



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**ESTUDO E DIFERENCIAÇÃO DO PERFIL METABÓLICO DA
CARNE DO PIRARUCU - *Arapaima gigas* (*Arapaimidae*) FRESCO
E SALGADO POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR
ALIADA À QUIMIOMETRIA**

SAMUEL OLIVEIRA DA SILVA
Mestrado

Manaus/AM
2023

SAMUEL OLIVEIRA DA SILVA

**ESTUDO E DIFERENCIAÇÃO DO PERFIL METABÓLICO DA
CARNE DO PIRARUCU - *Arapaima gigas* (*Arapaimidae*) FRESCO
E SALGADO POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR
ALIADA À QUIMIOMETRIA**

Dissertação de Mestrado
apresentada ao programa de Pós-
Graduação em Química (PPGQ) da
Universidade Federal do Amazonas
(UFAM) como parte dos requisitos
para a obtenção do título de Mestre
em Química, com ênfase em
Produtos Naturais e Biomoléculas.

Prof. Dr. ALAN DIEGO DA CONCEIÇÃO SANTOS
Orientador

Prof.^a Dr.^a JAQUELINE DE ARAUJO BEZERRA
Coorientadora

Manaus/AM
Maio/2023

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S586e Silva, Samuel Oliveira da
Estudo e diferenciação do perfil metabólico da carne do pirarucu -
Arapaima gigas - (Arapaimidae) fresco e salgado por ressonância
magnética nuclear aliada à quimiometria. / Samuel Oliveira da Silva
. 2023
147 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Alan Diego da Conceição Santos
Coorientadora: Jaqueline de Araújo Bezerra
Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do
Amazonas.

1. Rmn. 2. Bacalhau da amazônia. 3. Pca. 4. Pls-da. 5. Salga. I.
Santos, Alan Diego da Conceição. II. Universidade Federal do
Amazonas III. Título



Ministério da Educação
Universidade Federal do Amazonas
Instituto de Ciências Exatas - ICE
Coordenação do Programa de Pós-Graduação
em Química



SAMUEL OLIVEIRA DA SILVA

***ESTUDO E DIFERENCIAÇÃO DO PERFIL METABÓLICO DA CARNE DO
PIRARUCU – ARAPAIMA GIGAS (ARAPAIMIDAE) FRESCO E SALGADO-
SECO POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ALIADA À
QUIMIOMETRIA***

Banca Examinadora

Doutor Alan Diego da Conceição Santos (PPGQ/UFAM)
Presidente

Doutora Priscila Ferreira de Aquino (PPGQ/UFAM)
Membro Interno

Doutor Marco Antônio dos Santos Farias (CCA/UFSCar)
Membro Externo

Manaus, 23 de maio de 2023.



Documento assinado eletronicamente por **Alan Diego da Conceição Santos, Professor do Magistério Superior**, em 19/06/2023, às 21:05, conforme horário oficial de Manaus, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Priscila Ferreira de Aquino, Usuário Externo**, em 19/06/2023, às 21:13, conforme horário oficial de Manaus, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marco Antonio dos Santos Farias, Usuário Externo**, em 20/06/2023, às 09:23, conforme horário oficial de Manaus, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufam.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1514529** e o código CRC **088CE4CE**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por todo dia me abençoar, ampliar meus horizontes e iluminar minha vida e meus caminhos.

Aos meus pais, Paulo Gama e Antônia Oliveira, meus irmãos e familiares por todo amor, carinho, força e dedicação em todos os momentos da minha vida. Agradeço por sempre apostarem, apoiarem e estarem do meu lado nas minhas decisões. À minha companheira de luta, Isabele Moraes, pelo suporte emocional e espiritual e por segurar minha mão quando eu em várias vezes pensei em desistir de tudo.

Ao Prof. Dr. Alan Diego da Conceição Santos, por ter me aceito como seu aluno, mesmo eu não conhecendo nada de RMN. Obrigado por toda orientação, companheirismo, dedicação, zelo, amizade e todo conhecimento passado durante a realização dessa pesquisa. À Prof. Dra. Jaqueline Bezerra, por toda contribuição e sabedoria no desenvolvimento desse trabalho na posição de coorientadora.

A todos os meus companheiros de laboratório e pós-graduação que conheci nessa trajetória, pela amizade, discussões, aprendizado e colaborações. Em especial, aos meus irmãos acadêmicos, Kidney Neves, por todo aprendizado e experiência, e Flávio Ricardo, pela ajuda e companheirismo na missão pirarucu.

Ao Prof. Dr. Marcos Machado, pelo seu grandioso incentivo e contribuição no meu desenvolvimento profissional, pelos ensinamentos em Ressonância Magnética Nuclear e demais técnicas de elucidação estrutural, e pela disponibilização do espaço do NMRLab para realização das minhas análises.

Ao programa de pós-graduação em Química da UFAM, pela oportunidade de desenvolver este trabalho a comunidade científica. As agências de fomento, CAPES, FAPEAM e FINEP, pelo apoio financeiro que permitiu a realização desse trabalho e pela bolsa de estudo.

Enfim, a todos que diretamente e indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho.

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado especialmente aos meus pais, Paulo Gama da Silva e Antônia Oliveira da Silva, aos meus irmãos João Paulo e Geovane e a todos os meus familiares e amigos por todo apoio e dedicação para comigo.

RESUMO

O Pirarucu (*Arapaima gigas*) também chamado de bacalhau da Amazônia, é amplamente consumido na região norte do Brasil, nas formas *in natura* e salgada-seca. No entanto, ainda hoje não há investigações quanto a composição química molecular da sua carne e nem dos efeitos que o processo de salga e secagem, realizados de forma empírica e artesanal para a obtenção do produto curado, causam diretamente a qualidade final. Nesse sentido, o objetivo desse trabalho foi investigar as diferenças do perfil metabólico da carne do pirarucu fresco e salgado-seco através da RMN de ^1H e técnicas quimiométricas. Para isso foram planejados dois experimentos, no qual as amostras de pirarucu salgado – seco foram produzidas em laboratório e outro coletando amostras comerciais em 4 zonas de Manaus. As amostras foram maceradas com auxílio de $\text{N}_2(l)$ e pesadas em 50 mg para extração direta em $550\mu\text{L}$ de D_2O contendo TMS- d_4 em quadruplicata. A mistura foi então sonicada por 30 minutos, centrifugada por 10 min. e transferida para o tubo de RMN. As análises foram feitas em um espectrômetro RMN Bruker Avance III (500,13 MHz), equipado com uma sonda BBFO. Os espectros de RMN de ^1H foram adquiridos em triplicata, a 25°C , utilizando a sequência de pulsos ZGPR seguindo os parâmetros: 32 (NS), 15s (D1), 65K (TD), 4,08 s (AQ), 128 (RG). O pulso (P1) foi calibrado para cada amostra, bem como o tuning e matching. As análises quimiométricas foram realizadas pelo software PlsToobox Solo, versão 9.0. e pelo site online *MetaboAnalyst 5.0*. A análise dos espectros de RMN 1D e 2D permitiu identificar 29 metabólitos, entre eles aminoácidos, ácidos orgânicos, carboidratos, nucleotídeos e aminas biogênicas. Nos experimentos com amostras comerciais e produzidas, a PCA revelou que PC1 foi suficiente para explicar a maior variância e que é capaz de diferenciar as amostras frescas e salgadas secas. Os metabólitos descritos no gráfico de *loadings* na PCA foram analisados por PLS-DA e avaliados através das medidas de VIP-Scores. Para o experimento produzido, foi descrito que os metabólitos creatina, glicina, taurina e ácido acético, foram responsáveis por classificarem as amostras de pirarucu fresco, enquanto apenas a creatinina, foi responsável pela classificação das amostras salgadas secas. Para o experimento com amostras comerciais, os resultados mostraram que apenas a creatina possui importância para classificar as amostras frescas, enquanto que as amostras salgadas secas foram classificadas pelos metabólitos, succinato, creatinina, ácido acético, alanina, dimetilamina e hipoxantina. A quantificação desses metabólitos na carne de pirarucu, demonstrou que na matriz fresca ocorre maior concentração (mM/g) de metabólitos relacionados ao frescor do peixe, enquanto a matriz de pirarucu salgado-seco possui maior concentração de metabólitos relacionados a produtos de degradação de aminoácidos e ácidos graxos, causados pelos processos de salga e pós processamento do pescado. Além de oferecer a primeira descrição da composição química da carne de pirarucu, o trabalho mostrou que os compostos identificados estão relacionados com parâmetros de qualidade de peixes e serão utilizados para discutir a nível molecular o processo de salga e a qualidade da carne de pirarucu, o que pode agregar o valor de mercado.

Palavras-chave: NMR- ^1H ; PCA; PLS-DA; Bacalhau da Amazônia; Salga.

ABSTRACT

The Pirarucu (*Arapaima gigas*), also known as Amazon codfish, is widely consumed in the northern region of Brazil, both in its fresh and salted-dried forms. However, to this day, there have been no investigations regarding the molecular chemical composition of its meat and the effects that the salting and drying process, carried out empirically and artisanally to obtain the cured product, directly have on the final quality. In this sense, the objective of this study was to investigate the differences in the metabolic profile of fresh and salted-dried Pirarucu meat using ^1H NMR and chemometric techniques. Two experiments were planned for this purpose, in which the samples of salted-dried Pirarucu were produced in the laboratory, and others were collected from commercial sources in 4 zones of Manaus. The samples were macerated with the aid of $\text{N}_2(\text{l})$ and weighed at 50 mg for direct extraction in 550 μL of D_2O containing TMSP-d_4 in quadruplicate. The mixture was then sonicated for 30 minutes, centrifuged for 10 minutes, and transferred to the NMR tube. The analyses were performed on a Bruker Avance III NMR spectrometer (500.13 MHz) equipped with a BBFO probe. The ^1H NMR spectra were acquired in triplicate at 25°C using the ZGPR pulse sequence following the parameters: 32 (NS), 15s (D_1), 65K (TD), 4.08 s (AQ), 128 (RG). The pulse (P_1) was calibrated for each sample, as well as tuning and matching. The chemometric analyses were performed using the PLS Toolbox Solo software, version 9.0, and the online site MetaboAnalyst 5.0. The analysis of 1D and 2D NMR spectra allowed for the identification of 29 metabolites, including amino acids, organic acids, carbohydrates, nucleotides, and biogenic amines. In the experiments with commercial and produced samples, PCA revealed that PC1 was sufficient to explain the major variance and was able to differentiate between fresh and salted-dried samples. The metabolites described in the loadings graph in PCA were analyzed by PLS-DA and evaluated using VIP-Scores. For the produced experiment, it was found that the metabolites creatine, glycine, taurine, and acetic acid were responsible for classifying the fresh Pirarucu samples, while only creatinine was responsible for classifying the salted-dried samples. For the experiment with commercial samples, the results showed that only creatine was important for classifying the fresh samples, while the salted-dried samples were classified by the metabolites succinate, creatinine, acetic acid, alanine, dimethylamine, and hypoxanthine. The quantification of these metabolites in Pirarucu meat showed that the fresh matrix had a higher concentration (mM/g) of metabolites related to fish freshness, while the salted-dried Pirarucu matrix had a higher concentration of metabolites related to the degradation products of amino acids and fatty acids, caused by the salting and post-processing of the fish. In addition to providing the first description of the chemical composition of Pirarucu meat, the study showed that the identified compounds are related to fish quality parameters and will be used to discuss, at a molecular level, the salting process and the quality of Pirarucu meat, which can add market value.

Keywords: NMR- ^1H ; PCA; PLS-DA; Amazon codfish; Salting.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

δ - deslocamento químico
Aq – tempo de aquisição
Aa – atividade de água
ATP – adenosina trifosfato
B₀ – campo magnético externo
COSY – correlation spectroscopy
CS – centro-sul
CSV – comma separated values (valores separados por virgula)
CH₃OD – metanol deuterado
D₁ – tempo de espera entre cada aquisição
D₂O – água deuterada
DMSO – dimetilsulfóxido deuterado
FID – free induction decay
HMBC – Heteronuclear Multiple Broad Correlation
HSQC – Heteronuclear Single Quantum Coherence
MHz – mega-hertz
NS – número de scans
P₁ – impulso de rádio frequência
PC – componentes principais
PCA – análise por componentes principais
PF – pirarucu fresco
PFP – pirarucu fresco produzido
PRESS – predicted residual sum of squares
PSP – pirarucu seco produzido
PLS-DA – partial least squares discriminant analysis
PS – pirarucu seco
RG – receiver gain
SSR – sum of squares of the residuals
SST – sum of squares total
RTIQ - regulamento técnico de identidade e qualidade
RPM – rotação por minuto
SW – spectral width
TMA - trimetilamina
TMSP d₄ – ácido trimetilsililpropanoico
TSS – total sum of squares
zgpr – sequencia de pré-saturação
ZL – zona leste
ZN – zona norte
ZS – zona sul

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Acondicionamento correto dos peixes em caixas isotérmicas para transporte (CHRISTOFOLETTI, 2020).	20
Figura 2. Espécie de Pirarucu (<i>Arapaima gigas</i>) comercializado no Amazonas. (WWF, 2011).	21
Figura 3. Método de processamento da técnica de salga seca esquematizada. (BERKEL, 2005).	24
Figura 4. Método de processamento da técnica de salga úmida esquematizada. (BERKEL, 2005).	25
Figura 5. Carne de pirarucu salgado em processo de secagem natural ao ar livre. CROSSA, 2011.	27
Figura 6. Estrutura química do ácido tiobarbitúrico (PINTO, 2019).	29
Figura 7. Representação gráfica dos núcleos na ausência e presença de um campo magnético externo. (PAVIA, 2010 – ADAPTADO)	30
Figura 8. Representação esquemática da sequência de pulso de supressão zgpr com os parâmetros importantes. (NASCIMENTO, 2011)	33
Figura 9. Representação esquemática da interdisciplinaridade da Quimiometria entre as ciências exatas (FERREIRA, 2015).	34
Figura 10. Representação ilustrativa de uma análise exploratória por componentes principais (PCA) com os gráficos de scores e loadings (FERREIRA, 2015).	36
Figura 11. Localização dos locais de coleta das amostras de pirarucu fresco e salgado-seco na cidade de Manaus com suas respectivas coordenadas geográficas (AUTOR, 2022).	41
Figura 12. Localização do ponto de coleta das amostras frescas de pirarucu do experimento produzido (Autor, 2023).	43
Figura 13. Esquema de corte das mantas frescas de pirarucu para o experimento produzido (Autor, 2023).	43
Figura 14. Camada de sal (NaCl) utilizada na salga do pescado produzido (Autor, 2023).	45
Figura 15. Mantas de pirarucu no processo de salga seca para o experimento produzido (Autor, 2023).	45
Figura 16. Solução para determinação do teor de cloreto pelo método de titulação (Autor, 2023).	47
Figura 17. Filé de pirarucu fresco adquirido em feiras comerciais de Manaus com as regiões de corte explícita em retângulos brancos. AUTOR, 2022.	48
Figura 18. Amostras da carne do pirarucu após o processo de maceração com nitrogênio líquido (Autor, 2022).	49
Figura 19. Tubos de eppendorf contendo a carne de pirarucu com 550 μ L de solvente deuterado (D ₂ O) para o processo de sonicação (Autor, 2022).	49
Figura 20. Método de extração empregado nas amostras de pirarucu fresco e salgado- seco adquiridas nos comércios de Manaus (Autor, 2022).	50
Figura 21. Representação gráfica da sequência de pulso zgpr usada para aquisição dos espectros de RMN de ¹ H com seus respectivos parâmetros de aquisição (Autor, 2022).	51
Figura 22. Espectros de RMN de ¹ H adquiridos em diferentes solventes deuterado: DMSO (verde); CH ₃ OD (vermelho) e D ₂ O (azul) (Autor, 2022).	60
Figura 23. Perfil espectral na região de 6,5 a 8,5 ppm entre duas amostras	

submetidas a diferente extração. Em cima, amostras com extração não deuterada; em baixo, amostras de extração direta (Autor, 2022).	60
Figura 24. Amostra da carne de pirarucu submetido a dois processos de maceração: em cima, maceração simples; em baixo, após a aplicação de nitrogênio líquido na etapa (Autor, 2022).	61
Figura 25. Perfil espectral na região de 1,0 a 2,4 ppm entre duas amostras submetidas as diferentes macerações. Em cima, amostras maceradas em N ₂ líquido; em baixo, amostras maceradas de forma simples (Autor, 2022).....	62
Figura 26. Esquema de aquisição dos dados de RMN de ¹ H para o experimento produzido e comercial.	63
Figura 27. Perfil espectral das amostras de pirarucu fresco e salgado-seco coletadas em 4 zonas distintas de Manaus (Autor, 2022).	66
Figura 28. Perfil espectral das amostras de pirarucu fresco com as principais atribuições dos metabólitos identificados (Autor, 2022).....	67
Figura 29. Perfil espectral das amostras de pirarucu salgado-seco com as principais atribuições dos metabólitos identificados.	67
Figura 30. Região de baixa frequência do espectro de RMN de ¹ H com os principais assinalamentos do A) (em cima) pirarucu fresco e B) (em baixo) pirarucu salgado-seco.	69
Figura 31. Estrutura química com os respectivos valores de deslocamento químico de RMN ¹ H e ¹³ C dos metabólitos isoleucina e leucina (em cima) valina e alanina (em baixo).....	71
Figura 32. Estrutura química com os respectivos valores de deslocamento químico de RMN ¹ H e ¹³ C dos metabólitos lactato e acetato.	72
Figura 33. Região de média frequência do espectro de RMN de ¹ H com os principais assinalamentos do A) (em cima) pirarucu fresco e B) (em baixo) pirarucu salgado-seco.	73
Figura 34. Estrutura química com os respectivos valores de deslocamento químico de RMN ¹ H e ¹³ C dos metabólitos creatina e creatinina.	74
Figura 35. Mecanismo de reação do processo de degradação da creatina em creatinina através da ciclização intramolecular.	74
Figura 36. Estrutura química com os respectivos valores de deslocamento químico de RMN ¹ H e ¹³ C dos metabólitos dimetilglicina e glicina (em cima) taurina (em baixo).	75
Figura 37. Estrutura química com os respectivos valores de deslocamento químico de RMN ¹ H e ¹³ C da dimetilamina.....	76
Figura 38. Estrutura química com os respectivos valores de deslocamento químico de RMN ¹ H e ¹³ C dos metabólitos colina e fosfocolina.....	77
Figura 39. Região de alta frequência do espectro de RMN de ¹ H com os principais assinalamentos do A) (em cima) pirarucu fresco e B) (em baixo) pirarucu salgado-seco.	78
Figura 40. Estrutura química com os respectivos valores de deslocamento químico de RMN ¹ H e ¹³ C dos metabólitos tirosina e histidina (em cima) fenilalanina (em baixo).	79
Figura 41. Estrutura química com os respectivos valores de deslocamento químico no espectro de RMN ¹ H e ¹³ C dos metabólitos fumarato e formiato.....	80
Figura 42. Estrutura química com os respectivos valores de deslocamento químico no espectro de RMN ¹ H e ¹³ C dos metabólitos inosina e hipoxantina (em	

cima) IMP (em baixo).....	81
Figura 43. Espectro de RMN de ¹ H representativo das amostras de pirarucu fresco (cima) e salgado-seco(em baixo) do experimento produzido.....	82
Figura 44. Estrutura química com os respectivos valores de deslocamento químico no espectro de RMN 1H e 13C dos metabólitos metionina e formaldeído (em cima) trimetilamina (em baixo).....	83
Figura 45. Espectro de RMN de ¹ H com a presença de um sinal sobreposto ao dubleto do lactato nas amostras de pirarucu salgado-seco.....	85
Figura 46. Matriz de dados de RMN de 1H das amostras de pirarucu comercial sem aplicação de nenhum tipo de pré-tratamento dos dados, demonstrando variações entre os espectros.....	87
Figura 47. Matriz de dados de RMN de 1H das amostras de pirarucu comerciais após a correção da linha de base e alinhamento dos sinais dos metabólitos para PCA (expansão 2,20-4,50 ppm).....	88
Figura 48. Matriz de dados de RMN de 1H após a correção da linha de base, alinhamento e normalização dos sinais dos metabólitos para PCA (expansão 2,70 -4,10 ppm).....	89
Figura 49. Matriz de dados de RMN de 1H a aplicação dos pré-processamentos sobre as variáveis e sobre os dados para análise por PCA (expansão 2,70 – 4,10 ppm).....	91
Figura 50. Gráfico de variância acumulada VS número de componentes principais para explicar a utilização de 4 PCs nesse modelo.....	92
Figura 51. Gráfico de scores da análise por PCA de espectros de RMN de 1H das amostras de pirarucu fresco e salgado seco, em PC1 e PC2.....	93
Figura 52. Gráfico de scores da análise por PCA de espectros de RMN de 1H das amostras de pirarucu fresco e salgado seco, em PC1 e PC3.....	93
Figura 53. Gráfico de scores da análise por PCA de espectros de RMN de 1H das amostras de pirarucu fresco e salgado seco, em PC1 e PC3.....	94
Figura 54. Gráfico de scores de PC1 vs PC2 dos espectros de RMN de 1H das amostras de pirarucu fresco e salgado-seco com amostras anômalas.....	95
Figura 55. Comparação entre os espectros de RMN de 1H das amostras de pirarucu salgado-seco coletado na zona leste e demais zonas de Manaus mostrando a diferença no perfil químico.....	96
Figura 56. Gráfico de Pesos para as componentes PC1 vs PC2 com as variáveis de maiores pesos na separação das matrizes de pirarucu fresco e salgado-seco.....	97
Figura 57. Gráfico de scores da análise por PCA de espectros de RMN de ¹ H das amostras de pirarucu fresco e salgado seco, considerando a região de baixa frequência.....	72
Figura 58. Gráfico de influências da análise por PCA de espectros de RMN de 1H das amostras de pirarucu fresco e salgado seco, considerando a região de baixa frequência com os metabólitos responsáveis pela discriminação entre as amostras.....	73
Figura 59. Gráfico de scores da análise por PCA de espectros de RMN de ¹ H das amostras de pirarucu fresco e salgado seco, considerando a região de média frequência.....	74
Figura 60. Gráfico de influências da análise por PCA de espectros de RMN de 1H das amostras de pirarucu fresco e salgado seco, considerando a região de média	

frequência os com os metabolitos responsáveis pela discriminação entre as amostras.	75
Figura 61. Gráfico de influências da análise de PC2 de espectros de RMN de 1H das amostras de pirarucu fresco e salgado seco, considerando a região de média frequência os com os metabolitos responsáveis pela discriminação entre as amostras.	76
Figura 62. Comparação entre os espectros de RMN de 1H das amostras de pirarucu salgado-seco coletados na zona centro-sul com as demais zonas de coleta, demonstrando a ausência da creatinina.	76
Figura 63. Gráfico de scores da análise por PCA de espectros de RMN de 1H das amostras de pirarucu fresco e salgado seco, considerando a região de alta frequência.	77
Figura 64. Gráfico de influências da análise por PCA de espectros de RMN de 1H das amostras de pirarucu fresco e salgado seco, considerando a região de alta frequência os com os metabolitos responsáveis pela discriminação entre as amostras.	78
Figura 65. Gráfico de correlação entre a quantidade de PCs para o modelo e a variancia capturada no experimento produzido.	80
Figura 66. Gráfico de scores (PC1 vs PC2) das amostras de pirarucu fresco e salgado seco de pirarucu no experimento produzido.	81
Figura 67. Gráfico de loadings de PC1 das amostras de pirarucu fresco e salgado seco produzido.	82
Figura 68. Gráfico de scores do método de PLS-DA das amostras de pirarucu frescas e salgadas-secas comerciais.	83
Figura 69. Gráfico de loadings do método de PLS-DA das amostras frescas e salgadas secas comerciais com os metabólitos discriminantes.	84
Figura 70. Gráfico da performance do modelo PLS-DA comparandos os valores de acurácia, R2 e Q2 em relação ao número de componentes para o experimento comercial.	86
Figura 71. Teste de permutação do modelo de PLS-DA em relação a frequência para o experimento comercial.	87
Figura 72. Gráfico de VipScores para os metabolitos visualizados no modelo PLS-DA das amostras comerciais.	88
Figura 73. Gráfico de scores do método de PLS-DA das amostras de pirarucu frescas e salgadas-secas produzidas.	89
Figura 74. Gráfico de loadings do método de PLS-DA das amostras frescas e salgadas secas produzidas com os metabólitos discriminantes.	90
Figura 75. Gráfico da performance do modelo PLS-DA comparandos os valores de acurácia, R2 e Q2 em relação ao número de componentes para o experimento produzido.	91
Figura 76. Teste de permutação do modelo de PLS-DA em relação a frequência para o experimento produzido.	92
Figura 77. Gráfico de VipScores para os metabolitos visualizados no modelo PLS-DA das amostras produzidas.	93
Figura 78. Análise gráfica da variação de concentração de taurina e creatina nas zonas de coleta do experimento comercial.	98
Figura 79. Análise gráfica da variação de concentração de succinato, creatinina e hipoxantina nas zonas de coleta do experimento comercial.	98

