considerado devem ser excluídas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Atividade antioxidante

A Tabela 2 apresenta os resultados obtidos de capacidade antioxidante para a metodologia da captura de radicais livres pelo DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazila), nas diferentes condições avaliadas, para um tempo fixo de reação de sessenta minutos.

Tabela 2- Valor médios da capacidade antioxidante para a metodologia da captura de radicais livres pelo DPPH, para os ensaios de hidrólise após 60 minutos de reação com enzima Alcalase®.

Ensaio	pH	Temperatura (°C)	Concentração enzima-substrato (%) (p.p ⁻¹)	Capacidade antioxidante (µmol ET/g Extrato)
1	7,5	55	0,05	1,53 ¹
2	7,5	55	0,25	2,31
3	7,5	75	0,05	3,20
4	7,5	75	0,25	2,29
5	9,5	55	0,05	2,45
6	9,5	55	0,25	2,29
7	9,5	75	0,05	1,23
8	9,5	75	0,25	3,41
9	8,5	65	0,15	1,91
10	8,5	65	0,15	2,18
11	8,5	65	0,15	2,50

¹. Média dos resultados obtidos em triplicata

Observa-se que o ensaio 8 apresentou a capacidade antioxidante de 3,41 mg ET g⁻¹ extrato, onde encontra-se a condição de pH 9,5 e adição de enzima 0,25 % p p⁻¹, e alta temperatura (75 °C). Na sequência observa-se também que o resultado do ensaio 3 (3,20 mg ET. g⁻¹ extrato), com pH de 7,5 e teor de enzima de 0,05 % p p⁻¹

¹, obtiveram juntos os maiores valores de capacidade antioxidante. Estudos recentes como o de Nunes et al., (2016) relatam resultados semelhantes aos encontrados no presente trabalho o valor de 2,71 mg ET g⁻¹ extrato, no entanto em condições de baixa temperatura (55 °C), alto valor de pH (9,5) e concentração de enzima (0,25% (p.p⁻¹)).

4.2. Atividade antioxidante pelo método FRAP (Ferric Reducing Ability Power)

Para as análises de antioxidantes que utilizou o poder de redução pelo método FRAP, observa-se na tabela 3 que em geral os hidrolisados apresentaram proporcionalidade nos resultados.

Tabela 3- Valores médios de capacidade antioxidante para o método FRAP (Ferric Reducing Ability Power), para os ensaios de hidrólise após 60 minutos de reação com enzima Alcalase[®].

Ensaio	pH	Temperatura (°C)	Concentração enzima-substrato (%) (p.p ⁻¹)	Capacidade antioxidante (µmol de Fe (II) g ⁻¹ de extrato)
2	7,5	55	0,25	34,30 ¹
3	7,5	75	0,05	21,78
4	7,5	75	0,25	34,85
5	9,5	55	0,05	33,62
6	9,5	55	0,25	38,65
7	9,5	75	0,05	16,83
8	9,5	75	0,25	32,51
9	8,5	65	0,15	36,80
10	8,5	65	0,15	35,60
11	8,5	65	0,15	33,30

¹. Média dos resultados obtidos em triplicata

Para os ensaios três e sete onde utilizaram a mesma temperatura (75°C) e concentração de enzima para hidrólise (0,05% (p.p⁻¹)), porém em pH diferente (7,5 e 9,5 respectivamente) foram obtidos os menores valores de capacidade antioxidante

(21,78 e 16,83 μmol de Fe (II) g^{-1} de extrato respectivamente). Os maiores valores foram obtidos para os ensaios 6 e 9 (38,65 e 36,80 μmol de Fe (II) g^{-1} de extrato). Estes utilizaram temperatura de hidrólise (75°C) e (65°C) e concentração de enzima 0,25 e 0,15% (p.p⁻¹) respectivamente. Segundo Boroski et al. (2015) o método FRAP quantifica indiretamente a atividade antioxidante total de uma amostra e os testes devem ser conduzidos associados com outras metodologias a fim de garantir a correta interpretação dos resultados. Para melhor compreensão dos resultados de atividade antioxidante obtidos, é importante um estudo envolvendo a metodologia de planejamento fatorial para avaliar os efeitos de cada variável, bem como de suas interações sobre a atividade antioxidante.

4.3. Modelo global de calibração multivariada para o método DPPH

Para o modelo global, ou seja, utilizando todo o espectro para a calibração, obteve-se como mostrado na Tabela 4, inicialmente o primeiro modelo sem nenhuma exclusão de *outliers*, com 9 *variáveis latentes*, valor de *R* (coeficiente de correlação) 0,5293 e RMSECV (raiz quadrada do erro médio quadrático de validação cruzada) 0,9121. Após a exclusão de 11 *outliers* no total (modelo 6) obteve-se uma melhoria significativa, onde o número de *variáveis latentes* foi 10, o valor de *R* 0,7930 e o RMSECV 0,6234.