Figura 80. Parametros de aquisição de RMN de ^1H das amostras de pirarucu comercial e produzido.	113
Figura 81. Experimento 2D de correlação heteronuclear (HSQC) das amostras de pirarucu comercial.	114
Figura 82. Espectro de RMN 2D de correlação heteronuclear (HMBC) das amostras de pirarucu comercial.	115
Figura 83. Experimento de RMN 2D de correlação homonuclear (COSY) das amostras de pirarucu produzidas.	116
Figura 84. Espectro de RMN 2D de correlação heteronuclear (HSQC) das amostras de pirarucu produzidas.	117
Figura 85. Espectro de RMN 2D de correlação heteronuclear (HMBC) das amostras de pirarucu produzido.	118

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição centesimal das principais espécies de peixes encontrados no Amazonas.	22
Tabela 2. Códigos das amostras comerciais de pirarucu coletadas em feiras da cidade de Manaus.	42
Tabela 3. Massas das amostras de pirarucu fresco para realização da etapa de salga.	44
Tabela 4. Valores dos teores de água nas amostras de pirarucu após o processo de salga e secagem no experimento produzido.	57
Tabela 5. Valores dos teores de cloretos nas amostras de pirarucu salgada seca do experimento produzido.	58
Tabela 6. Metabólitos identificados nos experimentos de RMN de ¹ H no experimento comercial e produzido.	64
Tabela 7. Valores de acuracia, R2 e Q2 obtidos na validação cruzada do modelo PLS-DA em relação a quantidade de PCs utilizadas.	85
Tabela 8. Valores de acuracia, R2 e Q2 obtidos na validação cruzada do modelo PLS-DA do experimento produzido em relação a quantidade de PCs utilizadas. .	91
Tabela 9. Quantificação dos metabólitos mais importantes para a discriminação das amostras de pirarucu fresco e salgado-seco expressos em mMol / g ⁻¹	95
Tabela 10. Quantificação dos metabólitos mais importantes para a discriminação das amostras de pirarucu fresco e salgado-seco expressos em mMol / g-1 do experimento comercial.	97

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	18
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	19
3.1. Pescado na Região Norte do Brasil.....	19
3.1.1. O Pirarucu (<i>Arapaima gigas</i>)	21
3.1.2. Processos de Salga e Secagem.....	23
3.1.3. Controle de qualidade de peixes	27
3.2. A Ressonância Magnética Nuclear.....	29
3.2.1. A sequência de pulso ZGPR	32
3.3. Quimiometria aplicada a RMN de ¹ H	33
3.3.1. Análise exploratória dos dados.....	34
3.4 Quantificação relativa de metabólitos por RMNq.....	38
4. MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1 Obtenção das Amostras	41
4.2 Aquisição dos parâmetros físico-químicos.....	46
4.3 Processo de extração dos metabólitos.....	48
4.4 Aquisição dos espectros de RMN de ¹ H.....	51
4.5 Aquisição de dados quimiométricos	52
4.6 Quantificação dos metabólitos	54
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1 Amostragem do Experimento Comercial.....	55
5.2 Teor de Água e de Cloreto das Amostras de pirarucu salgado-seco produzidas.....	56
5.3 Investigação do Método de Extração dos Metabólitos	59
5.3.1 Microextração em solvente comum ou deuterado	59
5.3.2 Influência do método de maceração.....	61
5.2 Análise do Perfil Espectral por RMN de ¹ H.....	63
5.4.1 Perfil Metabólico das Amostras Comerciais	66
5.4.2 Perfil Metabólico das Amostras Produzidas	81
5.5 Análise dos Dados Quimiométricos	86
5.5.1 Etapa de Pré-processamento dos dados.....	86
5.5.2 Análise por componentes principais (PCA) das amostras comerciais	91
5.5.3 Análise por componentes principais (PCA) das amostras produzidas	79
5.5.4 Métodos de Classificação Supervisionada das Amostras Comerciais	82
5.5.5 Métodos de Classificação Supervisionada das Amostras Produzidas	88

5.6	Quantificação dos metabólitos discriminantes por RMNq	94
6	CONCLUSÃO.....	99
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	101
8	APÊNDICE	113

1. INTRODUÇÃO

A conservação das características físicas e químicas é um dos pilares na determinação da qualidade de várias fontes de alimentos. O princípio geral da conservação é manter a qualidade e o valor nutricional dos alimentos por períodos mais longos, através de processos que evitem a deterioração. No contexto amazônico, esse processo de conservação desempenha um papel fundamental na produção de carne de pescado, a fonte de alimento mais importante dessa região. De acordo com Soares e Gonçalves (2012), a carne do pescado possui uma constituição química nutricionalmente rica, sendo uma das principais fontes de proteína, contendo todos os aminoácidos essenciais ao homem - além de ser rica em ácidos graxos poli-insaturados do grupo ômega-3 e possuir baixo teor de colesterol. Infelizmente, a carne de pescado apresenta alto potencial de deterioração.

O processo de salgamento e secagem é um dos meios de conservação de alimentos mais utilizados na região amazônica. A salga tem como objetivo principal, aumentar a estabilidade microbiana, química e bioquímica, resultando no melhoramento das características físicas e químicas do produto submetido ao processo (ALVES, 2010). Em contrapartida, Carvalho (2012) afirma que a aplicação de certa quantidade de sal no pescado pode ocasionar grande desnaturação protéica, aparência desagradável devido ao contato com o oxigênio e baixo rendimento do produto.

Embora as técnicas de salga e secagem modifiquem a composição química dos alimentos, alterando o sabor e ocasionando a perda de nutrientes, as vantagens associadas a elas - por exemplo, o aumento do tempo de prateleira do produto, o aumento do teor de nutrientes, a facilitação do transporte e comercialização e o baixo custo associado ao processo - são atraentes e chamam a atenção da indústria alimentícia (REIS, 2015).

Um dos pescados que tem gerado significativa procura nas prateleiras de supermercados e feiras da região Norte é o Pirarucu (*Arapaima gigas*). Na região norte do Brasil, é considerado uma iguaria devido à qualidade de sua carne, sabor e ausência de espinhos no filé, conhecido , dessa forma, de

“bacalhau de água doce” ou ainda “bacalhau da Amazônia” (ITUASSU, 2005). O pirarucu é comercializado em grande escala, além de ser considerado uma importante fonte de renda para pescadores que residem em regiões próximas à bacia Amazônica (CASTELLO et al., 2011).

Nessa perspectiva o entendimento do processo de salga e secagem, bem como os seus efeitos na constituição química da carne do Pirarucu é de grande relevância. Uma vez entendido o efeito que tais métodos podem causar na qualidade do peixe, será possível aperfeiçoar o processo de salga e secagem desse alimento, contribuindo assim para o aumento da qualidade do produto e, conseqüentemente, o aumento do valor agregado ao do produto.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Investigar a diferença na composição química da carne de pirarucu (*Arapaima gigas*) fresco e salgado-seco via ressonância magnética nuclear e técnicas quimiométricas.

2.2 Específicos

- ❖ Produzir amostras de pirarucu salgado-seco em laboratório e definir os locais de coletas das amostras frescas e salgadas-secas comerciais de pirarucu;
- ❖ Testar as principais metodologias de extração empregadas em estudos de peixes por ressonância magnética nuclear;
- ❖ Definir os parâmetros de aquisição dos espectros de RMN das amostras de pirarucu;
- ❖ Adquirir e analisar os espectros de RMN em uma e duas dimensões para identificar os principais metabólitos presentes na carne de pirarucu;
- ❖ Aplicar métodos de análise multivariada para a diferenciação dos perfis químicos da carne de pirarucu fresca e salgada-seca produzidas em laboratório e amostras comerciais;
- ❖ Quantificar os metabólitos responsáveis pela discriminação das amostras e que possam ser relacionados com o processo de salga e com a qualidade do produto final;
- ❖ Adquirir dados de parâmetros físico-químicos das amostras produzidas de pirarucu.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Pescado na Região Norte do Brasil

A região norte do Brasil ocupa uma área de aproximadamente 3,87 milhões de km², o que equivale a 45,3% do território nacional (COSTA, 2016). Cercada por grandes rios, a bacia hidrográfica principal é a Amazônica, que apresenta ampla diversidade de espécies de peixes de água doce.

No Brasil, assim como no mundo, o pescado vem se destacando como fonte de proteína animal. Segundo os dados da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), o consumo de peixe, até o ano de 2030, deverá ser de mais de 33%. Essa procura pelo pescado está relacionada às informações sobre o seu valor nutricional e de sua associação com melhorias na saúde. Entre os benefícios, pode-se citar a redução dos níveis de colesterol e as menores incidências de acidentes vasculares cerebrais (AVC) (MACIEL, 2012).

Os estudos realizados pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), através da pesquisa de orçamento familiar (POF), demonstraram que o consumo *per capita* de pescado no Brasil, é de aproximadamente 4,6 kg/ano, em áreas rurais e interioranas, 9,9 kg/ano e nos centros urbanos, 3,4 kg/ano. Quando se compara o consumo por regiões, a região norte do Brasil apresenta valores de 24,6 kg/ano, muito acima das outras regiões e da média do país (BRASIL, 2010).

A região norte, é a única região do Brasil em que a população possui preferência por peixes em suas refeições. Isso se deve ao fato da pesca extrativista ser uma das principais atividades desta região, sendo essa a atividade responsável pelo abastecimento das comunidades urbanas, principalmente da comunidade ribeirinha. A ampla oferta desse alimento nessa região influencia potencialmente a tendência do consumo da carne de peixes em detrimento de outros tipos de carne (LOPES, 2016).

No entanto, alguns problemas dificultam a expansão do comércio de pescado entre a população no geral, as atividades de processamento da carne do

pescado na região norte, não são adequadamente divulgados para o consumidor, portanto causam incertezas sobre a qualidade do produto adquirido nos comércios (LOPES, 2016).

As técnicas de abate e conservação da carne do pescado são determinadas pelos hábitos culturais dos pescadores. Um dos processos de abate mais utilizado na região norte é a asfixia do peixe, sendo essa técnica não recomendada, uma vez que promove a rápida deterioração da carne do pescado e reduz drasticamente as reservas de energia; como consequência, há um acúmulo de substâncias químicas que resultam em sabor indesejado no peixe (FREIRE, 2013).

Uma das formas de garantir maior qualidade na carne do peixe nos comércios é a utilização de técnicas de conservação do alimento, como o uso de grandes quantidades de sal, processos de defumação e aplicação de camadas de gelo com o objetivo de aumentar a vida útil do pescado nas prateleiras. A aplicação das técnicas de conservação, como a salga e a adição de gelo, deve levar em consideração fatores importantes, como a qualidade da água na fabricação do gelo e a qualidade do sal a ser aplicado no processo de salga (CHICRALA, 2020).

Além da qualidade do produto a ser utilizado para conservar a carne do animal, outro fator de suma importância a se definir é a forma de acondicionamento nas caixas isotérmicas. Entre as principais formas na região norte, prevalece a forma intercalada (Figura 1), onde são feitas camadas alternadas entre o pescado e a camada de gelo, de modo a permitir que todos os pescados estejam cobertos até o momento de transporte.

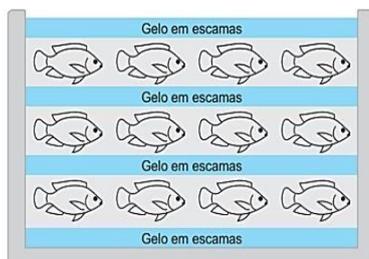


Figura 1. Acondicionamento correto dos peixes em caixas isotérmicas para transporte (CHRISTOFOLETTI, 2020).

3.1.1. O Pirarucu (*Arapaima gigas*)

Dentre os principais pescados encontrados na região amazônica, o mais popular entre os habitantes e pessoas que apreciam a culinária amazonense é o pirarucu (*Arapaima gigas*) (Figura 2). Trata-se do maior peixe de água doce do Brasil entre as espécies com textura escamosa (BEZERRA, 2014), e é rico em proteínas e aminoácidos essenciais e não essenciais para o ser humano.



Figura 2. Espécie de Pirarucu (*Arapaima gigas*) comercializado no Amazonas. (WWF, 2011).

O *Arapaima gigas* é um dos mais antigos representantes da família Arapaimidae, cuja linhagem tem origem no período jurássico (SOUSA, 2017). Dependendo da localidade onde se encontra, pode ser conhecido por outras denominações, como por exemplo: paiche, nas regiões do Peru e Equador; piroasca, no Estado de Tocantins; arapaima, na região da Guiana e por fim, nas localidades ribeirinhas do Amazonas é conhecido pelo nome de bodecos. Porém, de acordo com Rodrigues (2015), a etimologia da palavra “pirarucu” vem de origem Tupi-Guarani, onde “pira” significa peixe e “urucu” quer dizer vermelho. Essa denominação está relacionada à coloração vermelha, na orla posterior das escamas do Pirarucu (SOUSA, 2017).

O Pirarucu pertence à Classe *Actinopterygii*, Ordem *Osteoglossiforme*, Família das *Arapaimidae*, Gênero *Arapaima* e Espécie *Arapaima Gigas* (Gonzaga Junior e colaboradores, 2010). É um peixe que é encontrado principalmente nas áreas de várzea, pela característica das águas serem mais serenas. O *A. gigas*

habita em lagos e rios de águas claras, ligeiramente alcalinas, onde as temperaturas variam entre 24°C e 37°C, não sendo encontrados em águas ricas em sedimentos (SANTANA, 2009).

Os aspectos químicos e bromatológicos do *A. gigas* são pouco conhecidos. Porém, sabe-se que as partes do Pirarucu podem ser utilizadas para um significativo número de processos. Por exemplo, a carcaça do pescado é rica em proteínas e outros nutrientes e pode ser utilizada na produção de novos produtos alimentícios de interesse industrial (PAIVA, 2014). A composição química dos principais peixes da região amazônica está relacionada com a alimentação e do local em que estes habitam. O pirarucu apresenta valores de proteínas maiores quando comparados a outros peixes, conforme pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1. Composição centesimal das principais espécies de peixes encontrados no Amazonas.

Espécie	Umidade (%)	Proteína (%)	Gordura (%)	Cinza (%)	Referência
Tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>)	74,33 (F) 79,42 (S)	17,01(F) 16,74(S)	7,60(F) 2,66(S)	0,95(F) 1,18(S)	Almeida (1998)
Matrinxã (<i>Brycon cephalus</i>)	72,33(F) 74,15(S)	18,43(F) 16,74(S)	7,49(F) 5,55(S)	0,98(F) 0,88(S)	Batista (2002)
Pirarucu (<i>Arapaima gigas</i>)	79,80(F) 80,40(S)	18,30(F) 18,00(S)	0,2(F) 0,4(S)	1,70(F) 0,70(S)	Carvalho (1998)

Legendas: F (pirarucu fresco); S (pirarucu seco).

De acordo com Nunes (2011), os valores nutritivos do pirarucu são superiores ao do bacalhau, particularmente, o teor de proteína que é elevado e superior aos valores encontrados no salmão e na sardinha. Experimentos feitos por Oliveira (2007) comprovaram que o processo de salgamento e secagem aumentam os valores da concentração de proteínas, lipídeos e cinzas em comparação com o pescado fresco.

O pirarucu tem chamado atenção também de piscicultores e empresas do ramo aquícola. Isso se dá devido às suas características atrativas para o

cultivo, tais como crescimento acelerado e expressivo ganho de peso, podendo atingir até 3 metros de comprimento e alcançar até 10 kg no primeiro ano de cultivo (CIPRIANO et al., 2016). O rendimento do Pirarucu na piscicultura atinge valores de 41% a 57% para filés de pirarucu capturados diretamente da natureza (NUNES, 2011).

Visando evitar uma redução dos estoques naturais do Pirarucu e estimular a produção, o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), instituiu uma portaria que determinava que o tamanho do Pirarucu pescado não pudesse ser menor que 150 cm (BRASIL, 1987). Mais tarde, por meio da portaria 480 de 04 de Março de 1991, ficou proibido a pesca do peixe no período de 01 de Dezembro a 31 de Maio, classificado dessa forma como o período de defeso do Pirarucu. Atualmente a pesca de pirarucu está proibida no estado do Amazonas, salvo apenas em áreas de reservas, por meio de cotas de pesca (BRASIL, 2005).

3.1.2. Processos de Salga e Secagem

Os fatores mais importantes na escolha do método de conservação de alimentos em geral são a qualidade final desejada do produto e o seu custo de mercado. Por isso, o emprego de técnicas de conservação de alimentos é um fator fundamental na valorização do produto em questão. Entre as práticas mais utilizadas, destacam-se os processos de salgamento e secagem.

A técnica de salga está baseada na inserção do sal nos interiores dos tecidos alimentícios (ALVES, 2010). Trata-se de uma desidratação mediante a utilização de sal de boa qualidade, contendo 98% de cloreto de sódio (NaCl) com impurezas de sais de cálcio e magnésio abaixo de 0,4% (SILVA, 2015) . De acordo com Medina (2002), o cloreto de sódio é considerado um ótimo agente desidratante, por apresentar uma alta capacidade de redução da atividade de água. Uma vez reduzida a quantidade de água presente no meio, ocorre a redução do desenvolvimento de microrganismos que causam a deterioração do

alimento (CORRÊA, 2011). Além disso, como descreve Silva (2000), essas mesmas condições reduzem a atividade de enzimas que são responsáveis de produzir transformações químicas em alimentos e em outros materiais biológicos.

Por outro lado, a aplicação do sal na superfície do pescado deve ser administrada de maneira controlada. Uma quantidade excessiva de sal pode levar a desidratação de proteínas miofibrilares. (REIS, 2015). Tecidos animais quando em contato com o sal possuem seus íons atraídos na região de moléculas de proteínas que possuem tendência a cargas elétricas, como por exemplo, os grupamentos amino (NH_2) de aminoácidos como a lisina, e o grupamento carboxil (COOH) do ácido aspártico e ácido glutâmico, principais responsáveis pelas trocas iônicas, atração e fixação das moléculas de água (GOMIDE, 2005).

Apesar da variedade dos processos de salga, uma técnica muito utilizada pelos produtores e comerciantes de pescado é a salga seca, que consiste no empilhamento do peixe em camadas intercaladas com sal, para que toda a superfície da manta esteja uniformemente coberta (CARVALHO, 2012). Nesse processo o cloreto de sódio sofre dissolução sobre a carne do peixe, que penetra os interiores do pescado por difusão, drenando a água do músculo para camadas mais externas por meio da osmose (CHAVES, 2013). (Figura 3)



Figura 3. Método de processamento da técnica de salga seca esquematizada. (BERKEL, 2005).

A principal vantagem desse método de salga é a rápida desidratação, o que é muito importante para o controle de qualidade. De acordo com Chaves (2013), a desvantagem da utilização desse método está na possibilidade de grande desnaturação proteica. Por conta disso, o processo de salga seca deve ser controlada cuidadosamente, desde a quantidade de sal a temperatura de preparação usada visto que nesse processo há a possibilidade de contaminação por bactérias halófilas e fungos pardo, decorrente da baixa atividade de água e alta concentração de sal no pescado (CATELAN, 2018).

A salga úmida ou salga em salmoura (Figura 4), consiste em um processo em que o pescado é imerso em uma salmoura pré-preparada em uma concentração específica. Dessa forma, a solução saturada de cloreto de sódio fica no recipiente que contém o peixe, o que assegura uma baixa concentração de oxigênio no meio, e com isso a proteção da gordura no processo de oxidação (CATELAN, 2018).

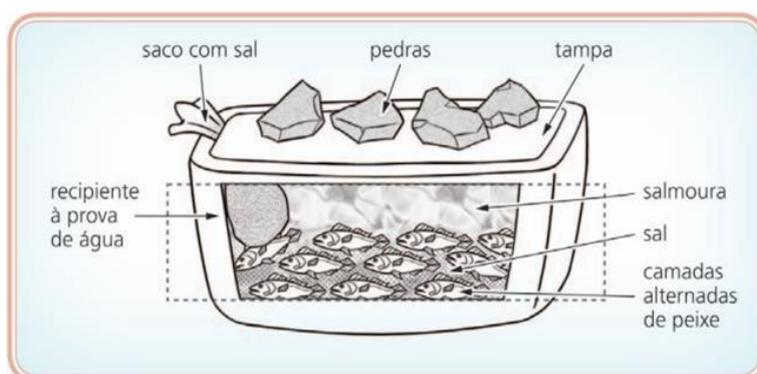


Figura 4. Método de processamento da técnica de salga úmida esquematizada. (BERKEL, 2005).

No Brasil, esse método é recomendado tanto para espécies magras quanto para gordas, tais como o pirarucu (magras), sardinha (gorda), pacu (gorda) e tambaqui (magras). Para que o processo se torne mais eficaz e mantenha a concentração de sal homogênea é necessário fazer agitação na salmoura. A ausência da homogeneização da salmoura pode aumentar o tempo de salga ocasionando problemas ao produto final.

Outro método de salga é a salga mista. Tal técnica é classificada como um método intermediário, uma vez que se inicia pelo processo de salga seca em

tanques, em seguida, é aproveitado a água de desidratação para a salga úmida (MINOZZO, 2011). De acordo com Gudjóndóttir e colaboradores (2011), os peixes são colocados em camadas alternadas, e o líquido extraído do músculo dissolve os cristais de sal, dando origem à salmoura. Segundo Chaves (2013) esse processo pode ser empregado tanto em pescado magro quanto em pescado gordo, uma vez que há certa proteção das frações lipídicas, reduzindo a possibilidade de oxidação do pescado.

Apesar de ser simples, a não realização dessa técnica de maneira correta acarretará em perdas significativas da qualidade dos produtos que são submetidos a salga (GOMIDE, 2005). Catelan e colaboradores (2018) afirmam que a simplicidade da técnica de salga mista tem tornado a prática bastante empregada devido ao fato de não precisar de recipiente especial para a imersão da salmoura, sendo que, neste caso, utiliza-se o próprio recipiente de alvenaria que foi usado na salga seca, com um sistema de peso que garanta que o pescado fique imerso.

O processo de salga é comumente seguido pela secagem. De acordo com Celestino (2010), a secagem é uma operação de remoção de água e ou qualquer líquido por centrifugação ou por vaporização. O tipo de secagem a ser utilizado depende da matriz alimentar a ser desidratada, bem como da sua constituição química. Dessa forma, a eficiência do processo depende das propriedades físico-químicas do alimento, das propriedades do ar e a sua temperatura (PARK et al., 2002).

O método de secagem como método de conservação baseia-se pelo fato de que tanto os microrganismos presentes na carne do produto como as enzimas que participam de todo o mecanismo metabólico precisam de água para suas atividades. Com a redução da quantidade de água disponível até níveis seguros para armazenagem, serão reduzidos a atividade de água, a velocidade das reações químicas no produto e o desenvolvimento de microrganismos não desejáveis na carne do pescado (GONELI, et al., 2007).

A secagem do pescado pode ser realizada de forma natural ou artificial. A secagem natural consiste no processo realizado ao ar livre, em umidades

baixas e na presença de calor solar (Figura 5). A dependência das condições climáticas favoráveis é uma desvantagem para o método natural. Por outro lado, a secagem artificial é um método que utiliza equipamentos com termodinâmica de secagem controlável. O controle dos níveis de umidade é uma característica vantajosa para essa técnica.



Figura 5. Carne de pirarucu salgado em processo de secagem natural ao ar livre. CROSSA, 2011.

De acordo com Celestino (2010) as principais vantagens do processo de secagem são: o aumento do tempo de prateleira do produto; o teor de nutrientes torna-se concentrado, devido à remoção da água; praticidade no transporte e comercialização; baixocusto ao emprego do método.

3.1.3. Controle de qualidade de peixes

As técnicas de salga e secagem empregadas no pirarucu são consideradas fáceis de aplicação, porém, são executadas de forma empírica e arbitrária. De acordo com o World Wildlife Fund (WWF), deve ser utilizada uma quantidade de sal equivalente a 30% do peso do filé ou 1 kg de sal para 3 kg de manta de pirarucu. No entanto, a grande maioria dos comerciantes não utilizam tais proporções (OVIEDO, 2011). A adoção de técnicas descritas pelos órgãos

regulamentadores contribuem para a padronização e economia do processo de conservação do peixe.

Entre os estudos da qualidade química e microbiológica da carne do pirarucu salgado-seco, têm sido relatadas algumas contaminações microbianas, que servem como indicadores de condições higiênicas no processo de produção e ou pós-processamento. A presença de alguns microrganismos tendem a representar possíveis falhas na produção do pescado, alguns organismos podem ser considerados perigosos por produzirem toxinas deletérias à saúde (SÃO JOSE et al, 2019).

A instrução normativa nº 1, de 15 de Janeiro de 2019, através do ministério da agricultura, pecuária e abastecimento (MAPA), estabelece que a carne do pescado deve obedecer aos critérios microbiológicos quanto a presença de *Salmonella ssp.*; *Staphylococcuscoagulase positiva*; e *Escherichia coli*. Dois estudos abaixo indicam que o pirarucu salgado seco disponibilizado para compra pelos consumidores varejistas é predominantemente impróprio para consumo humano. Nunes e seus colaboradores publicaram em 2012, os resultados das análises microbiológicas realizadas em amostras de pirarucu adquiridas em feiras e supermercados na cidade de Belém – PA, demonstrando que 23,1% e 26,9% das amostras apresentaram a presença de *Salmonella ssp* e valores acima dos limites de coliformes termotolerantes nas amostras adquiridas em feiras da capital. Vasconcelos e colaboradores em 2014, com amostras de pirarucu coletadas em feiras de Manaus – AM, demonstraram total ausência de *Salmonella ssp*; no entanto, as concentrações de *Staphylococcus coagulase* apresentaram níveis superiores aos estipulados pela legislação em 100% das amostras coletadas (VASCONCELOS, 2014).

Além da qualidade microbiológica, outro fator importante a ser levado em consideração é a presença de indicadores químicos do processo de deterioração da carne do pirarucu. Os compostos de ácidos graxos presentes nas amostras de peixe são suscetíveis a processos oxidativos causados pelo contato com a atmosfera, ocasionando sabores indesejados e perda da qualidade da carne do pescado (OLIVEIRA, 2021). O ácido tiobarbitúrico (TBA) (Figura 6) já foi

relatado como indicador de estados oxidativos da carne do pescado. No trabalho de Santos (2011) foi detectado valores de 5,20 mg/kg presente nas amostras da carne de pirarucu seco coletadas em Fonte Boa – AM. Os valores de ácido tiobarbitúrico acima de 1,5 mg/kg estão relacionados a odores característicos de rancidez nas amostras de peixe.

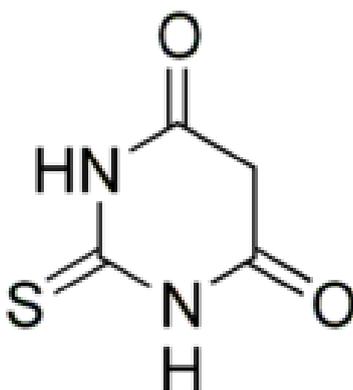


Figura 6. Estrutura química do ácido tiobarbitúrico (PINTO, 2019).

Outros compostos químicos, como os aminoácidos livres, são indicadores do processo de deterioração, pois sofrem transformações em suas moléculas por ação microbiana. Os metabólitos, espermina, trimetilamina, espermidina, cadaverina, histamina e amônia, são as mais relatadas e estão diretamente relacionadas às mudanças no odor da carne do peixe e ocorrências de situações indesejadas (VISCIANO, 2020). No entanto, ainda não há nenhum índice máximo nas legislações, para determinar a qualidade química através da presença dessas substâncias destacadas.

3.2. A Ressonância Magnética Nuclear

O fenômeno de ressonância magnética nuclear ocorre quando os núcleos alinhados com um campo aplicado são induzidos a absorver e emitir a energia e a mudar suas orientações de spin em relação ao campo aplicado (PAVIA, 2010). Essa interação entre o spin nuclear de um átomo com o campo magnético externo resulta em sinais que demonstram a intensidade em função do tempo, que após a aplicação de um processo matemático denominado “transformada de fourier”, resulta em um gráfico de intensidade do sinal em

função da frequência (CONSTANTINO, 1999).

A técnica está relacionada com a interação da radiação eletromagnética com a matéria e a maneira como essa interação ocorre, depende da estrutura da espécie atômica ou molecular a ser estudada (VENÂNCIO, 2005). Na ausência de B_0 , os núcleos se encontram em estados degenerados de energia, apresentando uma distribuição aleatória dos *spins*. Quando na presença do B_0 , a degenerescência dos estados é rompida em níveis quantizados de energia e direção e podem adotar um número limitado de orientações de diferentes energias, no entanto, apenas núcleos ativos magneticamente, ou seja, aqueles que apresentam momento de *spin* não nulo (*spin* $I \neq 0$), ao serem submetidos a um campo magnético B_0 serão percebidos pelo fenômeno de ressonância. (Figura 7)

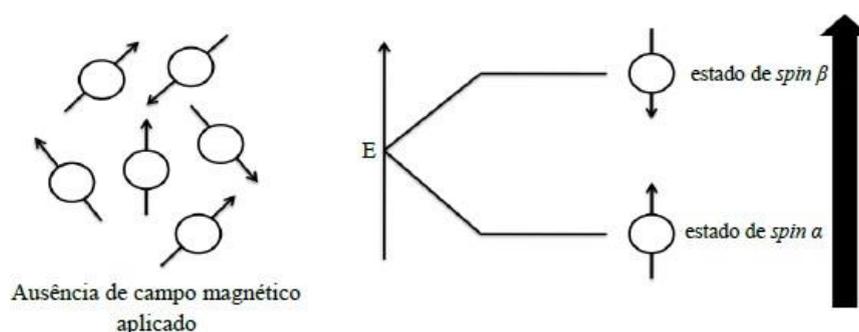


Figura 7. Representação gráfica dos núcleos na ausência e presença de um campo magnético externo. (PAVIA, 2010 – ADAPTADO)

Os spins em excesso que se encontram no estado de mais baixa energia são excitados ao receber um pulso de radiofrequência, gerado por um campo de natureza oscilante, perpendicular ao campo principal aplicado, e de mesma magnitude da frequência de precessão. A frequência específica em que cada núcleo sofre precessão é determinado pela equação de *Larmor* (SANTANA, 2013). Após a finalização do campo de natureza oscilante é cessado, os spins outrora excitados entram em processo de decaimento de energia, denominado decaimento livre de indução (*Free Induction Decay* - FID) que é recebido por uma bobina no domínio do tempo onde é aplicada a transformada de *Fourier*, mostrando os sinais no domínio da frequência.

A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma técnica que abrange diversos campos de aplicação na área de química de produtos naturais. Entre as inúmeras aplicações dentro do campo da química, pode se citar a determinação estrutural de compostos orgânicos e inorgânicos; a quantificação de metabólitos em extratos de matrizes vegetais e animais; e a análise de tecidos intactos, água, gordura em alimentos e em outros sistemas biológicos (DUYNHOVEN, 2010).

Por ser uma técnica que interage com a matéria pela radiação eletromagnética, a RMN tem gerado significativo destaque científico, visto que não é uma técnica invasiva e destrutiva da amostra, além disso, a RMN é considerada uma técnica rápida e segura para o pesquisador e não gera poluição ambiental (ERIKSON et al., 2012).

No entanto, dentre as desvantagens da técnica de RMN de ^1H , a sensibilidade relativamente baixa na espectroscopia de RMN é a principal em comparação com outras tecnologias usadas na análise de alimentos. Essa sensibilidade do experimento depende da instrumentação a ser utilizada no processo, principalmente da força do campo magnético, do tipo de experimento (núcleo, sequência de pulso, parâmetros de aquisição) e da natureza da amostra, tais fatores estão diretamente relacionados e interferem na resolução do espectro (TANG, 2019).

Em materiais biológicos, a RMN de alto campo é significativamente adequada e sua aplicabilidade tem se mostrado efetiva na análise de alimentos, tais como de peixes e produtos de pesca. As fraudes alimentares, autenticação de alimentos, processo de armazenamento e processamento de alimentos são problemas que podem ser monitorados e resolvidos pela aplicação da ressonância magnética nuclear para análise de metabólitos presentes nesses alimentos (SAMUELSSON, 2008).

Dentre as aplicações da RMN na análise da carne do pescado, Martinez e colaboradores (2005), conseguiram demonstrar as diferenças entre o Bacalhau (*Gadus Morhua*) congelado e o bacalhau não congelado, por meio da análise dos metabólitos constituintes, verificando que a presença de

dimetilacetanamida (DMTA) é um potencial biomarcador do processo de congelamento de amostras de peixe fresco.

Gribbestad e colaboradores (2005) também utilizaram a técnica de RMN no músculo do salmão do atlântico (*Salmo salar*) para determinar a constituição química de forma não destrutiva. Complementando o estudo, Castejon (2010), conseguiu comparar qualitativamente os metabólitos da carne do salmão fresco e defumado, evidenciando os efeitos dos processos de armazenamento na constituição química da carne do peixe.

3.2.1. A sequência de pulso ZGPR

Na análise de amostras biológicas como, por exemplo, a carne de pescado, o sinal dos hidrogênios da água são mais intensos que os sinais dos metabólitos constituintes. Em muitas análises por RMN os sinais dos solventes também podem ser mais intensos e largos, interferindo na detecção dos metabólitos de interesse. Além disso, outros problemas, como a integração dos sinais vizinhos ao da água, não é possível de ser realizado, uma vez que o programa de processamento de espectros têm dificuldades em processar com frequências parecidas, por conta da sobreposição de sinais, ou pela interferência do pulso de saturação. A supressão do sinal da água pode ser realizada de várias maneiras dependendo da sequência de pulso selecionada (COBRA, 2016).

Na maioria das aquisições de espectros de RMN de ^1H o método de supressão mais utilizado é o de pré-saturação, que se baseia em diminuir o vetor magnetização resultante da água antes do pulso (P1). A técnica tem a função de irradiar o sinal do solvente durante o tempo de relaxação (D1) antes que o pulso de radiofrequência seja aplicado.

Geralmente as sequências de pré-saturação têm um pulso de radiofrequência relativamente longo e de potência baixa para que se possa saturar uma frequência específica, por exemplo, o sinal da água. Os hidrogênios presentes na água são excitados a ponto de nenhum sinal poder ser completamente acumulado e detectado. No entanto, a desvantagem de se utilizar

a sequência de pré-saturação é que a ressonância de hidrogênios que realizam troca química com a água também será saturada.

A sequência de pulso *zgpr* (nomenclatura Bruker) (Figura 8) configura-se o experimento mais simples de pré-saturação. Durante o tempo de espera (*d1*), e após a aplicação de um pulso de baixa potência na frequência da água, um pulso de radiofrequência de curta duração é aplicado na frequência dos hidrogênios que não foram pré-saturados, o qual rotacional o vetor magnetização resultante para o plano *xy*, no qual o sinal é detectado e apenas um resíduo do sinal da água poderá ser observado (NASCIMENTO, 2011).

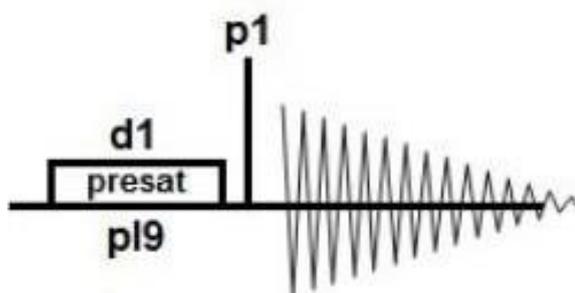


Figura 8. Representação esquemática da sequência de pulso de supressão *zgpr* com os parâmetros importantes. (NASCIMENTO, 2011)

3.3. Quimiometria aplicada a RMN de ^1H

Um espectro de RMN de ^1H é rico em informações químicas. Em análises metabôlicas, o número de amostras necessário para se construir uma matriz de dados robusta e representativa é bastante extenso, tornando a análise visual de cada espectro, um trabalho cansativo e limitado. Além disso, uma mera análise visual, não permite extrair informações relevantes, pois na maioria das vezes, os espectros possuem diferenças sutis.

Nesse sentido, o processamento e interpretação dos dados em estudos metabôlicos, vêm sendo realizado através de métodos estatísticos chamados de multivariados. Os sinais dos hidrogênios dos metabólitos presentes nas amostras são estatisticamente comparados, e usados para determinar quais as

principais diferenças ou semelhanças entre os grupos amostrais (WISHART, 2008).

De acordo com Ferreira (2015), a quimiometria é uma ferramenta estatístico- matemática importante que quando aliada com diferentes métodos químicos e analíticos, possibilita a análise de um grande número de variáveis presentes em uma única amostra. Essa ferramenta atua diretamente na interface das ciências exatas, relacionando a química com outras áreas como a matemática, estatística e áreas correlacionadas (Figura 9).

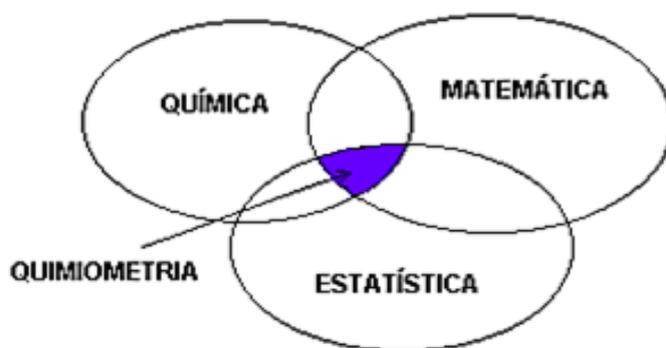


Figura 9. Representação esquemática da interdisciplinaridade da Quimiometria entre as ciências exatas (FERREIRA, 2015).

Em resumo, as análises quimiométricas possibilitam a extração de informações significativamente relevantes de dados considerados complexos. Essa vantagem da utilização desse método faz com que muitos estudos envolvendo aplicações quimiométricas cresçam exponencialmente nos dias atuais. Entre os métodos mais utilizados destaca-se a análise exploratória dos dados, a qual foi utilizada para a execução desse trabalho.

3.3.1. Análise exploratória dos dados

Os métodos quimiométricos utilizados na identificação de semelhanças e diferenças entre amostras são divididos em dois grupos importantes: supervisionados e não supervisionados, no reconhecimento de padrões. O

método de análise exploratório está dentro do grupo dos métodos não supervisionados, que não utilizam informações das classes pré-estabelecida das amostras, e não requerem nenhum conhecimento prévio de suas classificações, sendo o agrupamento efeito apenas das informações contidas nos dados experimentais (FERREIRA, 2015).

Nas análises exploratórias também é possível a verificação da presença de amostras anômalas (*outlier*), ou seja, aquelas que não seguem o mesmo comportamento das demais. Os dados obtidos de experimento nas análises exploratórias são organizados em matrizes constituída de amostras e suas variáveis. No contexto de dados adquiridos em ressonância magnética nuclear (RMN), na construção da matriz de dados, os espectros de ^1H das amostras são dispostos em linhas, enquanto que as variáveis referente aos valores de deslocamento químico são organizados em colunas.

O grande número de sinais em espectros de RMN de ^1H de alimentos é um dos fatores problemáticos na identificação de semelhanças e diferenças entre as amostras. Logo é necessária a utilização de métodos matemáticos capazes de descobrirem e organizarem as informações contidas nesses dados, transformando as observações de todos os valores de deslocamento químico em algo que possa ser visualizado no espaço. Um dos métodos matemáticos mais simples utilizado em pesquisas metabolômicas é a análise por componentes principais (PCA).

A análise por componentes principais (PCA) é um procedimento matemático que visa converter uma matriz de dados multivariados de variáveis correlacionadas em uma nova matriz com dimensionalidades reduzidas e variáveis não correlacionadas, denominadas de componentes principais (PCs). Quando ocorre correlações significativas entre variáveis em um conjunto de dados, é possível descrever um número menor de novas variáveis que consigam fornecer toda a informação contida em uma matriz original. A compressão desses dados é obtida mediante a combinação linear das originais, de maneira a agrupar aquelas com similaridades. O novo conjunto de variáveis é denominado componentes principais (FERREIRA, 2015).

A conversão das variáveis ocorre através da combinação linear das

variáveis originais, construídos em ordem decrescente de variância, nesse sentido, as primeiras componentes principais possuem a maior variância do banco de dados e as sucessivas componentes principais possuem maior variância que a próxima, sempre atuando de forma ortogonal entre si. Dessa maneira, as informações mais relevantes do conjunto de dados ficam concentradas nas primeiras componentes e as de menor importância nas últimas (FERREIRA, 2015).

Em uma análise de componentes principais, o agrupamento das amostras define a estrutura dos dados por meio de gráficos de “scores” em que as amostras são projetadas, e “loadings”. Os scores fornecem a informação geral de todas as observações ou amostras que compõem a tabela de dados, e a posição de cada amostra no plano do modelo pode ser usada para correlacionar amostras entre si. Logo, as amostras que estão próximas uma das outras possuem um perfil multivariado semelhante, enquanto os *loadings* fornecem a influência das variáveis no plano do modelo e a relação entre elas. Como as PCs são ortogonais entre si, é possível analisar as relações entre amostras e variáveis e ainda a influência de cada variável em cada amostra (BRERETON, 2017). (Figura 10)

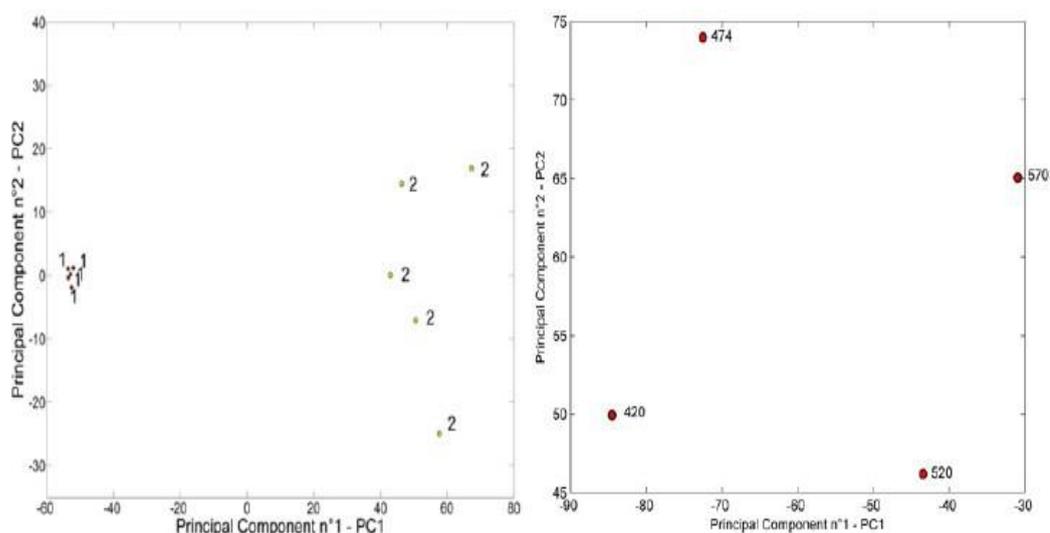


Figura 10. Representação ilustrativa de uma análise exploratória por componentes principais (PCA) com os gráficos de scores e loadings (FERREIRA, 2015).