Tabela 4- Modelo inicial e modelos obtidos após a exclusão de *outliers* para todo intervalo espectral, com o método DPPH.

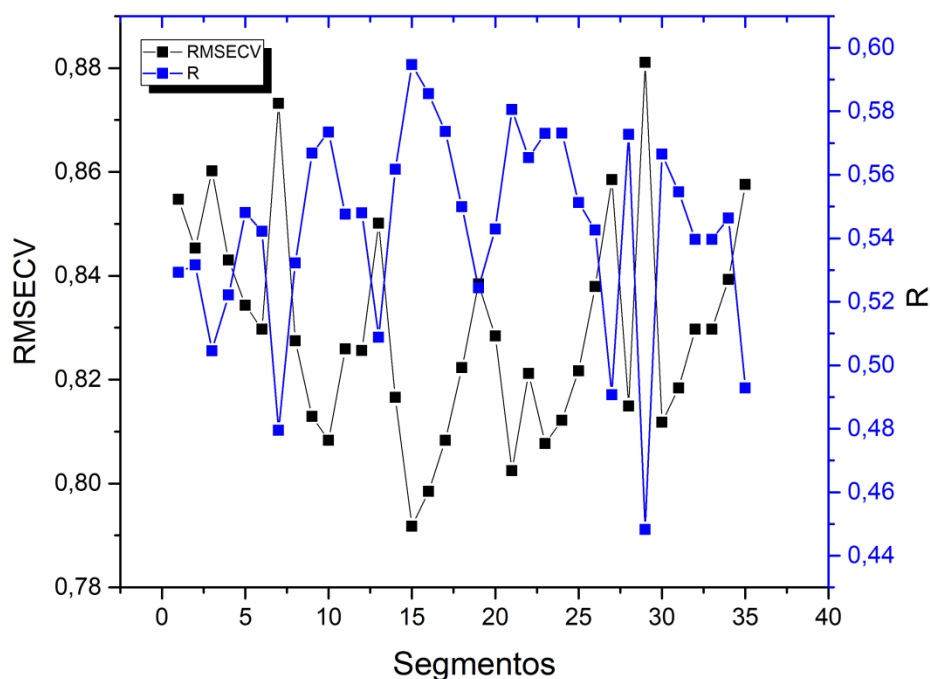
Modelo	Outliers	RMSECV	R	Variáveis latentes
1	0	0,9121	0,5293	9
2	2	0,8324	0,5953	9
3	3	0,7804	0,6591	9
4	4	0,6714	0,7598	10
5	1	0,6463	0,7724	10
6	1	0,6234	0,7930	10

Para o conjunto de validação o coeficiente de correlação entre preditos e de referência foi de 0,379. A análise de *outliers* não encontrou resultados anômalos para este conjunto de amostras. O valor da raiz quadrada do erro médio quadrático de predição (RMSEP) foi 0,7104.

4.4. Modelo selecionado de calibração multivariada para o método DPPH

Para a análise por segmentos foi inicialmente realizado estudo da melhor área do gráfico para se aplicar o modelo. A determinação do intervalo espectral foi realizada com base no intervalo cujo modelo resultou no menor valor de RMSECV e o maior valor de R . Para as segmentações do espectro variando de 1 a 35 intervalos, o modelo com menor valor de RMSECV foi obtido para a segmentação com 15 intervalos, sendo selecionado o intervalo 3 ($1556-1510\text{ cm}^{-1}$), cujo valor de RMSECV foi 0,7918 e o coeficiente de correlação foi 0,5947 como mostrado na Figura 5 .

Figura 5- Valores de RMSECV e R obtidos para os intervalos selecionados das segmentações realizadas, para o método DPPH.



Com esses dados iniciou-se análise para a segmentação com 15 intervalos como indicado na tabela 5. Após a análise e exclusões de *outliers* que totalizaram 11 amostras no conjunto de calibração, houve uma notável melhoria do modelo com os valores de RMSECV e R passando para 0,5562 e 0,8001, respectivamente.