Análises quimiométricas têm sido amplamente utilizadas na exploração de dados obtidos pela RMN aplicada a amostras de peixe. Nessa perspectiva, tem sido possível resolver problemas relacionados a autenticidade de peixes e frutos-do-mar, como, por exemplo, a substituição de espécies, falsificação de origem geográfica, e deturpação do processo de cultivo e conservação através da união das técnicas espectroscópicas e de análises quimiométricas (GHIDINI e col., 2019).

Pinto e colaboradores (2020) utilizaram a RMN aliada a quimiometria para o monitoramento das alterações na carne de peixe caranha (*Piaractus brachypomus*), após a quebra de cadeia do frio, no processo de congelamento e descongelamento, os resultados mostraram que o ciclo de congelamento e descongelamento favorecem o aumento das atividades endógenas e exógenas. Outros exemplos ressaltam a aplicação do conjunto de técnicas na avaliação do frescor de peixe, o autor Zhang e colaboradores (2022), relatam a deficiência dos processos convencionais de determinação do frescor do peixe, e aborda a utilização das técnicas espectroscópicas aliadas a quimiometria, pois tais técnicas são de rápida análise, possuem baixo preparo de amostras e custo-benefício, sendo que alguns métodos são especialmente não destrutivos e adequados para operações on-line ou em larga escala.

Não só em amostras de peixes, mas também em seus produtos, a aplicação do conjunto de técnicas tem se mostrado promissor, no trabalho de Giese e colaboradores (2019), a RMN aliada a quimiometria foram utilizadas para determinação de adulteração de óleo de fígado de bacalhau, misturados com óleos vegetais comuns, a abordagem pode abrir caminho para uma avaliação holística da qualidade dos óleos de peixe.

3.4 Quantificação relativa de metabólitos por RMNq

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^1H é comumente utilizada para elucidação estrutural de compostos orgânicos obtidos por meio de sínteses ou produtos naturais. No entanto, a técnica de RMN também pode ser considerada um método de medição primária sendo possível a aplicação em metodologias de quantificação de compostos orgânicos (KING, 2000).

Os avanços metodológicos no campo da RMN trouxe significativa confiança na sensibilidade e estabilidade, impulsionando a técnica para a utilização em quantificações absolutas. As principais vantagens da utilização da RMN em comparação com outros métodos de quantificação, podem ser notáveis, exemplo, a capacidade de determinação das razões molares a partir da razão dos sinais, independente das características químicas do analito; a alta exatidão e precisão da concentração dos metabólitos; e a capacidade de quantificação simultânea de vários compostos (DUYNHOVEN, 2013).

O fundamento para a quantificação por RMN, baseia-se no fato de que a intensidade de um sinal (I) é diretamente proporcional ao número de núcleos que dão origem ao sinal no espectro, dessa forma, a quantificação é realizada medindo a área sob um sinal representado pela integral. No entanto, para um melhor resultado é necessário que os sinais dos metabólitos escolhidos sigam alguns requisitos importantes. Entre esses requisitos é primordial que o sinal do analito deve ser separado de outros, ou seja, livre de sobreposições.

Além disso, outros requisitos como o ajuste fino da homogeneidade de campo (*shimming*), parâmetros de *tuning* e *matching* e as configurações dos parâmetros de processamento também são primordiais para um bom resultado na quantificação dos compostos químicos (HOLZGRABE, 2010).

O preparo da amostragem nos métodos de RMNq podem ser considerados simples e rápido, isso torna o método reprodutível e robusto. É importante considerar alguns pontos na quantificação, uma vez que uma mesma fonte, pode produzir diferentes sinais com intensidades diferentes que podem variar dependendo de fatores como, composição amostral, ângulo do pulso de excitação, tamanho do tubo de RMN, volume da amostra e parâmetros experimentais (LARIVE, 1997; HOLZGRABE, 2010).

A quantificação por RMN pode ser realizada de duas maneiras utilizando espectros de RMN – quantificação relativa e quantificação absoluta. Na quantificação relativa, é obtido a proporção de compostos em misturas através da utilização das integrais. A razão molar entre dois compostos X e Y podem ser calculadas através da equação (BHARTI, 2012)

$$\frac{M(x)}{M(y)} = \frac{I(x).N(y)}{I(y)N(x)}$$

Considerando que nesse tipo de quantificação o espectrometro é o mesmo, o valor de Ks (constante do espectrometro) não é levado em consideração nessa equação (MALZ, 2005).

Na quantificação absoluta existe duas possibilidades para determinação da concentração do metabólito. A primeira possibilidade pode ser aplicada quando todas as impurezas presentes no espectro de RMN puderem ser medidas quantitativamente, nesse caso, o resultado é a diferença para o valor de 100%. Esta abordagem não é indicada para impurezas que não contenham o núcleo observado, tais como compostos inorgânicos.

Para a segunda possibilidade de abordagem, a pureza de uma certa substância X pode ser calculada diretamente a partir dos espectros de RMN de ¹H usado a seguinte equação:

$$P(x) = \frac{I(x).N(y).M(x).W(y)}{I(y)N(x)M(y)W}.P(y)$$

Para essa equação, *I*, *N*, *M*, *W* e *P* são a área integral, número de núcleos, massa molar, peso gravimétrico e pureza do analito (X) e padrão (Y), respectivamente.

A escolha do padrão como composto de referência também requer algumas estratégias importantes. De acordo com Bharti (2012) o padrão interno ideal é aquele que está disponível em uma forma com alta purificação, menos dispendioso, estável, quimicamente inerte, não volátil, não higroscópico e solúvel na maioria dos solventes de RMN que estão sendo usados rotineiramente, além disso o seu sinal de referência deve estar bem separado e deve

preferencialmente ser um singleto.

O padrão interno em quantificação deve possuir uma concentração conhecida e devem seguir criteriosamente as condições como sua solubilidade e sua interação química com o analito. No caso de amostras biológicas onde proteínas e lipoproteínas estão presentes em abundância, o padrão interno deve ser selecionado com muito cuidado (HOLZGRABE, 2010; BHARTI, 2012).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção das Amostras

As amostras comerciais da carne do Pirarucu (*Arapaima gigas*) fresco e salgado foram adquiridas em centros comerciais e feiras livres, contemplando diferentes zonas da cidade de Manaus/AM. A coleta das amostras ocorreu em um período de 15 dias (do dia 24 de janeiro de 2022 a 4 de fevereiro de 2022), evitando a adição da variável tempo de coleta na construção do modelo. A seleção das zonas foi feita mediante a densidade populacional descrita em dados obtidos do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE (IBGE, 2010), listadas a seguir: Zona Norte, Zona Sul, Zona Leste e Zona Centro-Sul (Figura 11).

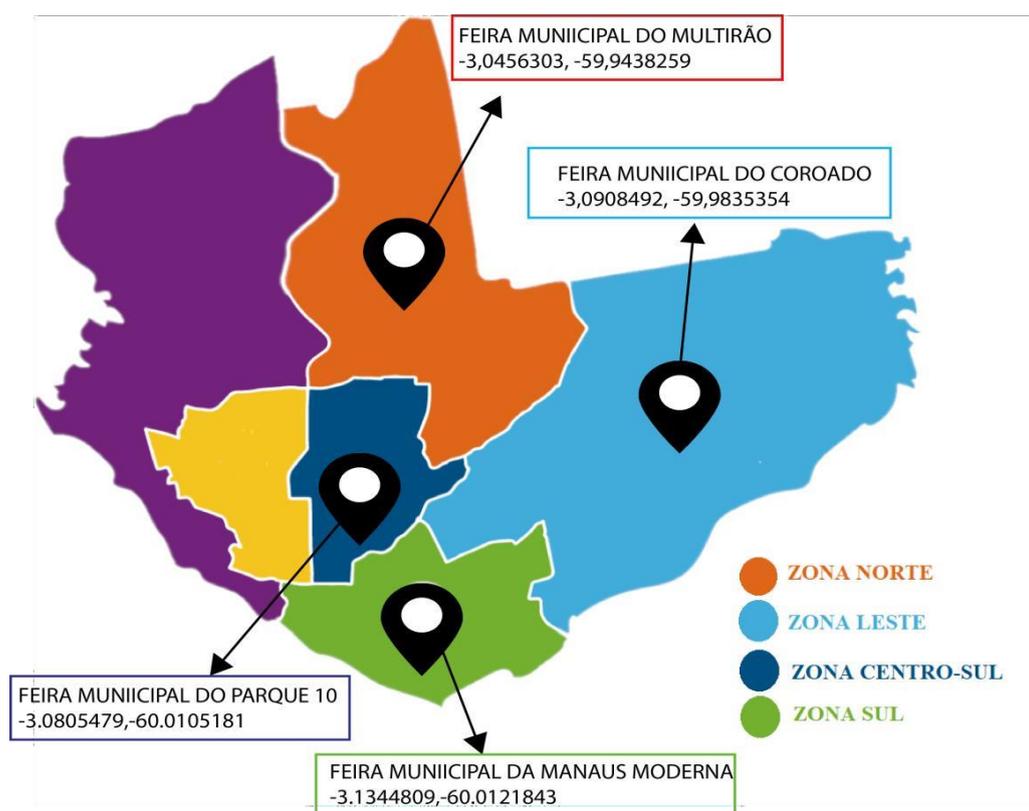


Figura 11. Localização dos locais de coleta das amostras de pirarucu fresco e salgado-seco na cidade de Manaus com suas respectivas coordenadas geográficas (AUTOR, 2022).

Cinco amostras de Pirarucu fresco e cinco amostras de Pirarucu salgado foram adquiridas em cada zona, totalizando 40 amostras da carne do pescado. A Tabela 2 mostra os códigos relacionados às amostras coletadas, bem como o tipo de comércio que se procedeu à compra da amostra.

Tabela 2. Códigos das amostras comerciais de pirarucu coletadas em feiras da cidade de Manaus.

Zona de Coleta	Amostra	Tipo de Comércio
Zona Centro-Sul	PFCS(5)	Feira Livre
	PSCS(5)	—
Zona Leste	PFZL(5)	Feira Livre
	PSZL(5)	—
Zona Norte	PFZN(5)	Feira Livre
	PSZN(5)	—
Zona Sul	PFZS(5)	Feira Livre
	PFZS(5)	—

Legenda: *P = pirarucu; *F= fresco; *S= seco; *ZN= zona norte; *CS= centro-sul; *ZL= zona leste; *ZS = zona sul.

Coletou-se aproximadamente ± 100 g de filé (região lombar) da carne do Pirarucu. Após a coleta, as amostras foram transportadas em caixas isotérmicas com gelo e armazenadas em Freezer que opera a temperatura de -80 °C, disponibilizado pelo Laboratório de Bioensaios e Microrganismos da Amazônia (LABMICRA/UFAM).

Para verificação do conhecimento dos comerciantes sobre os processos de salga e secagem empregados em seus produtos, foi levantada uma pesquisa por meio de questionário (APÊNDICE) realizado no decorrer da obtenção das amostras, rastreando, dessa forma, qual processo utilizado para salgamento e secagem do produto.

Para o experimento com amostras produzidas, as carnes de pirarucu fresco foram adquiridas por comerciantes ribeirinhos no porto da Panair, localizado no bairro colônia Oliveira Machado, zona sul de Manaus (Figura 12).

Um total de cinco amostras foram adquiridas e transportadas em caixa isotérmicas para o laboratório de Bioensaios e Microorganismos da Amazônia (LabMicra) localizado na Universidade Federal do Amazonas, para posterior processo de salga.



Figura 12. Localização do ponto de coleta das amostras frescas de pirarucu do experimento produzido (Autor, 2023).

Para cada amostra de pirarucu fresco, foi retirado uma pósta para a realização do processo de salga (Figura 13). Com isso, foram obtidas 10 amostras, sendo 5 amostras da carne fresca e 5 amostras no qual seriam realizadas o processo de salga. As amostras foram codificadas com as seguintes nomenclaturas: PFP para amostras de pirarucu fresco e PSP para amostras de pirarucu salgado.

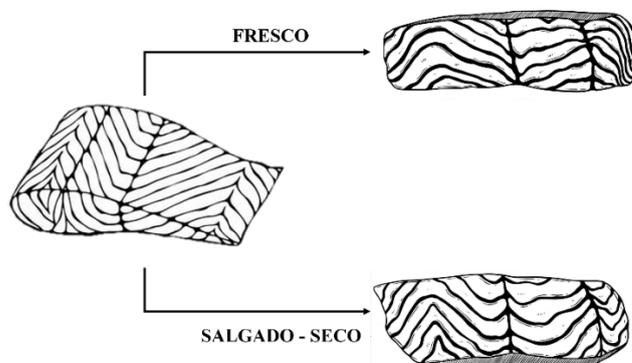


Figura 13. Esquema de corte das mantas frescas de pirarucu para o experimento produzido (Autor, 2023).

As amostras da carne de pirarucu fresco que passariam pelo processo de salga foram transportadas para o laboratório de físico-química de alimentos, localizado no Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA), sob supervisão do Prof. Dr. Rogério Souza de Jesus.

O método de salga seca foi escolhido para a realização do salgamento das amostras frescas. Inicialmente pesou-se cada amostra de carne fresca com o auxílio de uma balança semi-analítica e obteve-se os valores descritos na tabela 3.

Tabela 3. Massas das amostras de pirarucu fresco para realização da etapa de salga.

AMOSTRA	MASSA
<i>PSP1</i>	98,66 g
<i>PSP2</i>	58,12 g
<i>PSP3</i>	90,37 g
<i>PSP4</i>	59,76 g
<i>PSP5</i>	55,64 g
	Total: 362,55 g

Legenda: PSP (pirarucu seco produzido)

Para o método de salga escolhido é indicado pelos órgãos de controle, a utilização de 30 % de sal em relação a carne do pescado. Logo foram utilizados 108,76 g de sal (NaCl) para o processo de salga, além disso, para essa mistura foi utilizado uma proporção de 1:1 de sal fino e sal grosso (Figura 14).

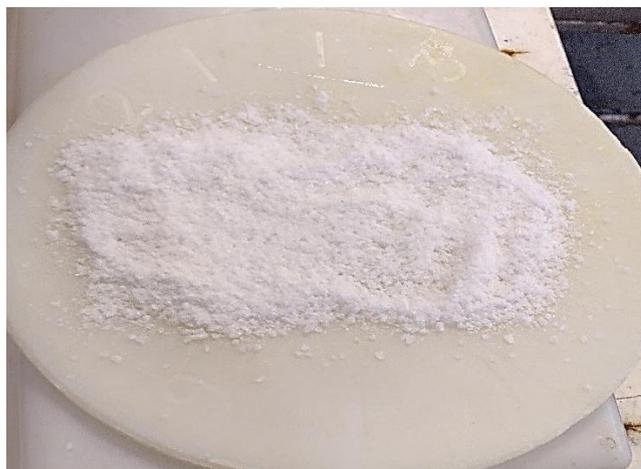


Figura 14. Camada de sal (NaCl) utilizada na salga do pescado produzido (Autor, 2023).

As amostras da carne de pirarucu foram organizadas em paralelo sobre uma camada de mistura de sal em ordens intercaladas, a fim de que o sal cobrisse toda a superfície da carne do pescado (Figura 15).



Figura 15. Mantas de pirarucu no processo de salga seca para o experimento produzido (Autor, 2023).

O processo de salga foi realizado em um período de 4 dias a temperatura ambiente (25° C) e após isso as amostras foram levadas para a secagem. As amostras foram secas com o auxílio de uma estufa de circulação de

ar (SOLAB, SI-102) a temperatura de 45° C por um período de 24 horas. Após o processo de secagem, as amostras obtidas foram armazenadas em freezer -80°C para posterior extração dos metabólitos.

4.2 Aquisição dos parâmetros físico-químicos

Para as amostras da carne de pirarucu salgado seco produzidas, foram avaliados os parâmetros físico-químicos descritos pelo regulamento técnico de identidade e qualidade (RTIQ) regulamentados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento através da instrução normativa 01 de 15 de janeiro de 2019.

As amostras foram submetidas a determinação de cloretos pelo método de Mohr por precipitação, uma metodologia baseada nas normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (2008). Inicialmente pesou-se aproximadamente 5 gramas da carne salgada-seca e transferiu-se para um béquer de 250 mL para homogeneização com 20 mL de água destilada fervente. Após isso, transferiu-se a amostra para um balão volumétrico de 100 mL com auxílio de um funil e algodão, lavando-se por três vezes com 20 mL de água destilada fervida até completar o volume do balão volumétrico. Após completar o volume, retirou-se uma alíquota de 10 mL com o auxílio de uma pipeta volumétrica e transferiu-se para um frasco de Erlenmeyer de 250 mL onde foi adicionado 1 mL de cromato de potássio (K_2CrO_4) a 10% (Figura 16). Dessa forma a mistura foi então titulada com nitrato de prata ($AgNO_3$) a 0,1 N até a obtenção da coloração amarelo-avermelhada.



Figura 16. Solução para determinação do teor de cloreto pelo método de titulação (Autor, 2023).

A umidade da carne do pescado foi determinada através da aplicação do método gravimétrico, onde monitorou-se a perda de massa do material aquecido a 105° C por um período de 24 horas, até aquisição de massa constante. Todos os testes foram aplicados em triplicata ($n=3$) para melhor representatividade dos dados.

4.3 Processo de extração dos metabólitos

A metodologia de extração dos metabólitos empregada nesse estudo é uma adaptação de um método de micro extração direta em solvente deuterado e todas as extrações descritas abaixo foram feitas em quadruplicata amostrais (n=4) no experimento comercial e em triplicata amostral (n=3) para o experimento com amostras produzidas.

As amostras de pirarucu fresco e de pirarucu salgado-seco foram descongeladas à temperatura ambiente (25° C). Foi pesada aproximadamente 1 g da carne de pirarucu a partir da retirada de pequenas quantidades ao longo da extensão do filé (retângulos em branco), conforme mostra a Figura 17.

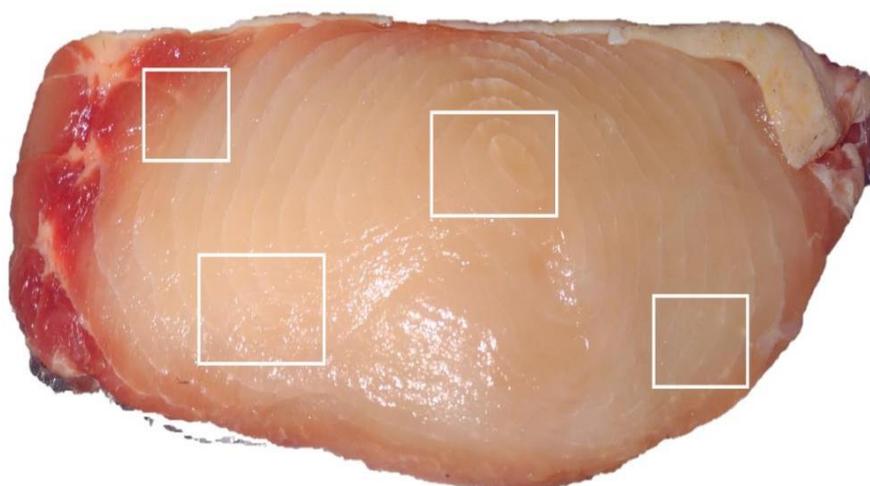


Figura 17. Filé de pirarucu fresco adquirido em feiras comerciais de Manaus com as regiões de corte explícita em retângulos brancos. AUTOR, 2022.

As amostras de pirarucu foram então maceradas exaustivamente com almofariz e pistilo, auxiliadas pela adição de nitrogênio (N₂) líquido (Figura 18). Após a homogeneização completa de cada amostra, foi pesado aproximadamente cerca de 50 mg do homogenato e adicionado 550 µL de água deuterada (D₂O) com o padrão TMSP-d₄ a 0,05% (*Cambridge Isotope Laboratories*) (Figura 19).



Figura 18. Amostras da carne do pirarucu após o processo de maceração com nitrogênio líquido (Autor, 2022).



Figura 19. Tubos de eppendorf contendo a carne de pirarucu com 550 μ L de solvente deuterado (D₂O) para o processo de sonicação (Autor, 2022).

A extração dos metabólitos ocorreu com o auxílio de uma lavadora ultrassônica (*Eco-Sonics*. Q3.0) por 30 minutos e à temperatura de 25°C. Após a sonicação, os tubos de eppendorf com as amostras de pirarucu foram centrifugadas em uma mini centrífuga (*JonSpin*, *Mini 4-7K*) por 10 minutos e velocidade constante de 4000 rpm. Após isso, filtrou-se o solvente dos tubos de eppendorf com o auxílio de algodão, e transferiu-se diretamente para o tubo de RMN (5 mm) para a aquisição dos espectros de RMN de ¹H. A Figura 20 mostra

um fluxograma para todas as etapas envolvidas no preparo das amostras para as análises por RMN.

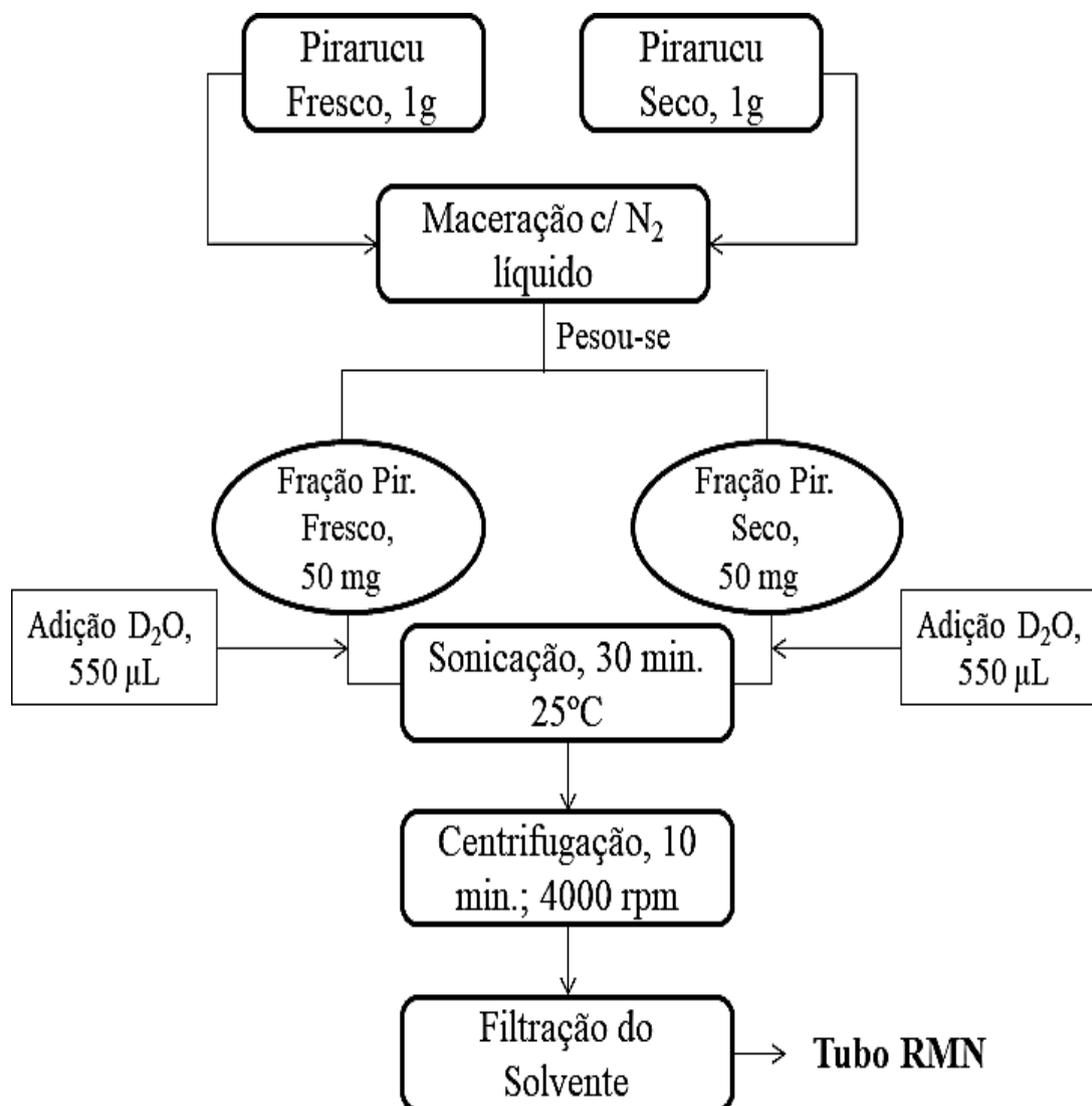


Figura 20. Método de extração empregado nas amostras de pirarucu fresco e salgado-seco adquiridas nos comércios de Manaus (Autor, 2022).

4.4 Aquisição dos espectros de RMN de ^1H

Os experimentos de ressonância magnética nuclear (RMN) foram realizados no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear (NMRLab) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM). Os espectros de RMN de ^1H foram obtidos em um espectrômetro do tipo Bruker Avance IIIHD, operando a 500, 13 MHz para o núcleo de hidrogênio e 125 MHz para o núcleo de carbono 13, equipado com uma sonda BBFO Plus SmartProbe.

Os espectros de RMN de ^1H foram adquiridos em triplicatas ($n = 3$), através da sequência de pulsos *zgpr* (nomenclatura *Bruker*) (Figura 21), com o sinal da água residual (δ 4,70) sendo suprimido. O tempo de relaxação ($d1$) foi definido como 15,0 segundos; número de pontos durante a aquisição (TD) igual a 65 K; tamanho da janela espectral (SW) igual a 8 kHz (16,0 ppm); número de transientes (NS) igual a 32 e o tempo de aquisição (AQ) igual 4,08 segundos, com a temperatura da máquina estabelecida a 25° C. Para manter-se a padronização, o valor do ganho do receptor (RG) foi definido em 128 e o pulso calibrado (P1) para cada amostra.

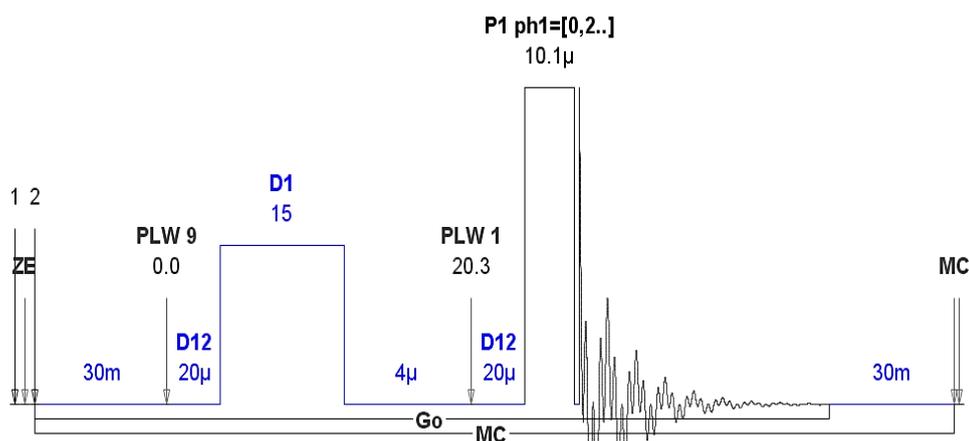


Figura 21. Representação gráfica da sequência de pulso *zgpr* usada para aquisição dos espectros de RMN de ^1H com seus respectivos parâmetros de aquisição (Autor, 2022).

Os espectros foram processados com o software TOPSPIN (versão 3.5, *Bruker BioSpin Inc.*), utilizando uma multiplicação exponencial nos *FIDs* por um fator de 0,3 Hz. As fases e as linhas de base foram corrigidas automaticamente. Os sinais dos espectros foram referenciados em relação ao sinal do trimetilsililpropionato de sódio (TMSP-d4) (0,00 ppm). Os valores dos deslocamentos químicos adquiridos foram expressos em ppm (δ) e os valores das constantes de acoplamento (J) expressas em Hz. Experimentos de RMN bidimensionais (*COSY*, *HSQC* e *HMBC*) foram realizados para fundamentar a identidade dos compostos, juntamente com as comparações dos dados obtidos com os bancos de dados online e artigos da literatura. Os espectros de RMN de ¹H adquiridos foram convertidos para o formato CSV (valores separados por vírgula) para que fosse feita a análise quimiométrica dos dados.

4.5 Aquisição de dados quimiométricos

Os espectros de RMN de ¹H foram tratados manualmente e convertidos em uma tabela de dados através do comando *convbin2csv* no software *Topspin* 3.5. Essas matrizes de dados foram organizadas através do programa Excel, versão 365, em formato CSV e as análises multivariadas dos dados de RMN de ¹H foram realizadas utilizando o programa *PLS Toolbox Solo*, versão 9.0 (*Eigenvector Research, Hyacinth Road, Manson, USA*).

A partir da matriz de dados inicial, foi gerada uma nova matriz com a região que continham os sinais dos metabólitos desejados δ 0,70 – 8,90. A área referente ao sinal residual da água (δ 4,5 - 6,8) foi excluída. Com isso, foi gerada uma matriz de dados composta por 288 amostras, dispostas em linhas, sendo 144 amostras referentes a pirarucu fresco e as outras 144 amostras referentes ao pirarucu salgado-seco, cada uma com 5728 variáveis dispostas em colunas, para discriminação entre as duas matrizes. A fim de verificar a influência de cada região espectral na discriminação entre as amostras, foram construídas três outras matrizes contemplando diferentes regiões no espectro de RMN de ¹H: baixa frequência (δ 0,7 a 2,10), média frequência (δ 2,20 a 4,50) e alta frequência

(δ 6,10 a 8,50).

O método de PCA (análise por componentes principais) foi aplicado nas matrizes de dados. Nas análises por PCA, as matrizes importadas foram tratadas por meio da utilização de pré-processamento sobre as variáveis, os dados foram centralizados em torno da média (*mean centering*) que calcula a média de cada variável e subtrai cada variável do respectivo valor médio. Os pré-processamentos, *pareto scaling* e *autoscaling*, também foram utilizados, porém, não apresentaram resultados satisfatórios para esse conjunto de dados, logo, não serão discutidos.

Para minimizar os efeitos das diferenças espectrais e ruídos sistemáticos, as matrizes de dados passaram por transformações sobre as amostras, tais como, correção da linha de base (*baseline correction*), alinhamento dos sinais (*signal alignment*) e normalização (*normalization*) para uma área constante. Após isso, foram gerados gráficos de *scores* para comparar o comportamento químico das amostras utilizadas para a construção do modelo. A identificação dos compostos que foram responsáveis pelas discriminações entre os grupos foi analisada por meio de gráficos de *loadings*, que demonstram qual a importância (peso) de cada variável para as tendências de agrupamentos encontrados nos gráficos de *scores*.

O método multivariado de calibração (PLS-DA) também foi aplicado nas matrizes de dados. Para isso, os espectros de RMN de ^1H tratados foram importados para o *software AMIX (Bruker)* onde foram feitas as integrações dos sinais dos metabólitos responsáveis pela separação entre amostras frescas e secas de pirarucu. A tabela com os dados de integração foi convertida em formato CSV (valores separados por vírgula) e importada para a plataforma *MetaboAnalyst 5.0* para realização dos tratamentos quimiométricos.

No processo de filtragem para remoção de variáveis que não seriam úteis na modelagem dos dados, utilizou-se como parâmetro o valor médio da intensidade dos sinais além do pré-tratamento *auto-scaling* que centraliza os valores na média e divide seus valores pelo desvio padrão de cada variável. A validação desse modelo foi realizada pelo método de validação cruzada (cross

validation, 10 fold, Q^2) que avalia a performance de um modelo preditivo. Os valores de Q^2 e R^2 obtidos podem fornecer informações relevantes tais como a capacidade preditiva do modelo (Q^2) e a sua capacidade explicativa (R^2).

4.6 Quantificação dos metabólitos

A quantificação por RMN de ^1H (qHNMR) foi realizada utilizando-se o método de quantificação com padrão-interno. As análises quantitativas por RMN de ^1H são baseadas na medida da área de um sinal registrado, no qual é diretamente proporcional ao número de hidrogênios que absorvem energia na radiofrequência referente a este sinal. Dessa maneira, para se obter uma informação quantitativa através dos espectros de RMN de ^1H , é realizada a determinação relativa ao padrão interno, na qual a razão molar entre dois compostos pode ser calculada (SANTOS E COLNAGO, 2013). Nesse sentido, os espectros de RMN de ^1H tanto das amostras comerciais quanto das amostras produzidas foram importados para o software AMIX 3.9.12 (Bruker BioSpin) para a obtenção dos valores de intensidade dos metabólitos de interesse e do padrão interno TMS- D_4 (trimetilsililpropionato de sódio) com concentração molar de 3,25 mmol.

Os espectros foram plotados e a área dos metabólitos foi selecionada manualmente para o processo de integração. Selecionados os sinais dos compostos de interesse, foi aplicado a multi-integração e a intensidade desses sinais foi calculada e importada para o *software Excel* 365 para realização dos cálculos de teores.

O concentração molar do metabólito de interesse foi calculado a partir da seguinte equação:

$$M(x) = \frac{I(x) \cdot N(y)}{I(y) \cdot N(x)} \cdot M(y)$$

Onde $M(x)$, $I(x)$ e $N(x)$ estão relacionadas respectivamente a molaridade, intensidade do sinal e número de núcleos para o determinado sinal do metabólito, enquanto que $M(y)$, $I(y)$ e $N(y)$ estão relacionadas a molaridade, intensidade e número de núcleos do padrão interno. Os valores de concentração molar encontrados foram então divididos pela massa de peixe utilizada na extração para a obtenção do teor do metabólito descrito em mmol/g.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Amostragem do Experimento Comercial

Neste estudo, foi realizado um levantamento dos principais pontos comerciais de vendas da carne do pirarucu na cidade de Manaus-AM, viabilizando uma melhor representatividade para os pontos de coleta. Feiras livres das zonas norte, sul, leste e centro-sul foram escolhidas para a aquisição da carne do pirarucu. Em cada zona, foram coletadas cinco amostras de pirarucu fresco e cinco amostras de pirarucu salgado.

Durante as coletas foi aplicado um questionário (APÊNDICE 1) e os dados obtidos mediante a aplicação deste permitiu o levantamento das técnicas de salga e secagem, que são aplicadas na carne de pirarucu da cidade de Manaus. Essa informação será importante para o planejamento de trabalhos futuros do NEQUIMA (DQ/UFAM).

Em relação ao processo de salgamento, a falta de padronização foi o principal problema reportado pelos feirantes, uma vez, que em todas as bancas de coleta, a salga era descrita de maneira distinta, uma significativa parcela dos comerciantes reportaram o uso de proporções de sal diferente do que está descrito no manual do *World Wild Fund for Nature* Brasil, que indica a quantidade de sal a ser utilizada na salga entre 30 e 35% em relação ao peso do pescado (OUVIEDO, 2011). A quantidade de sal empregada no salgamento influencia diretamente a qualidade final do produto, nesse sentido, muitos autores como Gomide (2005), já relataram que em elevadas concentrações de sal (acima de 8%), não ocorre ligação entre as proteínas e íons de cloro, fazendo com que o mesmo fique em solução, ocasionando desidratação de moléculas proteicas, atração mútua e formação de precipitado.

Além da desidratação proteica, outro problema relatado em relação à quantidade de sal utilizada, é a proliferação de bactérias do gênero *Staphylococcus* que se multiplicam em concentrações entre 7,5 e 15% de NaCl.

Em relação ao processo de secagem empregado nas amostras adquiridas, a principal discrepância entre o método aplicado está relacionada à quantidade de dias que a matriz deve ficar exposta ao sol. Em 80% das bancas em que o questionário foi aplicado, os vendedores afirmaram que a carne de pirarucu salgado deve ficar aproximadamente de 5 a 7 dias em secagem natural, ou seja, com influência apenas da temperatura ambiente. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) estabelece padrões para que o produto seja denominado salgado seco, por meio da normativa de 1º de janeiro de 2019, que aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (RTIQ), fica estabelecido que a carne do pirarucu salgado seco deva possuir umidade máxima de 52,9% (BRASIL, 2019). Nesse sentido, a quantidade de dias de exposição do produto ao sol não é o fator determinante, mas sim, a quantidade de água presente no produto final. Ouviedo e colaboradores (2011) dão recomendações importantes para que se obtenha maior qualidade do produto, como exemplo, o horário de exposição ao sol, sendo preferenciável que ocorra a secagem entre os horários de 9 a 14 horas e que ocorra a viragem contínua do pescado para não cozer o músculo.

5.2 Teor de Água e de Cloreto das Amostras de pirarucu salgado-seco produzidas

A instrução normativa 01, de 15 de janeiro de 2019, estabelece que as amostras de peixes salgado-seco devem apresentar alguns parâmetros indicativos de qualidade e identidade do pescado. De acordo com o regulamento técnico, o conceito de peixe salgado-seco é todo pescado que é tratado pelo sal (NaCl), e submetido posteriormente a secagem por evaporação natural ou artificial, com umidade mínima de 52,9% e máxima de 58%. Além disso, é requerido que as amostras de pescado salgado-seco, possuam valores de teor de sal, em cloreto de sódio, de no mínimo 12%.

Nessa perspectiva, as amostras de pirarucu salgado-seco produzidas obtiveram os valores de teor de água descritos na Tabela 4, que demonstra que a maioria das amostras apresentaram valores dentro do limite estipulado pelos

órgãos de controle, com exceção das amostras PSP₁ e PSP₄.

Tabela 4. Valores dos teores de água nas amostras de pirarucu após o processo de salga e secagem no experimento produzido.

Amostra	Massa Inicial (g)	Massa Final (g)	Teor de Água + DP (%)
PSP₁	1,0056	0,7447	74,17 ± 3,5
PSP₂	1,0063	0,5850	58,05 ± 3,8
PSP₃	1,0032	0,5757	57,38 ± 1,6
PSP₄	1,0069	0,5943	59,02 ± 0,25
PSP₅	1,0020	0,5639	56,23 ± 0,29

Legenda: valores médios obtidos em triplicatas; DP (desvio padrão); PSP (pirarucu seco produzido);

A determinação de umidade da carne do pescado é um fator importante uma vez que está diretamente relacionado com a vida útil do alimento. Alimentos que possuem os maiores valores de umidade podem deteriorar-se de maneira mais rápida (FOGAÇA, 2009). Além disso, existe uma correlação entre a umidade e os valores de atividade de água (Aa), quando alimentos são armazenados em ambientes com umidade superior aos valores de atividade de água, esses tendem a absorver a umidade do ambiente, causando um aumento nos valores de atividade de água que por sua vez provocam alterações na capacidade de multiplicação de microrganismos (OLIVEIRA, 2011; FRANCO, 1996).

Através do método de determinação de cloretos por precipitação, verificou-se os valores de teor de sal, em cloreto de sódio, das amostras de pirarucu salgado-seco produzidas. A partir da massa de pirarucu medida e do volume gasto na titulação determinou-se os valores de teor de cloro nas amostras. De acordo com a metodologia empregada pelo Instituto Adolfo Lutz (2008) o teor de cloreto é determinado pelos seguintes parâmetros; sendo V, o

volume da solução de Nitrato de Prata (AgNO₃) a 0,1 N gastos na titulação; F, o fator da solução de nitrato de prata; e S o valor da massa da amostra usado no processo de titulação, além disso, utiliza-se uma constante com valor de 0,584 que é o miliequivalente-grama do cloreto de sódio, os valores do teor podem ser determinados através da equação abaixo:

$$Teor (Cl^{-}) = \frac{V \cdot f \cdot 0,584}{S}$$

A tabela 5 demonstra os valores de teor de cloreto obtidos para as cinco amostras de pirarucu salgado-seco produzidas. Os dados obtidos para as amostras PSP1, PSP2, PSP3, PSP4 e PSP5 estão dentro do limite estipulado pelo regulamento técnico citado anteriormente, demonstrando que todas as amostras satisfazem o critério no que se refere ao teor de cloreto.

Tabela 5. Valores dos teores de cloretos nas amostras de pirarucu salgada seca do experimento produzido.

<i>Amostra</i>	<i>Massa</i>	<i>Volume</i>	<i>Teor (%) + DP</i>
PSP ₁	0,5009 g	16,06 mL	18,22 ± 0,19
PSP ₂	0,5007 g	20,30 mL	23,03 ± 0,56
PSP ₃	0,5004 g	18,90 mL	21,45 ± 0,01
PSP ₄	0,5002 g	19,20 mL	21,80 ± 0,56
PSP ₅	0,5000 g	19,03 mL	21,62 ± 0,05

Legenda: valores obtidos na média das triplicatas; DP (desvio padrão); volume destacado refere-se a quantidade de titulante gasto.

O teor de cloretos em amostras de peixe, corrobora com os dados de umidade obtidos, e podem indicar informações relevantes, tais como o grau de conservação e a eficiência do processo de salga. O sal aplicado sobre a superfície do pescado atua para preservar, por meio da diminuição da atividade de água no alimento, reduzindo a possibilidade de crescimento bacteriano. No

entanto, amostras com alto teor de cloreto têm maior probabilidade de crescimento de uma classe de bactérias halofílicas e organismos xerófilos, que se proliferam em meio seco (FAO, 1981; OLIVEIRA, 2007; BARUFFALDI, 1998).

5.3 Investigação do Método de Extração dos Metabólitos

A metodologia de extração dos metabólitos deve ser investigada para que se consiga coletar o máximo de informações químicas da matriz em estudo. Para esse trabalho, métodos de extração foram testados e comparados objetivando definir a metodologia de extração mais eficiente para carne de pirarucu. Os parâmetros investigados durante essa etapa foram: I) microextração em solvente comum ou deuterado; II) solventes deuterados (DMSO, CH₃OD e D₂O) e III) método de maceração (auxiliada e não auxiliada em nitrogênio líquido). A escolha dos parâmetros se deu através da avaliação visual do perfil espectral, avaliando a intensidade e resolução dos sinais.

5.3.1 Microextração em solvente comum ou deuterado

A Figura 22 mostra a expansão dos espectros de RMN de ¹H da carne do pirarucu (1,4 – 2,4 ppm) adquiridos em DMSO, CH₃OD e D₂O. A região selecionada permite destacar algumas das diferenças observadas nos perfis espectrais. A extração direta em DMSO resultou na remoção de menos metabólitos comparados com aquelas em CH₃OD e D₂O. Tal resultado é claramente observado na Figura 5.1, onde uma série de sinais não é detectada no espectro em DMSO. Ao comparar as extrações realizadas com CH₃OD e D₂O nota-se que, embora similares, há mais sinais de metabólitos em D₂O que também viabilizou melhora sutil na resolução dos sinais. Dessa forma, a água deuterada foi selecionada como solvente para realizar a microextração direta dos compostos da carne do pirarucu.

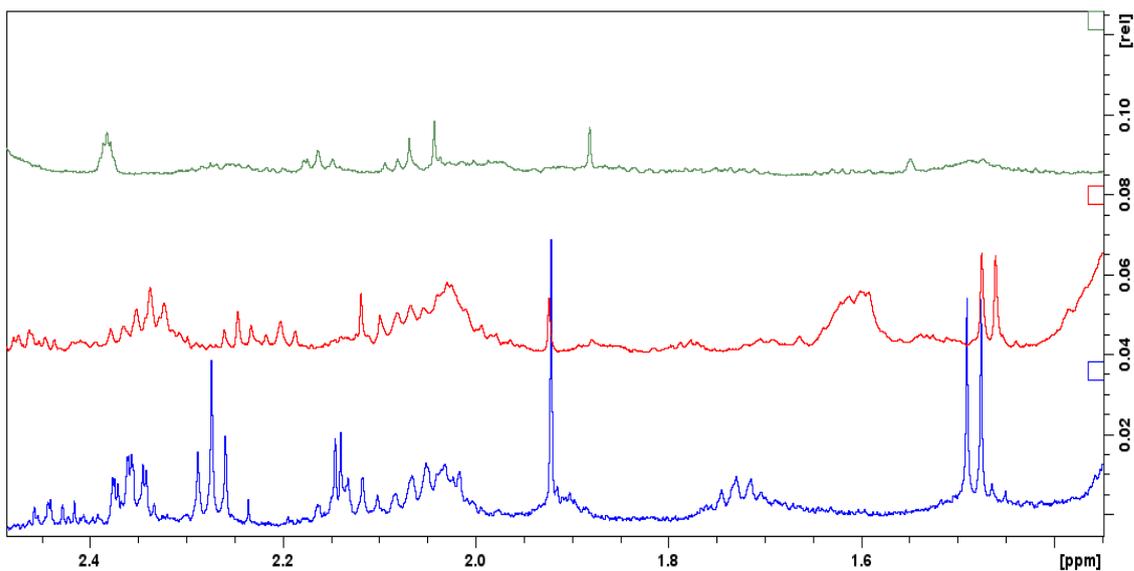


Figura 22. Espectros de RMN de ^1H adquiridos em diferentes solventes deuterado: DMSO (verde); CH_3OD (vermelho) e D_2O (azul) (Autor, 2022).

A partir desses resultados, testamos ainda uma etapa de desengorduramento da amostra - com clorofórmio P.A. - antes da extração com D_2O . Contudo, não foram observadas melhoras significativas na extração e houve o inconveniente do surgimento do clorofórmio residual no espectro (Figura 23).