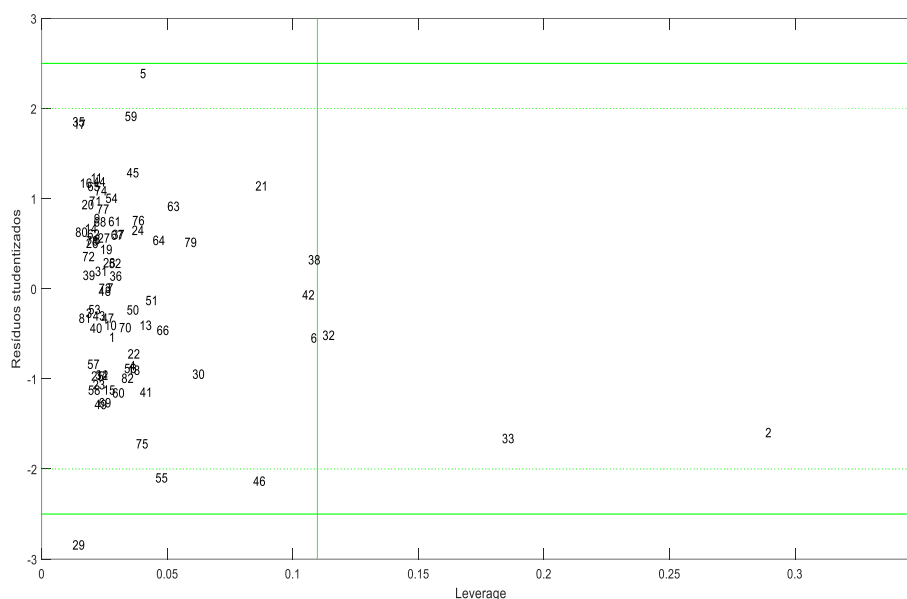
Tabela 5- Modelo inicial e modelos obtidos após a exclusão de *outliers* para o intervalo espectral selecionado, com o método DPPH.

Modelo	Outliers	RMSECV	R	Variável latente
1	0	0,7918	0,5947	2
2	2	0,7279	0,6443	2
3	2	0,6902	0,6943	2
4	1	0,6665	0,7145	2
5	2	0,6353	0,7448	2
6	3	0,5835	0,7758	2
7	1	0,5562	0,8001	2

O modelo selecionado foi avaliado com relação a presença de *outliers*, realizado pela análise do gráfico de resíduos de Student versus *leverage* (Figura 6). Esta figura mostra as duas primeiras amostras que foram excluídas do modelo amostras 5 e 29. Observa-se que estas amostras apresentaram resíduos padronizados além dos valores de $\pm 2,0$ e *leverage* baixa.

Segundo Ferreira et al (2009) o estudo do gráfico dos resíduos de Student versus "*leverage*" para cada amostra é a melhor forma de definir amostras anômalas. As amostras que apresentam altos valores de resíduos de Student e baixa "*leverage*" possivelmente têm algum erro no valor de concentração encontrado, e assim deve-se proceder com a exclusão dessa amostra do conjunto de calibração ou se possível ser medido novamente sua concentração.

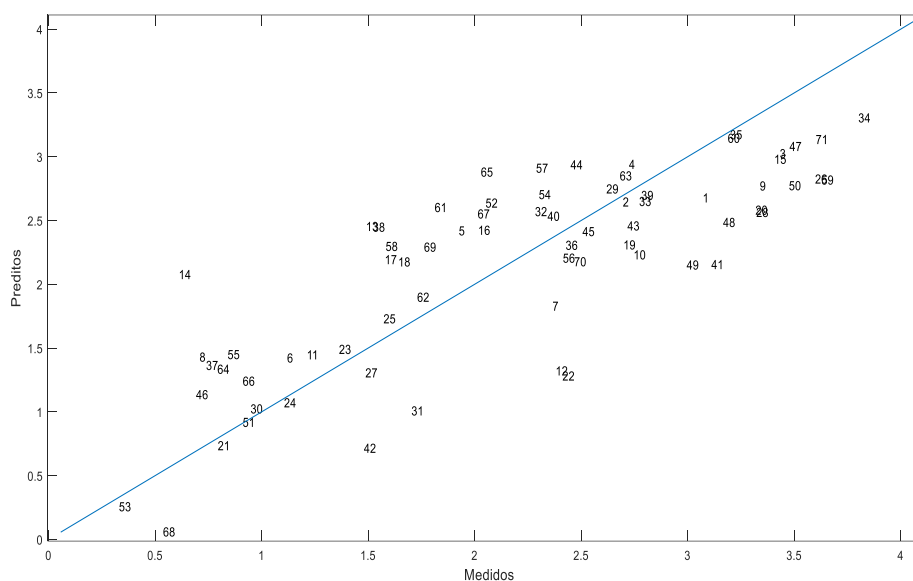
Figura 6-Gráfico resíduos Studentizados versus *leverage* para o modelo selecionado, para a determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH.



A Figura 7 apresenta o gráfico dos valores preditos para a atividade antioxidante versus medidos, para o modelo obtido para o intervalo selecionado (15) e após as exclusões das amostras anômalas. É observado que as amostras se distribuem de forma aleatória em relação a curva obtida e que os valores preditos foram consideravelmente distantes dos valores de referência, o que indica que o modelo possui uma capacidade preditiva limitada, porém sua aplicação pode ser utilizada para estimar a atividade antioxidante.