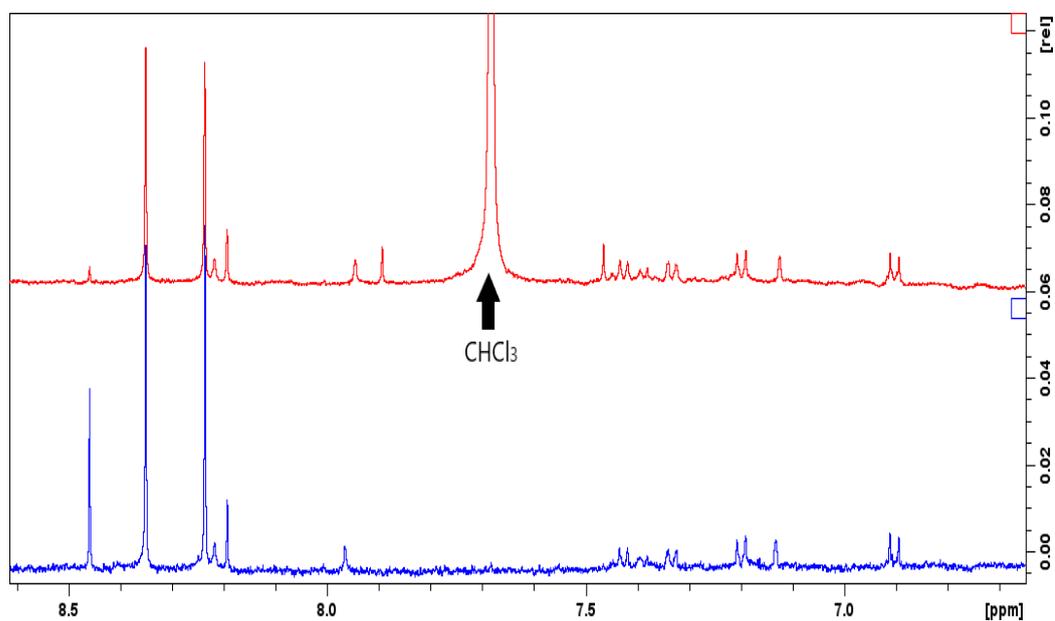


Figura 23. Perfil espectral na região de 6,5 a 8,5 ppm entre duas amostras submetidas a diferente extração. Em cima, amostras com extração não deuterada; em baixo, amostras de extração direta (Autor, 2022).

5.3.2 Influência do método de maceração

Iniciamos o nosso estudo utilizando o método de maceração simples, com almofariz e pistilo. No entanto, percebemos, através dos perfis espectrais, a falta de reprodutibilidade na extração, o que nos levou a melhorar o processo de homogeneização utilizando nitrogênio líquido. A Figura 24 mostra a diferença do homogenato após ambos os processos de maceração e evidencia a eficiência do processo com $N_2(l)$. Essa etapa foi ainda mais decisiva quando se deu início a análise da carne de pirarucu salgado seco. A texturada carne do pirarucu seco é firme, gerando dificuldades na homogeneização das amostras.



Figura 24. Amostra da carne de pirarucu submetido a dois processos de maceração: em cima, maceração simples; em baixo, após a aplicação de nitrogênio líquido na etapa (Autor, 2022).

Os espectros de RMN de 1H obtidos a partir dos dois métodos de maceração possuem perfis similares, todavia, a intensidade dos sinais foi maior no espectro referente à maceração com nitrogênio líquido. A figura 25 mostra uma região específica no espectro de RMN de 1H no qual é possível visualizar as diferentes intensidades dos metabólitos para os métodos de maceração. Além disso, as análises multivariadas (discutida nas próximas seções) mostraram reprodutibilidade satisfatória dos perfis espectrais obtidos com a maceração com

$N_2(l)$ que ainda pode contribuir para a redução da detecção de compostos indesejados (DALBOSCO, 2015).

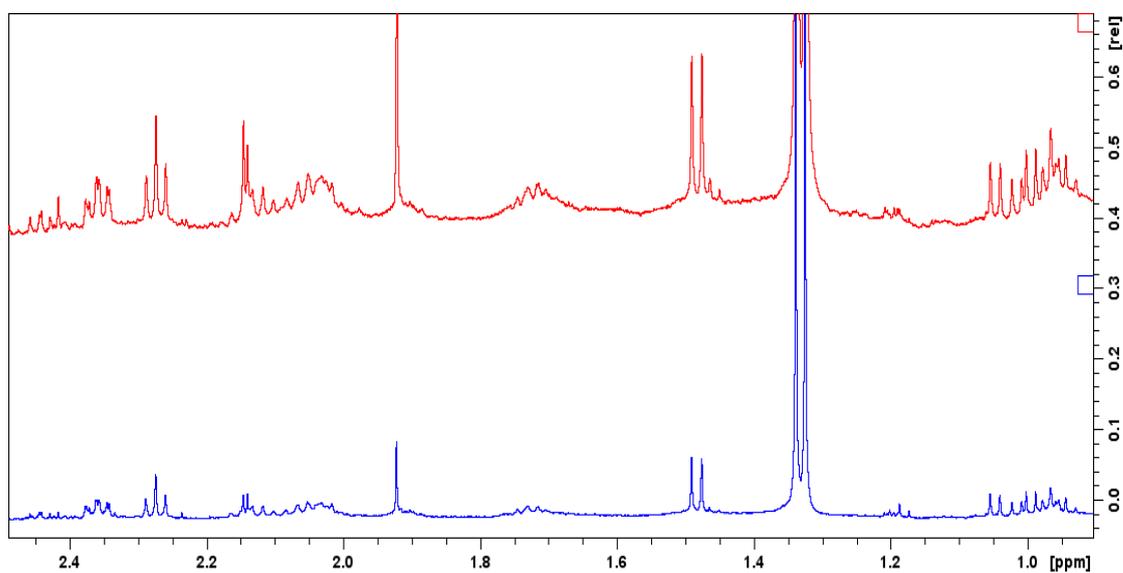


Figura 25. Perfil espectral na região de 1,0 a 2,4 ppm entre duas amostras submetidas as diferentes macerações. Em cima, amostras maceradas em N_2 líquido; em baixo, amostras maceradas de forma simples (Autor, 2022).

5.2 Análise do Perfil Espectral por RMN de ^1H

Após investigar a metodologia do processo de extração, adquiriram-se os espectros de RMN de ^1H das 40 amostras de pirarucu comerciais e das 10 amostras de pirarucu produzido. Considerando as réplicas amostrais das zonas ($n = 4$) e instrumentais ($n = 3$), o número total de espectros adquiridos foi igual a 288 para as amostras comerciais, enquanto para as amostras produzidas que utilizou 3 réplicas amostrais e 3 réplicas instrumentais, o número de espectros de RMN de ^1H foi igual a 90, conforme esquema mostrado na Figura 26. A identificação dos compostos extraídos diretamente em D_2O foi feita através de experimentos de ^1H , mapa de correlações homonucleares (^1H - ^1H) via COSY, bem como mapa de correlações heteronucleares ^1H - ^{13}C direta (HSQC) e a longa distância (HMBC).

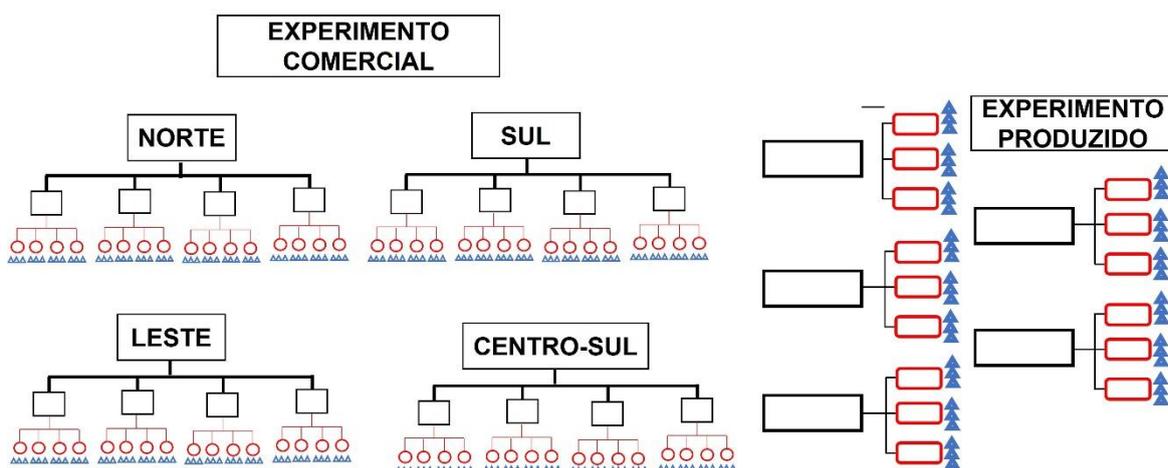


Figura 26. Esquema de aquisição dos dados de RMN de ^1H para o experimento produzido e comercial.

Conforme apresentado na Tabela 6, foram identificados 29 metabólitos nas amostras de pirarucu fresco e salgado-seco. A maioria dos metabólitos identificados são classificados como aminoácidos, ácidos orgânicos, nucleotídeos e aminas biogênicas. Para garantir maior segurança na caracterização dos metabólitos nas matrizes também foram utilizadas comparações com os dados publicados na literatura científica e o banco de dados online *Human Metabolome Database* (HMDB, <http://www.hmdb.ca>). A tabela 6 mostra os compostos assinalados e discutidos para os dois experimentos e em quais experimentos foram identificados.

Tabela 6. Metabólitos identificados nos experimentos de RMN de ^1H no experimento comercial e produzido.

Nº	Metabólito	Deslocamento Químico (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)	Atribuição	Exp. Comercial	Exp. Produzido	Referência
1	isoleucina	0,94	(t)	7.5	δCH_3	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Mannina(2008); Shumilina (2015)
2	leucina	0.96	(t)	5.9	δCH_3	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Shumilina (2015)
3	valina	0,99	(d)	7	γCH_3	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Shumilina (2015)
4	lactato	1.33 4,11	(d) (q)	6.9	βCH_3	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Mannina(2008)
5	alanina	1,48	(d)	7	βCH_3	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Bustaman(2022)
6	ácido acético	1,92	(s)	*****	αCH_3	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Mannina(2008)
7	glutamato	2,15 2,35	(m) (m)	8.9	CH_2	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Shumilina (2015)
8	GABA	2,27	(t)	7	αCH_2	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Mannina(2008)
9	ácido succínico	2,41	(s)	****	αCH_3	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Shumilina (2015)
10	metionina	2.64	(t)	6.8	S- CH_2	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Shumilina (2015)
11	dimetilamina	2,74	(s)	*****	N- CH_3	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Bustaman(2022)
12	trimetilamina	2.89	(s)	*****	N- CH_3	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Hernandez-Bolio(2021)
13	dimetilglicina	2,92	(s)	*****	N- CH_3	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Wei(2016)
14	creatina	3,04 3,92	(s) (s)	*****	N- CH_3 αCH_2	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Shumilina (2015)
15	creatinina	3,05 4,06	(s) (s)	*****	N- CH_3 αCH_2	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Shumilina (2015)

16	taurina	3,26 3,43	(t) (t)	6.7	S-CH2 β CH2	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Shumilina (2015)
17	colina	3,23	(s)	*****	N-CH3	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Mannina(2008)
18	fosfocolina	3,21	(s)	*****	N-CH3	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Wei(2016)
19	formaldeído	3.35	(s)	*****	CHO	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Shumilina (2015)
20	glicina	3,55	(s)	*****	α CH3	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Shumilina (2015)
21	betaína	3,27 3,91	(s)	*****	N-CH3 α CH2	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Bustaman(2022)
22	inosina	4,28 4,44 6,10 8,35	(m) (m) (d)	4	CH2-OH CH-OH CH-N	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Shumilina (2015)
23	IMP	6,15 8,55	(d) (s)	5.7	RO-CH-NR	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Mannina(2008)
24	ácido fumarico	6,52	(s)	*****	α CH	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Mannina(2008)
25	tirosina	6,90 7,20	(d)	8.6	H- Ar	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Shumilina (2015)
26	histidina	7,09	(s)	*****	H-Pirazol	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Shumilina (2015)
27	fenilalanina	7,33	(d)	7.6	H-Ar	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Wei(2016)
28	hipoxantina	8.19	(s)	*****	N-CH	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Shumilina (2015)
29	formato	8,45	(s)	*****	H-CO2	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Shumilina (2015)

5.4.1 Perfil Metabólico das Amostras Comerciais

Os perfis espectrais das amostras de pirarucu fresco e salgado-seco das 4 zonas de coleta são comparados na Figura 27

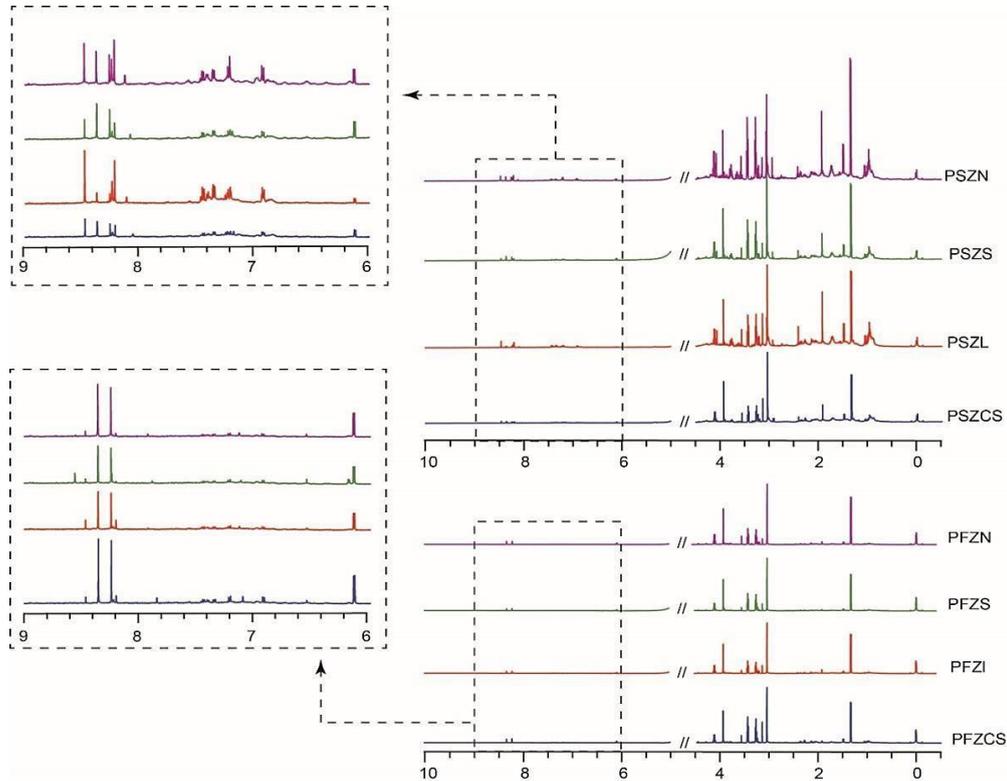


Figura 27. Perfil espectral das amostras de pirarucu fresco e salgado-seco coletadas em 4 zonas distintas de Manaus (Autor, 2022).

Para facilitar a visualização, plotou-se uma figura comparando os espectros representativos das matrizes de pirarucu fresco (Figura 28) e pirarucu salgado-seco (Figura 29) juntamente com suas respectivas expansões, dando visibilidade para as regiões/ os compostos identificados nas regiões características de aminoácidos e ácidos orgânicos (0,5 – 2,5 ppm), carboidratos (2,5 – 4,0 ppm) e aromáticos (5,0 -10 ppm).

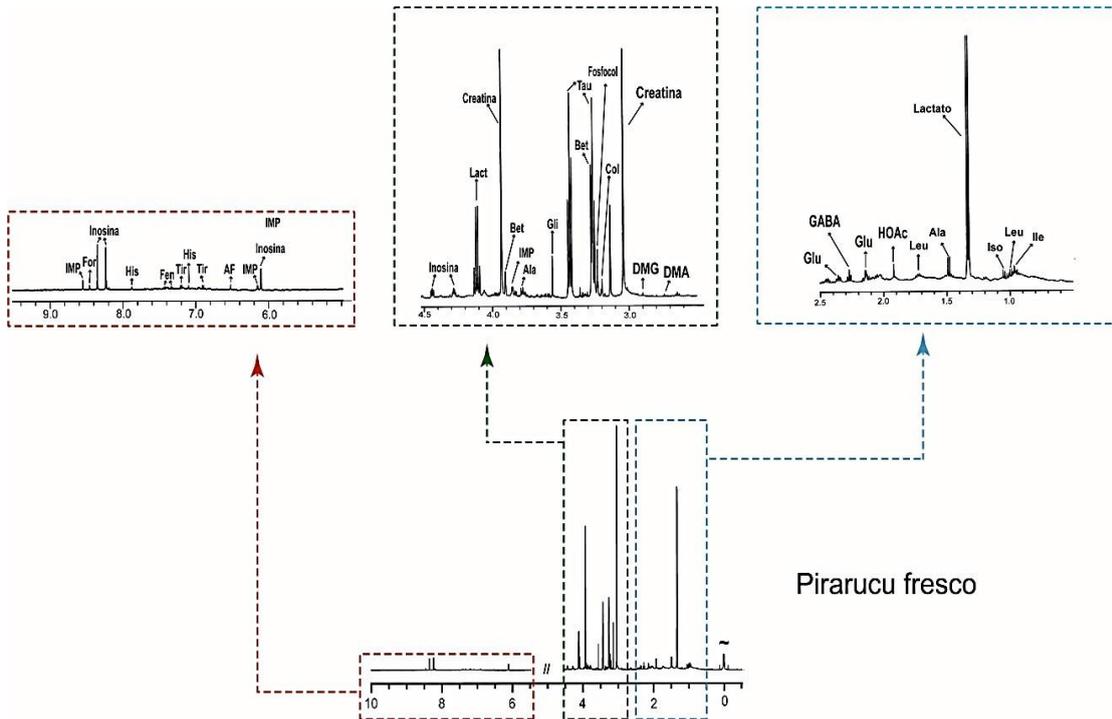


Figura 28. Perfil espectral das amostras de pirarucu fresco com as principais atribuições dos metabólitos identificados (Autor, 2022).

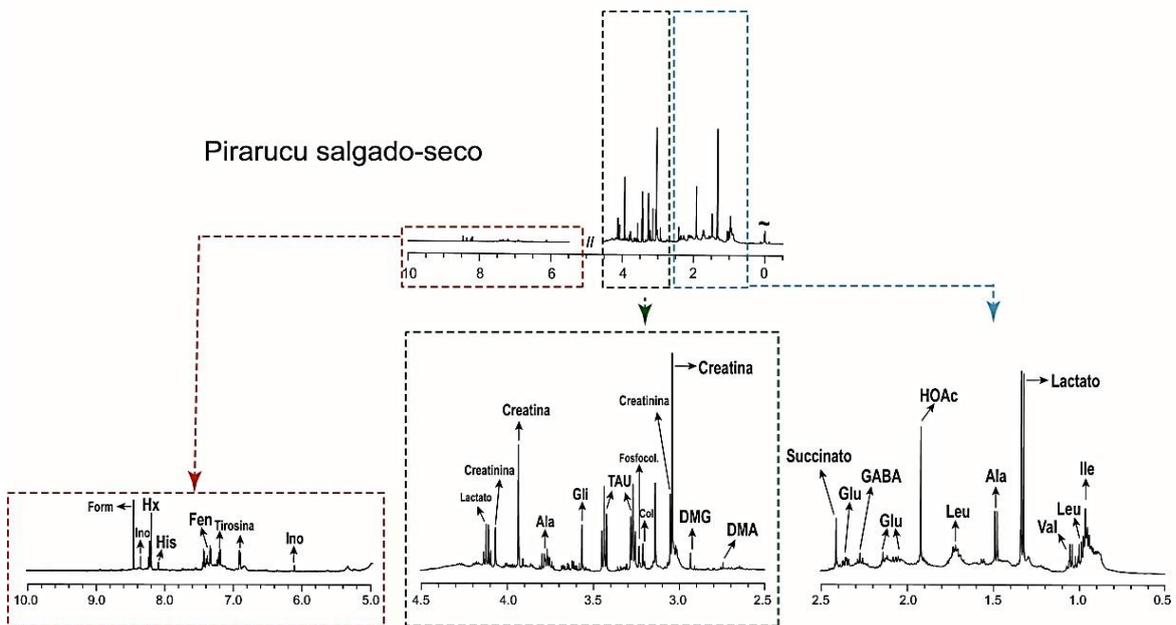


Figura 29. Perfil espectral das amostras de pirarucu salgado-seco com as principais atribuições dos metabólitos identificados.

De forma geral, os perfis espectrais entre as amostras frescas e salgadas-secas do experimento comercial, compartilham da mesma composição química, com diferentes intensidades dos sinais, com compostos similarmente identificados que foram agrupados em linhas gerais em aminoácidos, ácidos orgânicos, nucleotídeos e outros metabólitos essenciais. A inspeção visual dos espectros de pirarucu fresco e salgado-secos permitiu identificar os compostos succinato (δ 2,41), dimetilglicina (δ 2,93), creatinina (δ 3,04) e hipoxantina (δ 8,09) presentes apenas em amostras de pirarucu salgado-seco.

Para melhor discutir os resultados obtidos através da RMN de ^1H , dividiu-se os espectros em três regiões no eixo da frequência: baixa frequência (δ 0,70 a 2,10) compreendendo em sua maioria os compostos classificados como aminoácidos e ácidos orgânicos; média frequência (δ 2,20 a 4,50) onde se encontram alguns carboidratos e aminoácidos; e alta frequência (δ 5,0 a 10,0), compreendendo em sua maioria os compostos aromáticos.

BAIXA FREQUÊNCIA (δ 0,70 a 2,10)

A região de baixa frequência no espectro de RMN de ^1H , demonstrou expressiva concentração de aminoácidos e ácidos orgânicos. A Figura 30 mostra os principais assinalamentos dos aminoácidos e ácidos orgânicos identificados nas amostras produzidas de pirarucu fresco e salgado-seco, respectivamente.