Para o conjunto de validação foi encontrado uma amostra *outlier* e o coeficiente de correlação entre preditos e de referência foi de 0,001. Após a exclusão desta amostra anômala do conjunto de validação o coeficiente de correlação obteve um leve aumento no valor subindo para 0,0064.

Figura 7- Gráfico dos valores de atividade antioxidante preditos versus medidos para o modelo selecionado, após a exclusão dos *outliers*.



4.5. Modelo global de calibração multivariada para o método FRAP

O modelo global obtido apresentou os valores de 10,319 e 0,561, respectivamente, para RMSECV e R. Foram encontrados no conjunto de calibração 11 *outliers* (Tabela 6). O modelo final apresentou o valor de 4,417 para o RMSECV e 0,914 para R. A análise posterior deste conjunto não mostrou a presença de *outliers*.

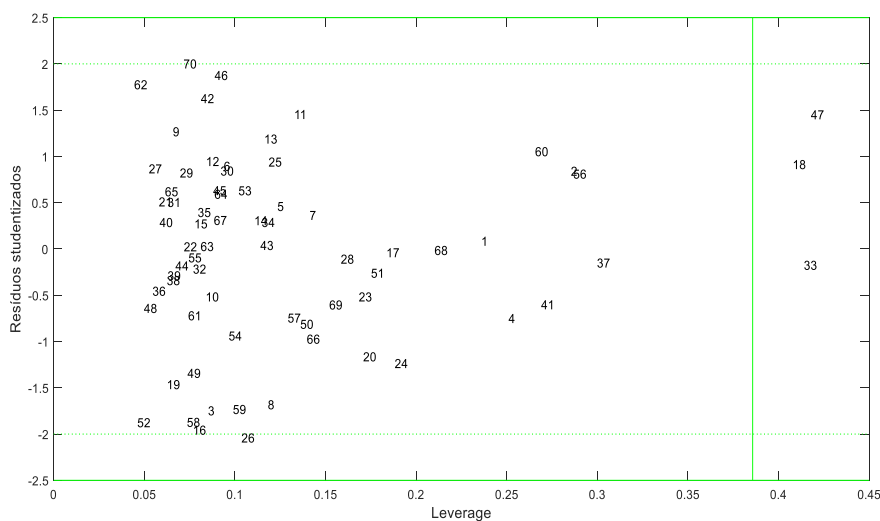
A análise do conjunto de validação para este modelo apresentou a presença de amostras *outliers* e correlação entre os valores preditos e medidos foi de 0,753. O valor da raiz quadrada do erro médio quadrático de predição (RMSEP) foi de 5,78.

Tabela 6- Modelo inicial e modelos obtidos após a exclusão de *outliers* para todo intervalo espectral, com o método FRAP.

Modelo	Outliers	RMSECV	R	Variável latente
1	0	10,319	0,5610	8
2	3	7,1080	0,7950	9
3	3	5,7500	0,8700	9
4	3	5,1700	0,9020	9
5	1	4,9000	0,9080	9
6	1	4,4167	0,9140	9

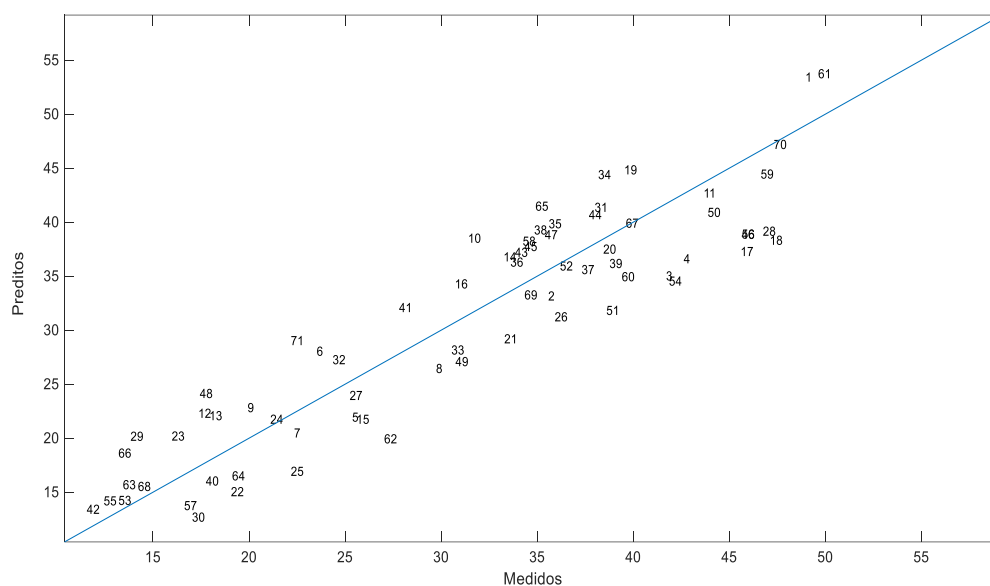
Podemos observar o gráfico resíduos Studentizados versus *leverage* (Figura 8) as amostras para o conjunto de calibração após a avaliação e exclusão de amostras anômalas. É visto que os valores de resíduos de Student para as amostras estão dentro da faixa prevista ($\pm 2,0$). Quanto ao *leverage* do conjunto de calibração, três amostras (47, 18, 33) apresentaram *leverage* alta como observado (Figura 8), porém estão dentro da faixa para os resíduos Studentizados e a exclusão delas poderia levar a diminuição da capacidade preditiva do modelo.

Figura 8- Gráfico resíduos Studentizados versus *leverage* para o modelo selecionado para a determinação da atividade antioxidante pelo método FRAP.



A Figura 9 apresenta o gráfico dos valores preditos para a atividade antioxidante versus medidos, para o modelo global e após as exclusões das amostras anômalas. É observado que as amostras se distribuem de forma pouco linear em relação a curva obtida e que os valores preditos foram consideravelmente distantes dos valores de referência, o que indica que o modelo possui uma capacidade preditiva reduzida, porém pode ser usado para a quantificação de antioxidantes pelo método FRAP.

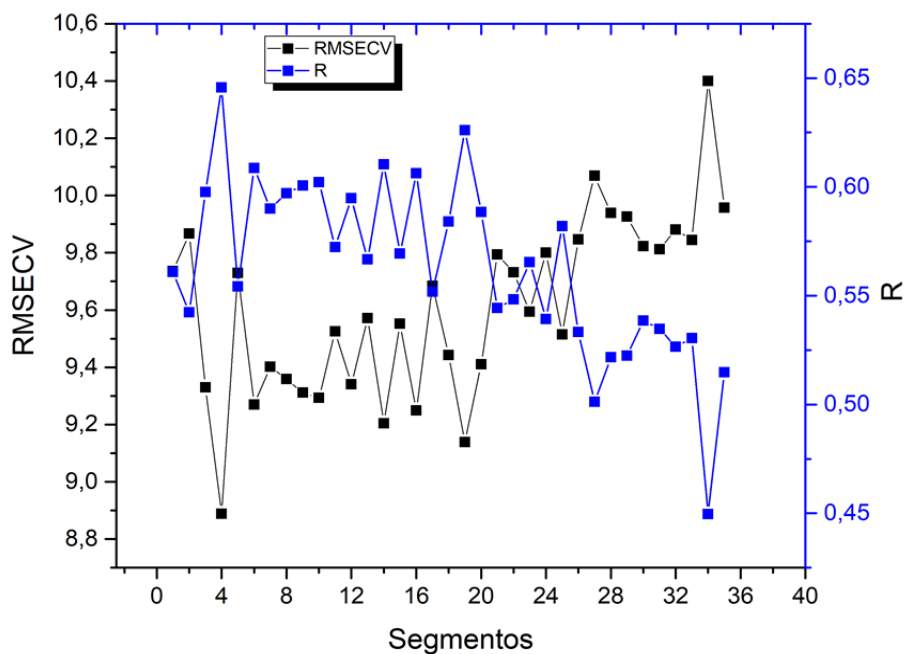
Figura 9- Gráfico dos valores de atividade antioxidante preditos versus medidos para o modelo selecionado, após a exclusão dos *outliers*.



4.6. Resultados análise de calibração multivariada para o modelo por segmentações para os resultados do método FRAP

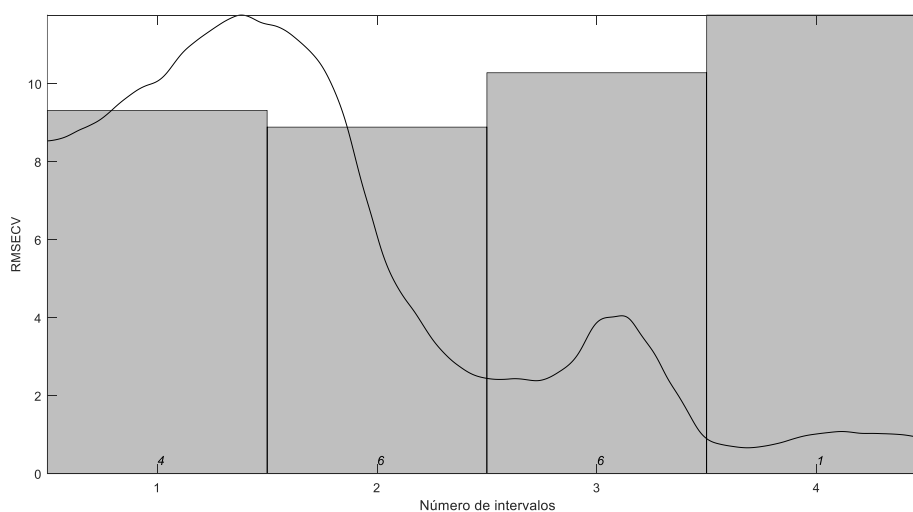
Para a análise por segmentos foi inicialmente realizado estudo do melhor intervalo espectral para se aplicar o modelo. O intervalo a ser selecionado é aquele que apresentar um maior valor do coeficiente de correlação, e menor valor de RMSECV (raiz quadrada do erro médio quadrático de validação cruzada). Em 35 intervalos resultou no modelo com menor valor de RMSECV, obtido para o segmento 4 ($1300-1474\text{ cm}^{-1}$), cujo valor foi de 8,888 e coeficiente de correlação 0,6457 como mostrado na (Figura 10).