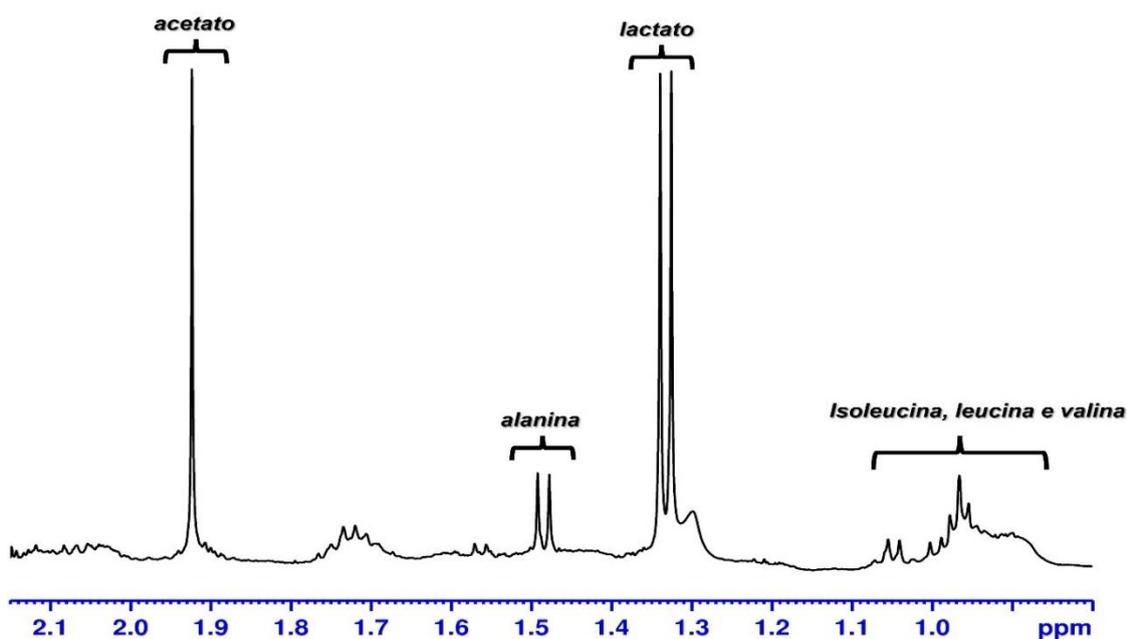
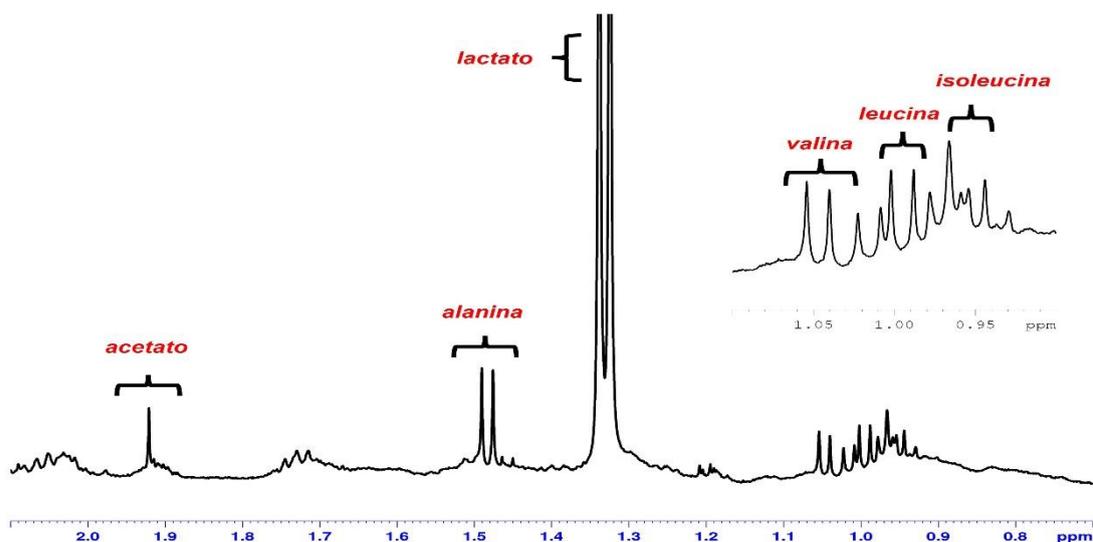


Figura 30. Região de baixa frequência do espectro de RMN de ^1H com os principais assinalamentos do A) (em cima) pirarucu fresco e B) (em baixo) pirarucu salgado-seco.

Para as amostras comerciais, foi verificado a presença de metabólitos semelhantes, também identificados nas amostras produzidas. Os aminoácidos isoleucina, leucina, valina e alanina foram identificados nos espectros de RMN de ^1H da carne de pirarucu, nessa região espectral. Esses aminoácidos estão majoritariamente na forma livre, e têm seus níveis alterados por meio da

degradação de proteínas que acontece logo após o processo de post-mortem e continuam durante o armazenamento e processamento dos peixes. De acordo com Connell (1959), os músculos do peixe, em geral, possuem de 1 a 5 g de aminoácidos livres para cada 100 g de proteínas, caracterizado por altos teores de taurina, histidina, ácido glutâmico, alanina, ácidos aspártico, leucina e lisina, bem como baixos teores de cisteína, triptofano, metionina e tirosina.

O padrão de concentração dos aminoácidos logo após o processo de post-mortem, mais que os tipos de aminoácidos que compõem as proteínas, é conhecido como dependente da espécie. Isso se dá devido à ação desses aminoácidos como osmorreguladores da célula. Sendo assim, a quantidade relativa desses aminoácidos que participam da osmorregulação são modulados pela concentração de sal do habitat do peixe, ao passo que os demais aminoácidos livres não participam (BRAMSTEDT, 1962).

As proteínas desempenham funções fisiológicas importantes, incluindo a osmorregulação e capacidade tampão; ademais, contribuem para o aroma e sabor do peixe e aumento da capacidade antioxidante. De acordo com Freitas 2020, e boa parte dos trabalhos citados por eles, o pirarucu é considerado um peixe de classe A - escala proposta por Haard (1992) e Stansby (1963) - com baixo teor de lipídeos (<5%) a alto teor de proteínas (15-20%). O alto teor proteico do pirarucu é relacionado com a sua alimentação, principalmente os selvagens, com sua alimentação baseada em peixes menores, camarões e pequenos crustáceos presentes em seu ambiente natural (FREITAS et al., 2020).

Os aminoácidos, juntamente com nucleotídeos, são ativadores de sabor e contribuem, portanto, para o gosto característico do alimento (YANG, 2019). Por exemplo, os aminoácidos hidrofílicos (ácido aspártico, ácido glutâmico, lisina e arginina) são tidos como responsáveis pelo sabor salgado, azedo e umami da carne de porco; enquanto os aminoácidos hidrofóbicos (alanina, valina, leucina, prolina e fenilalanina) são responsáveis pelo sabor amargo e doce (KESKA&STADNIK, 2017).

A estrutura química dos metabólitos, isoleucina; leucina; valina; alanina; e seus respectivos assinalamentos são mostrados na Figura 31.

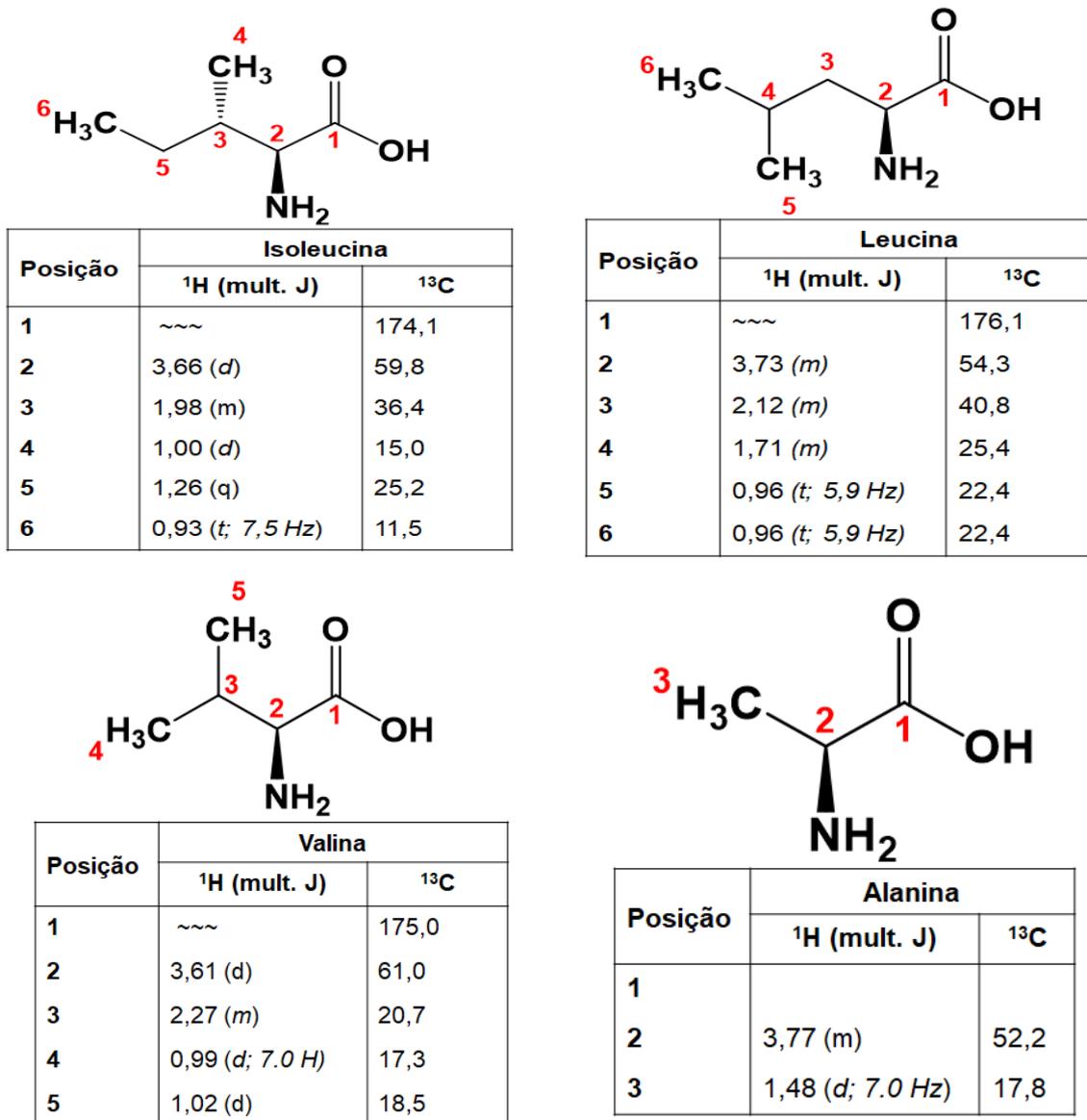


Figura 31. Estrutura química com os respectivos valores de deslocamento químico de RMN ¹H e ¹³C dos metabólitos isoleucina e leucina (em cima) valina e alanina (em baixo).

O lactato, acetato e succinato pertencentes a classe dos ácidos orgânicos foram identificados nessa região. O lactato é produzido através da quebra e oxidação da glicose, tendo como intermediário o piruvato. O teor de lactato encontrado em peixes é consequência do estoque de glicogênio inicial - antes da morte, do manuseio do peixe durante a pesca e procedimentos de extração (BODIN, 2022). A ele também é atribuído um importante papel na evolução do nível de frescor do peixe e na formação de odor (BRAMSTEDT, 1962). Juntamente com a creatina, o lactato e o succinato são compostos que

também se associa a promoção/ativação de sabor do peixe (SCHLICHTHERLE, 1998). À medida que o processo de deterioração vai acontecendo há a produção de acetato, succinato e etanol, o que faz dessas substâncias interessantes de serem monitoradas em alimentos (DAINTY, 1996; MC LEAN, 2008; CIAMPA, 2012). A Figura 32 mostra a estrutura química do lactato e acetato, bem como seus respectivos assinalamentos.

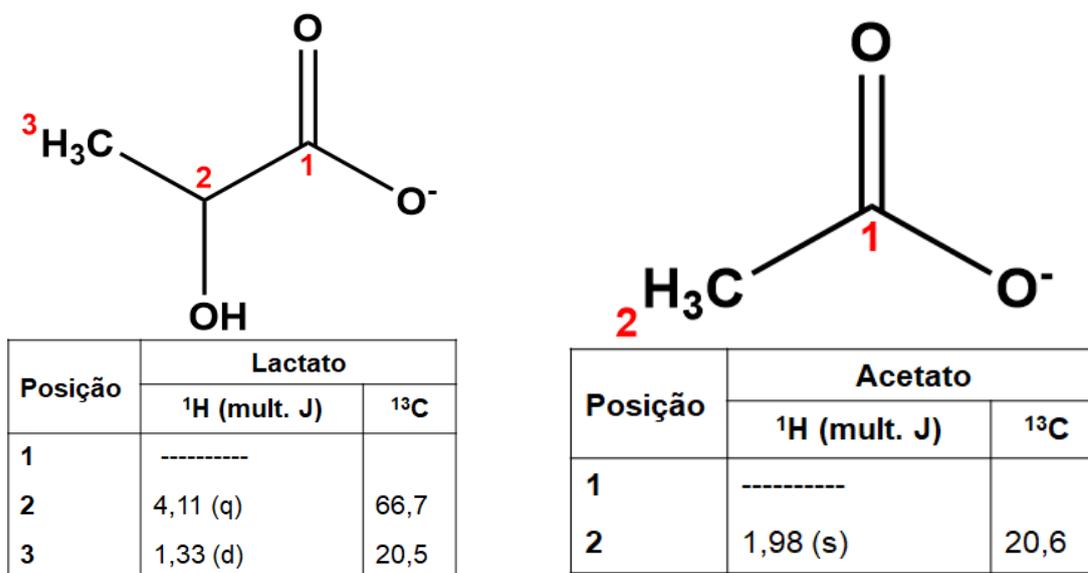


Figura 32. Estrutura química com os respectivos valores de deslocamento químico de RMN ¹H e ¹³C dos metabólitos lactato e acetato.

MÉDIA FREQUÊNCIA (δ 2,12 a 4,50)

A região de média frequência dos espectros de RMN de ¹H das amostras comerciais (Figura 33), demonstrou similaridade entre o perfil espectral da matriz fresca e seca. O composto de aminoácido creatina e seu produto de degradação creatinina foram identificados (Figura 34). A creatina está relacionada ao gasto de energia. A maior parte da creatina está fosforilada em músculos de repouso e fornece energia na forma de fosfato de alta energia para a contração muscular. Dessa forma, peixes expostos a estresse antes da morte possuem menores valores de fosfocreatina e ATP do que peixes que não foram estressados (ERICKSON, 1977).

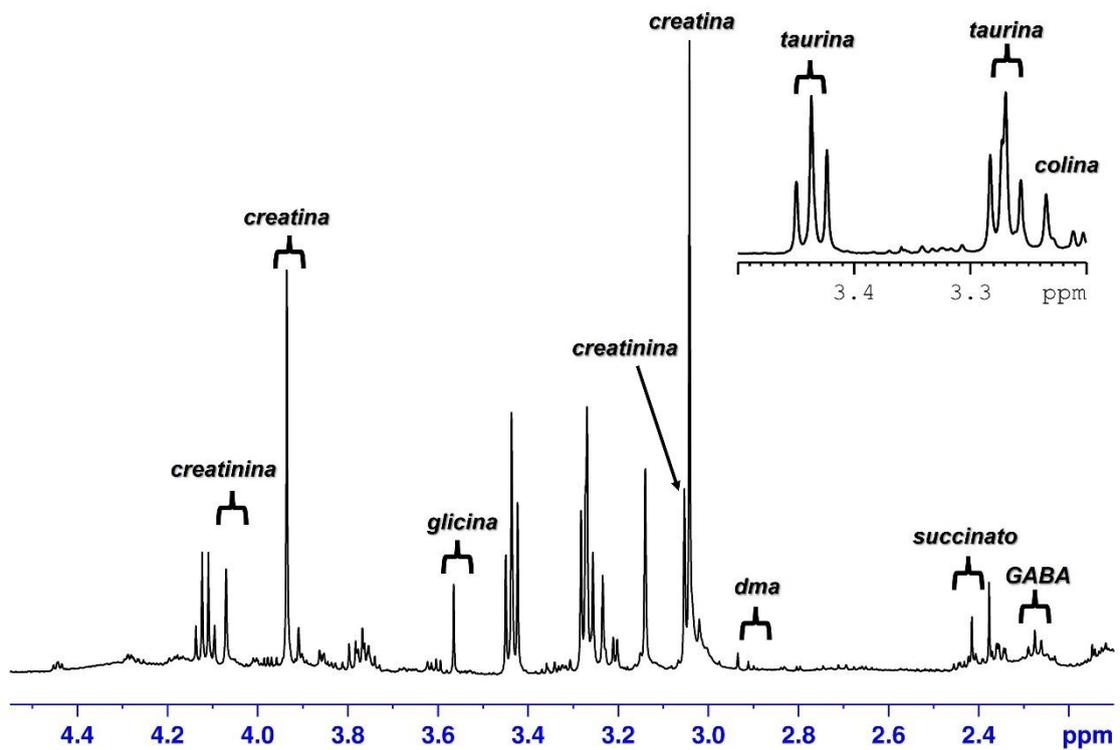
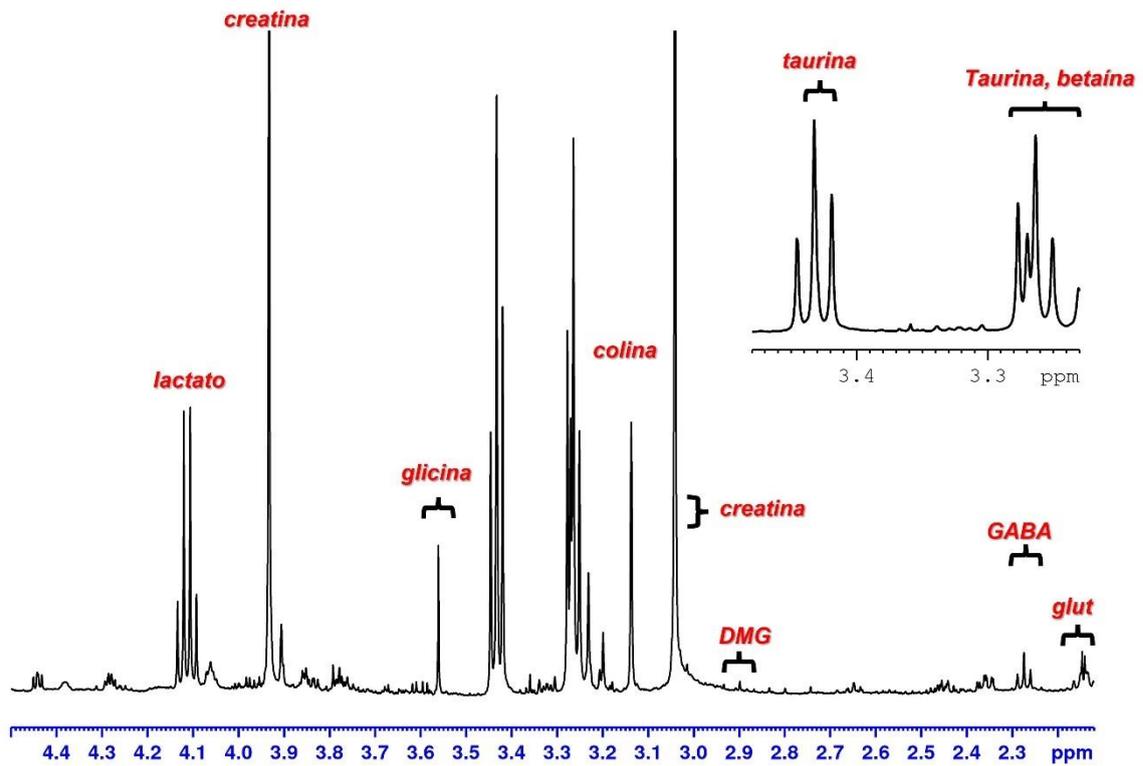


Figura 33. Região de média frequência do espectro de RMN de ¹H com os principais assinalamentos do A) (em cima) pirarucu fresco e B) (em baixo) pirarucu salgado-seco.

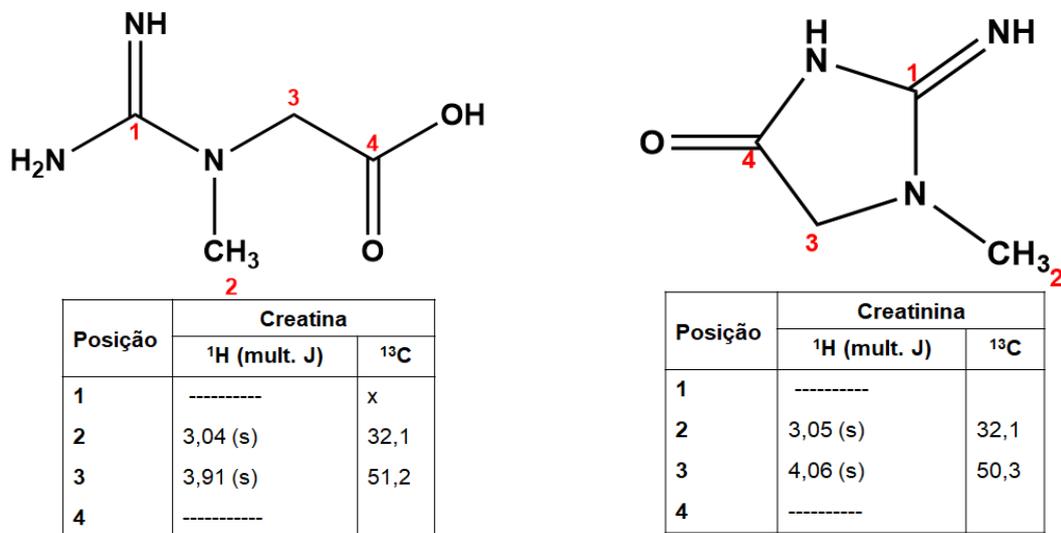


Figura 34. Estrutura química com os respectivos valores de deslocamento químico de RMN ¹H e ¹³C dos metabólitos creatina e creatinina.

A degradação da creatina/fosfocreatina em creatinina/fosfocreatinina, através da ciclização intramolecular (Figura 35), é favorecida por diferentes condições físico-químicas, incluindo temperatura (CHAN, 1994). Creatina e creatinina foram as substâncias responsáveis pelo efeito do aumento do sabor do renque seco tradicional japonês (*Clupea pallasii*) usado no preparo da sopa japonesa (SHAH, 2010).

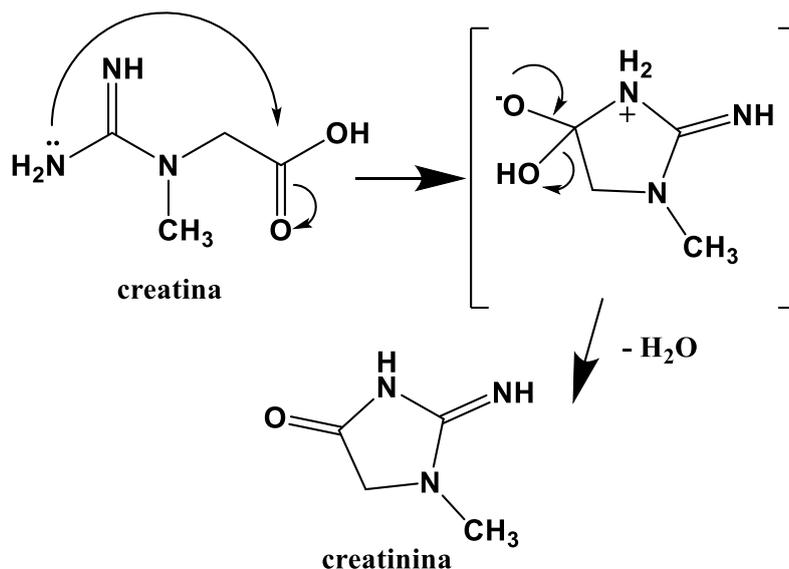


Figura 35. Mecanismo de reação do processo de degradação da creatina em creatinina através da ciclização intramolecular.