Figura 10. Valores de RMSECV e R obtidos para os intervalos selecionados das segmentações realizadas, para o método FRAP.



O menor valor para a RMSECV (8,89) foi obtido para o intervalo com 4 segmentos, intervalo selecionado 2 e 6 variáveis latentes (Figura 11).

Figura 11 – RMSECV do modelo segmentado com 4 intervalos (1650-950 cm^{-1}); o valor em cada barra corresponde ao número de variáveis latentes que resulta no menor valor de RMSECV), para o método FRAP.



Com esses dados iniciou-se análise para a segmentação com 4 intervalos como indicado na tabela 7. Após a análise e exclusões de *outliers* que totalizaram 12 amostras no conjunto de calibração, houve uma notável melhoria do modelo que resultou nos valores (RMSECV=5,010; R=0,897).

Tabela 7 – Modelo inicial e modelos obtidos após a exclusão de *outliers* para o intervalo espectral selecionado, com o método FRAP.

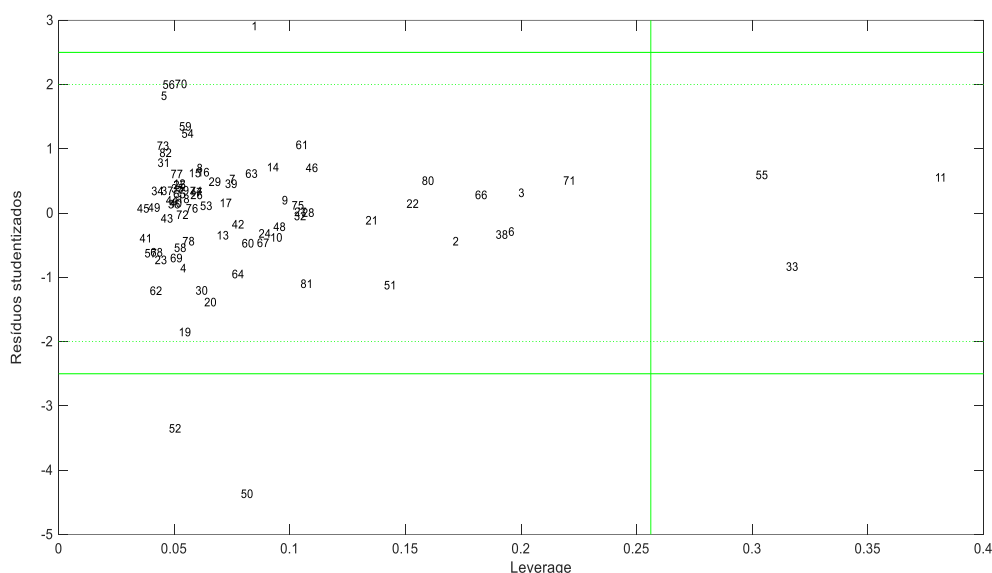
Modelo	Outliers	RMSECV	R	Variável latente
1	0	8,888	0,646	6
2	3	7,243	0,781	8
3	2	6,445	0,830	8
4	2	5,893	0,859	8
5	2	5,378	0,881	8
6	2	5,112	0,894	8
7	1	5,010	0,897	8

Para o conjunto de validação o coeficiente de correlação entre preditos e de referência foi de 0,7905. A análise de *outliers* não encontrou resultados anômalos para este conjunto de amostras.

O modelo selecionado foi avaliado com relação à presença de *outliers*, que foi realizada pela análise do gráfico dos resíduos Studentizados versus *leverage* (Figura 12) onde as três primeiras amostras foram excluídas (1, 50, 52). Estas amostras apresentaram valores de resíduos Studentizados acima da faixa de tolerância ($\pm 2,0$), e apesar de apresentarem baixos valores de *leverage* foram necessariamente excluídas na análise de amostras anômalas. Ao analisar o gráfico resíduos Studentizados versus *leverage* do modelo PLS no intervalo espectral selecionado, para o conjunto de calibração final (Figura 13), observa-se que as

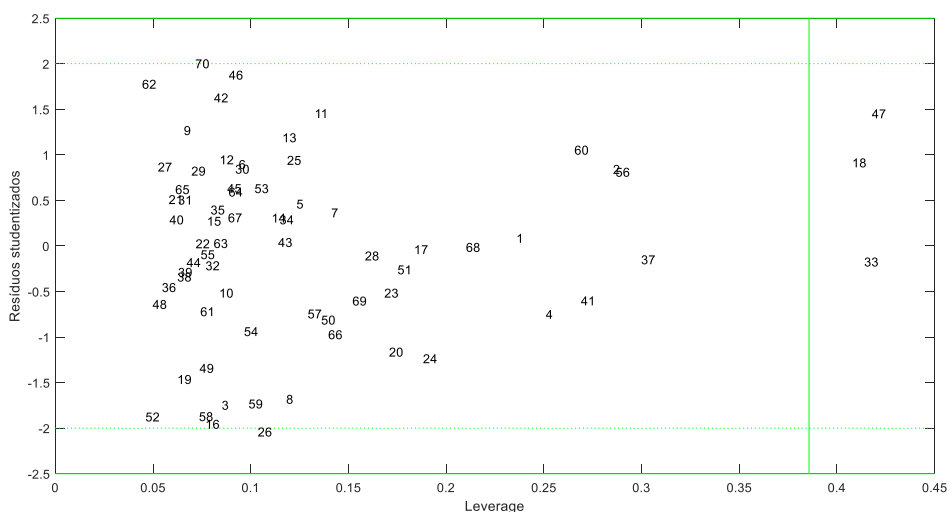
amostras estão dentro da faixa de resíduos Studentizados ($\pm 2,0$), porém três amostras (18, 33, 47) apresentaram alto valor de *leverage*.

Figura 12. Gráfico resíduos Studentizados versus *leverage* do modelo PLS, no intervalo espectral selecionado, para o conjunto de calibração com o método FRAP.



Estas não foram excluídas pois poderiam levar a diminuição da capacidade preditiva do modelo. Segundo Ferreira et al., (2009), a identificação de *outliers* é indispensável afim de assegurar a qualidade do modelo. Para isto é utilizado às duas grandezas complementares “*leverage*” e resíduos de Student.

Figura 13 - Resíduos Studentizados versus *leverage* do modelo PLS no intervalo espectral selecionado, para o conjunto de calibração final com o método FRAP.



5. CONCLUSÃO

Os modelos obtidos para a determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH apresentaram valores de RMSECV e R que não possibilitam a sua quantificação por meio da espectroscopia no infravermelho próximo associada a regressão por mínimos quadrados parciais. Entretanto o modelo global pode ser utilizado para estimar a atividade antioxidante em hidrolisados de peixe, pelo método DPPH.

Tanto o modelo global como o obtido a partir da segmentação para a determinação da atividade antioxidante pelo método FRAP apresentaram capacidade preditiva superior à obtida para os modelos do método DPPH. Estes modelos podem ser utilizados para a quantificação da atividade antioxidante pelo método FRAP. É importante destacar que o aumento do número de amostras nos conjuntos de calibração e validação pode contribuir para diminuir o valor de RMSECV resultando na melhoria do modelo.

Assim concluímos que o objetivo de desenvolver um modelo para quantificação da atividade antioxidante em hidrolisados de peixe, por meio de calibração multivariada por mínimos quadrados parciais e espectroscopia no infravermelho próximo foram alcançados e novos estudos complementares são relevantes tendo em vista a facilidade para se determinar a atividade antioxidante por infravermelho próximo.

6. REFERÊNCIAS

ANVISA. **RESOLUÇÃO CNNPA N° 17, DE 9 DE MAIO DE 1977** Fundação **Oswaldo Cruz**, 1997. Disponível em: <<http://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/13356>>

BARCELLOS, F. E. et al. Aplicação da regressão por mínimos quadrados parciais por intervalo para otimização de métodos para quantificação de sulfametoxazol e trimetoprima em medicamentos. V. 0, p. 1–11, 2007.

BENZIE, I. . F. F. . S. J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. **ANALYTICAL BIOCHEMISTRY**, v. 239, p. 70–76, 1996.

BIANCHI, M. DE L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 2, p. 123–130, 2005.

BIASUTTI, E. A. R. et al. Ação da pancreatina na obtenção de hidrolisados protéicos de soro de leite com elevado teor de oligopeptídeos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 1, p. 51–60, 2008.

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

BOSCOLO, W. R.; FEIDEN, A. **Industrialização de tilápias**, 2007.

BUENO, A. F. **Desenvolvimento de um analisador de processo por espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) para previsão de propriedades de derivados de petróleo**. Unicamp, 2011.

COZZOLINO, D. Use of infrared spectroscopy for in-field measurement and phenotyping of plant properties: Instrumentation, data analysis, and examples. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 49, n. 7, p. 564–584, 2014.

DIAS, Y. G. **Espectroscopia NIR e Calibração Multivariada Aplicadas ao Controle de Qualidade de Gases Combustíveis Naturais e Derivados do Petróleo**. UNICAMP, 2011.

FAO. **The State of Fisheries and Aquaculture in the world 2018**. Disponível em: <<http://www.fao.org/technical-cooperation-programme/en/>>. Acesso em 05/05/2019.

FERREIRA, M. M. C. et al. Quimiometria i: Calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**, v. 22, n. 5, p. 724–731, set. 1999.

FERREIRA, M. M. C. et al. Química Nova Quimiometria I : calibração multivariada , um tutorial. p. 1–16, 2009.

LIRA, L. DE F. B. DE. **Desenvolvimento de métodos analíticos para monitoramento de qualidade do Biodiesel e suas misturas**. Tese Doutorado. 2010.

LUNELLI, T. **Reciclagem de resíduos do processamento de tilápia (Oreochromis niloticus) visando obter hidrolisado proteico como coproduto**. Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2015.

NASCIMENTO, J. A. et al. Análise screening de vinhos empregando um analisador fluxo-batelada, espectroscopia UV-VIS e quimiometria. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 351–357, 2010.

NETO, B. D. B.; BRUNS, R. E. <25 Anos De Quimiometria No Brasil.pdf>. v. 29, n. 6, p. 1401–1406, 2006.

NUNES, O. L. G. S. et al. CAPACIDADE ANTIOXIDANTE EM HIDROLISADO DE TILÁPIA DO NILO. XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos. FAURGS- **food:the tree that sustains life**, p. 0–5, 2016.

OLIVIERI, A. C. et al. Uncertainty estimation and figures of merit for multivariate calibration (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 78, n. 3, p.

633–661, 2006.

PASQUINI, C. Near infrared spectroscopy: Fundamentals, practical aspects and analytical applications. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 2, p. 198–219, 2003.

SANTOS, D. A. Desenvolvimento de modelo de calibração multivariada multiproduto para quantificação de acidez e vitamina C em néctar de frutas e bebidas industrializadas a base de soja. 2015.

SANTOS, J. B. DOS. Calibração multivariada no infravermelho próximo para predição da composição química de correntes petroquímicas do processo de produção de aromáticos. Tese mestrado. 2011.

SILVA, C. A. et al. Fontes Vegetais Naturais De Antioxidantes. **Quim. Nova**, v. 32, n. 3, p. 689–702, 2009.

SKOOG & WEST & HOLLER ET AL. **FUNDAMENTOS DE QUÍMICA ANALÍTICA** v.8

SOUZA, A. M. DE et al. Experimento didático de quimiometria para calibração multivariada na determinação de paracetamol em comprimidos comerciais utilizando espectroscopia no infravermelho próximo: um tutorial, parte ii. **Quimica Nova**, v. 36, n. 7, p. 1057–1065, 2013.

SOUZA, A. V. DE; VIEIRA, M. R. DA S.; PUTTI, F. F. Correlações entre compostos fenólicos e atividade antioxidante em casca e polpa de variedades de uva de mesa
Correlations between the phenolic compounds and antioxidant activity in the skin and pulp of table grape varieties. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 21, 2018.

SOUZA, J. A. L. DE. Desenvolvimento de uma metodologia NIR para determinação do produto de degradação do captopril em comprimidos . p. 48, 2011.

SPIEGELMAN, C. H. et al. Theoretical Justification of Wavelength Selection Algorithm. v. 70, n. 1, p. 35–44, 1998.

TAKEMOTO, E.; FILHO, J. T.; GODOY, H. T. Validação de metodologia para a determinação simultânea dos antioxidantes sintéticos em óleos vegetais, margarinas e gorduras hidrogenadas por CLAE/UV. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1189–1194, 2009.

THOMAS, M. J. The Role of Free Radicals and Antioxidants: How Do We Know That They Are Working? **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 35, n. 1–2, p. 21–39, 2000.

V. BONDET, W. B.-W. AND C. B. Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH Free Radical Method. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v. 30, n. 41, p. 609–615, 9 out. 1997.

VALDERRAMA, P. “Calibração multivariada de primeira e segunda ordem e figuras de mérito na quantificação de enantiômeros por espectroscopia”. p. 219, 2009.