Além desses, os aminoácidos dimetilglicina, taurina e glicina foram identificadas nas duas matrizes de pirarucu, no entanto, a betaína apenas foi encontrada na carne fresca do pirarucu. Suas estruturas e principais assinalamentos podem ser vistos na figura 36.

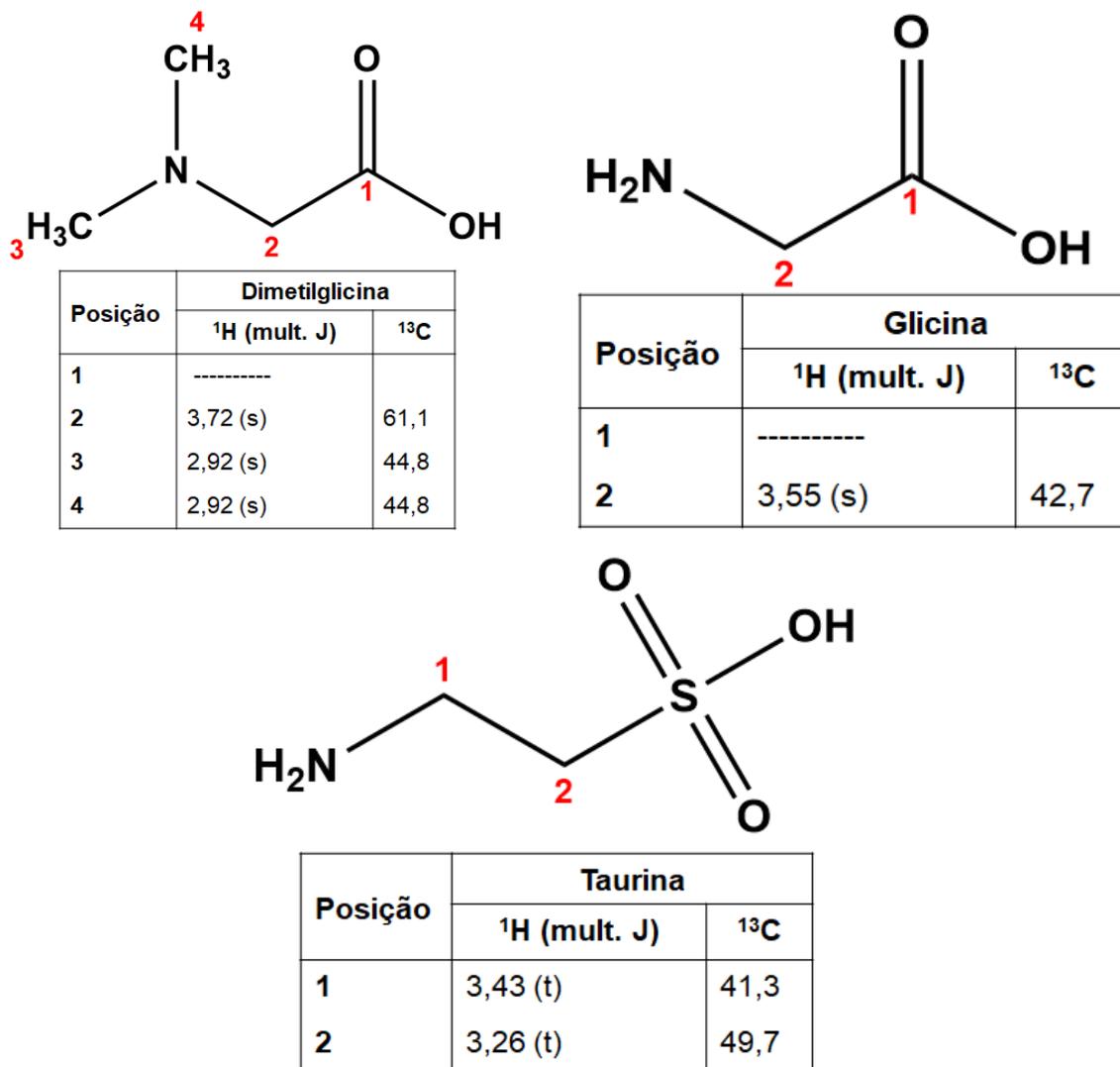
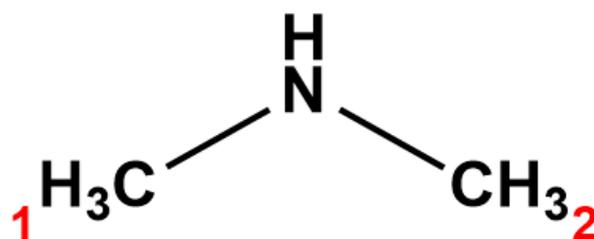


Figura 36. Estrutura química com os respectivos valores de deslocamento químico de RMN ¹H e ¹³C dos metabólitos dimetilglicina e glicina (em cima) taurina (em baixo).

A amina biogênica dimetilamina (Figura 37) foi encontrada nas amostras de pirarucu frescas e secas, nas condições comercializadas. A trimetilamina (TMA) é metabólito microbiano e pode ser usada somente como índice de deterioração, não como um índice de frescor.

Primariamente, o desenvolvimento de TMA em alimentos do mar dependem primariamente no teor do substrato TMAO (óxido trimetilamina) que

então é reduzido para TMA por algumas espécies na flora bacteriológica de peixe em deterioração, como *Shewanella putrefaciens*, *Photobacterium phosphoreum* e Vibrionacea. Mesmo com o interrompimento da atividade bacteriana através do congelamento, o TMAO pode continuar se degradando para formar DMA através da enzima endógena TMAOase, como observado em gadoides (GILL, 1982); dessa forma, ao menos que o peixe esteja muito estragado antes do congelamento, o DMA pode ser usado como marcador de congelamento desta espécie.



Posição	Dimetilamina	
	¹ H (mult. J)	¹³ C
1	2,74 (s)	38,2
2	2,74 (s)	38,2

Figura 37. Estrutura química com os respectivos valores de deslocamento químico de RMN ¹H e ¹³C da dimetilamina.

A colina e seu derivado fosfocolina também foram identificados nas amostras de pirarucu (Figura 38). A colina e seus derivados são considerados metabólitos essenciais oriundos da hidrólise de fosfolipídios. Dentro do contexto de processos, a colina e seus derivados têm sido apontados como substâncias para avaliar condições de estocagem (SCANO, 2009). A colina, juntamente com a betaína, são metabolizadas para gerar TMA, que por sua vez produz DMA. Do ponto de vista fisiológico, a betaína é importante para a função hepática, replicação celular e reações de desintoxicação, além de desempenhar um papel na síntese de carnitina e proteger os rins de danos (MARTINEZ, 2005).

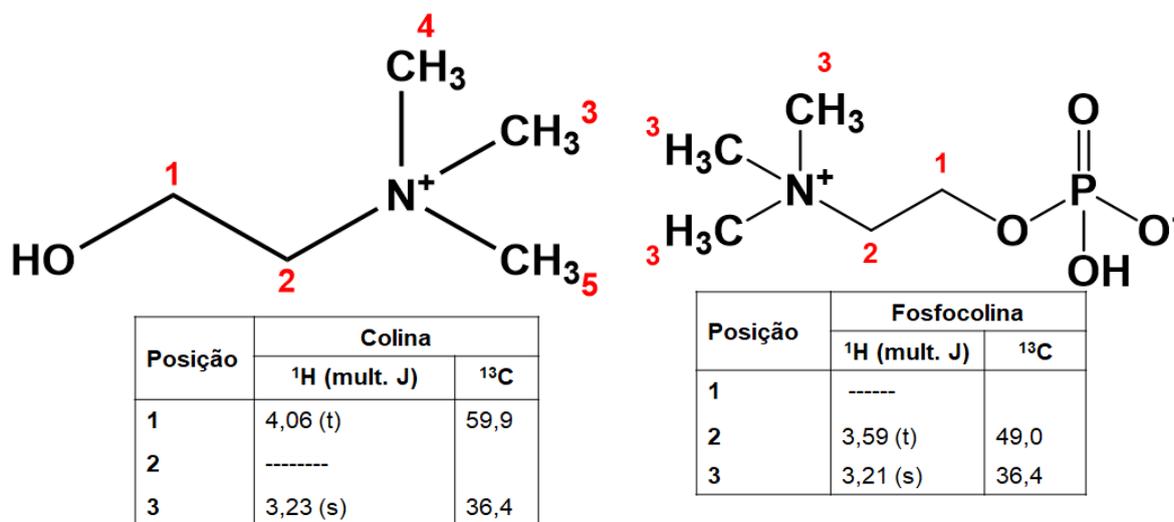


Figura 38. Estrutura química com os respectivos valores de deslocamento químico de RMN ¹H e ¹³C dos metabólitos colina e fosfocolina.

ALTA FREQUÊNCIA (δ 5,0 a 10,0)

A região espectral de alta frequência no espectro de RMN de ¹H mostrou inexpressiva quantidade de metabólitos (Figura 39). Nas amostras da carne de pirarucu analisado pelo experimento produzido, o perfil espectral da matriz fresca e salgada seca demonstrou algumas similaridades.

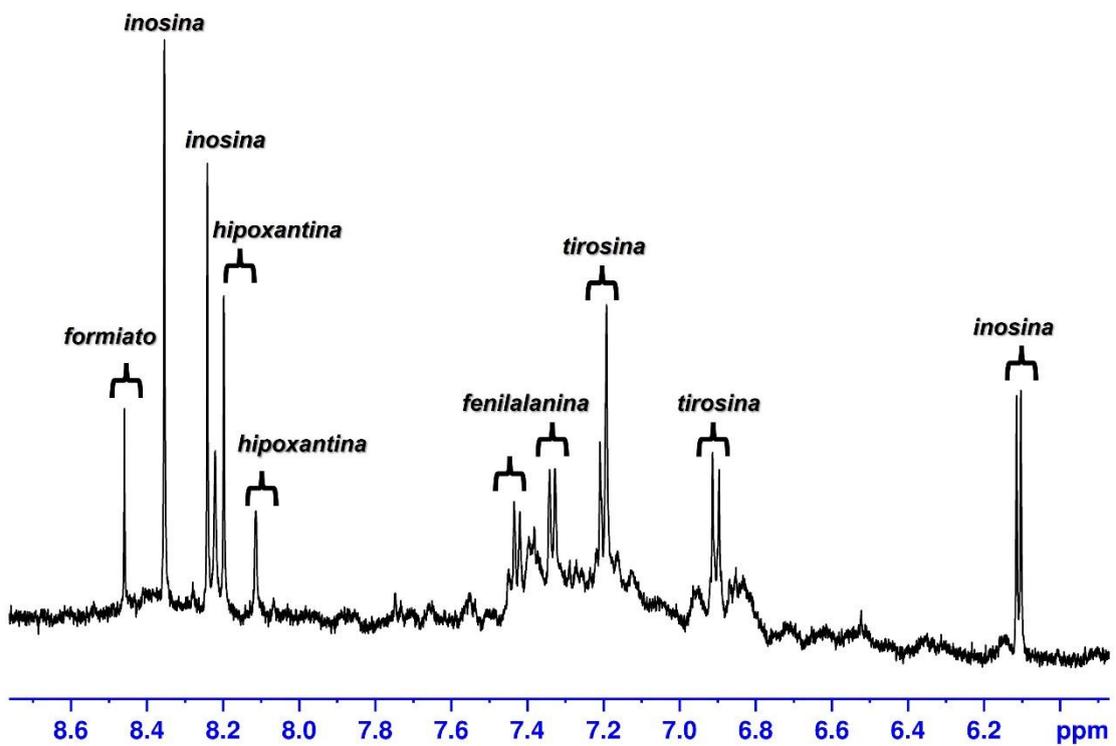
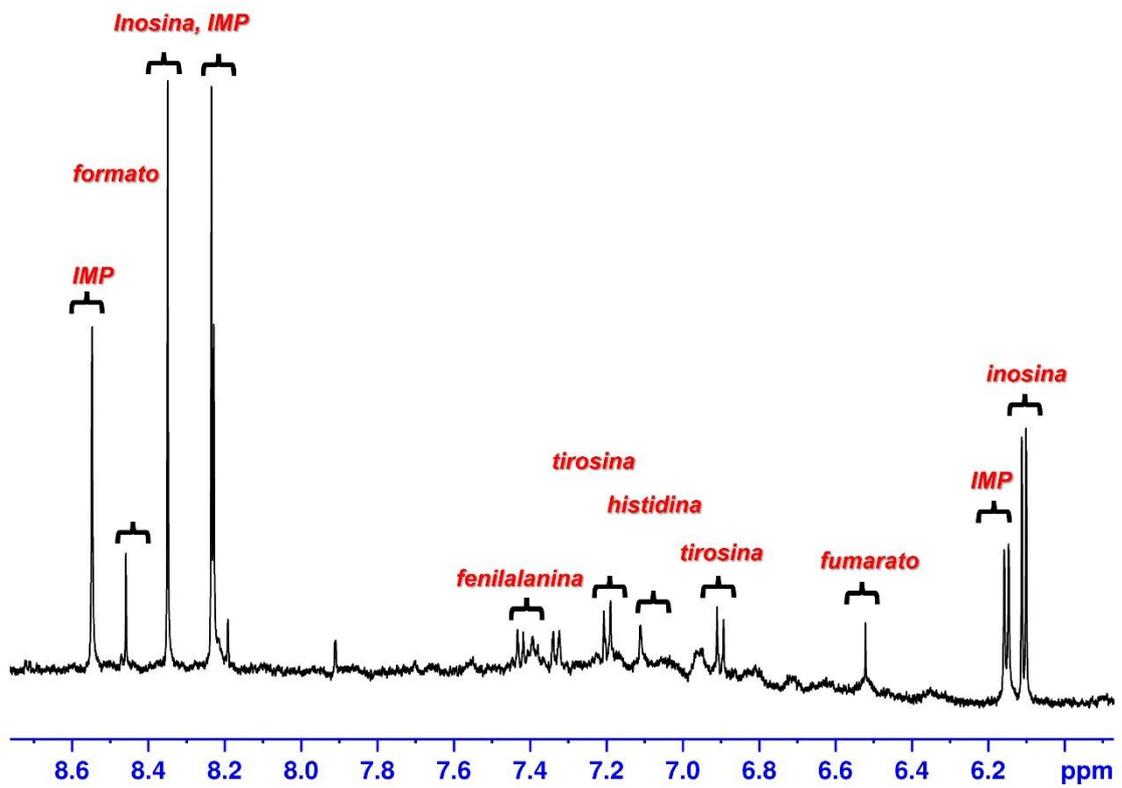


Figura 39. Região de alta frequência do espectro de RMN de ^1H com os principais assinalamentos do A) (em cima) pirarucu fresco e B) (em baixo) pirarucu salgado-seco.

Os grupos de compostos identificados nessa região, em sua maioria são aromáticos. Na classe dos aminoácidos, os metabolitos tirosina, histidina e fenilalanina foram caracterizados pelos seus hidrogênios desblindados do anel aromático, com os respectivos assinalamentos descritos na figura 40.

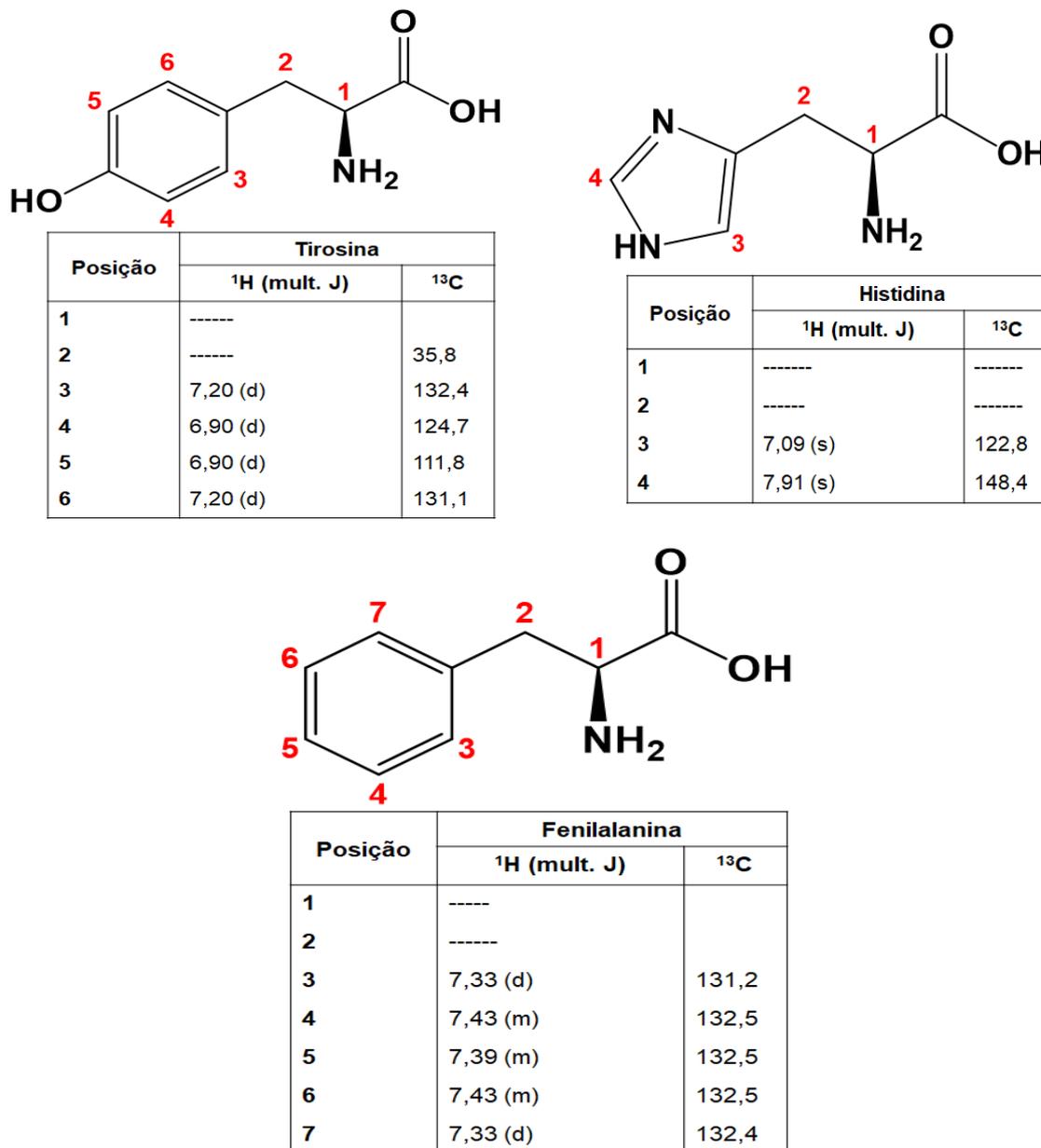


Figura 40. Estrutura química com os respectivos valores de deslocamento químico de RMN ¹H e ¹³C dos metabolitos tirosina e histidina (em cima) fenilalanina (em baixo).

Os ácidos orgânicos fumarato e formiato, foram identificados apenas nas matrizes de pirarucu fresco. Suas estruturas e principais assinalamentos podem ser visualizados na figura 41.

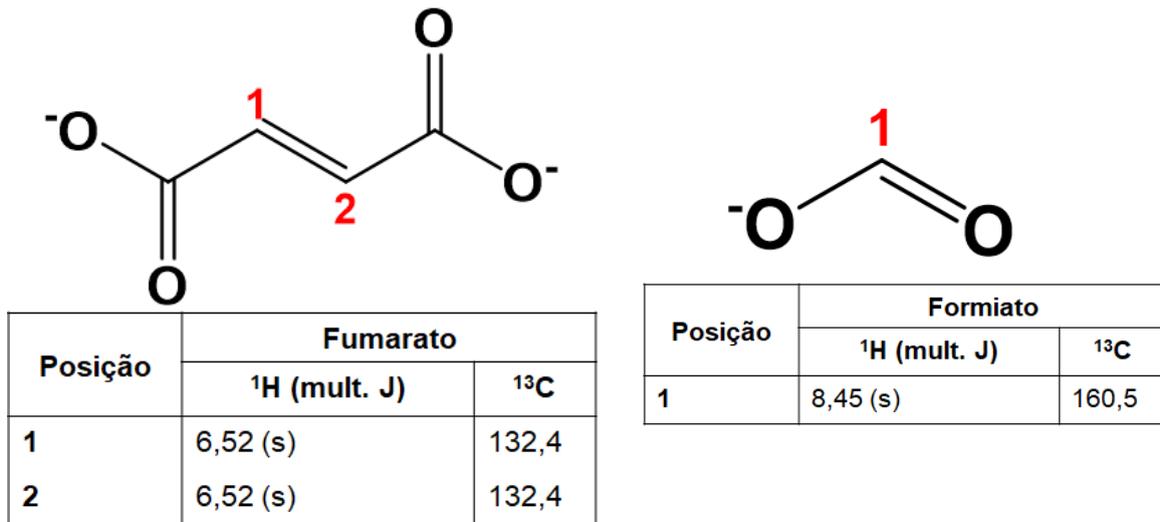


Figura 41. Estrutura química com os respectivos valores de deslocamento químico no espectro de RMN ¹H e ¹³C dos metabólitos fumarato e formiato.

Ainda nessa região espectral, foram identificados os sinais referentes aos nucleotídeos inosina, inosina monofosfato (IMP) e hipoxantina (Figura 42). Os nucleotídeos são importantes para peixes e frutos, contribuindo para o sabor e índice de qualidade (LOU, 2021). O ATP é o nucleotídeo predominante nos músculos de animais vivos sob condições normais, mas depois de mortos uma sequência de reações enzimáticas conduz para a uma série de degradação sequencial do ATP em adenosina difosfato (ADP), adenosina monofosfato (AMP), adenosina, inosina monofosfato (IMP), inosina, hipoxantinas, xantinas, e por fim, o ácido úrico (SALLAM, 2007). O ATP e seus produtos de degradação têm sido relacionados com a perda do frescor em uma série de espécies de peixes através do chamado índice K. Este é calculado a partir da soma das concentrações da inosina e hipoxantina dividido pela soma das concentrações ATP, ADP, AMP, IMP, inosina e hipoxantina. Além do índice K, a presença do IMP vem sendo associado com o sabor doce, fresco e umami dos peixes, enquanto a inosina e hipoxantina com o sabor amargo em carnes (LOU, 2018; YANG, 2019). O IMP foi apontado ter sinergia com o ácido glutâmico para potencializar o gosto umami dos alimentos.

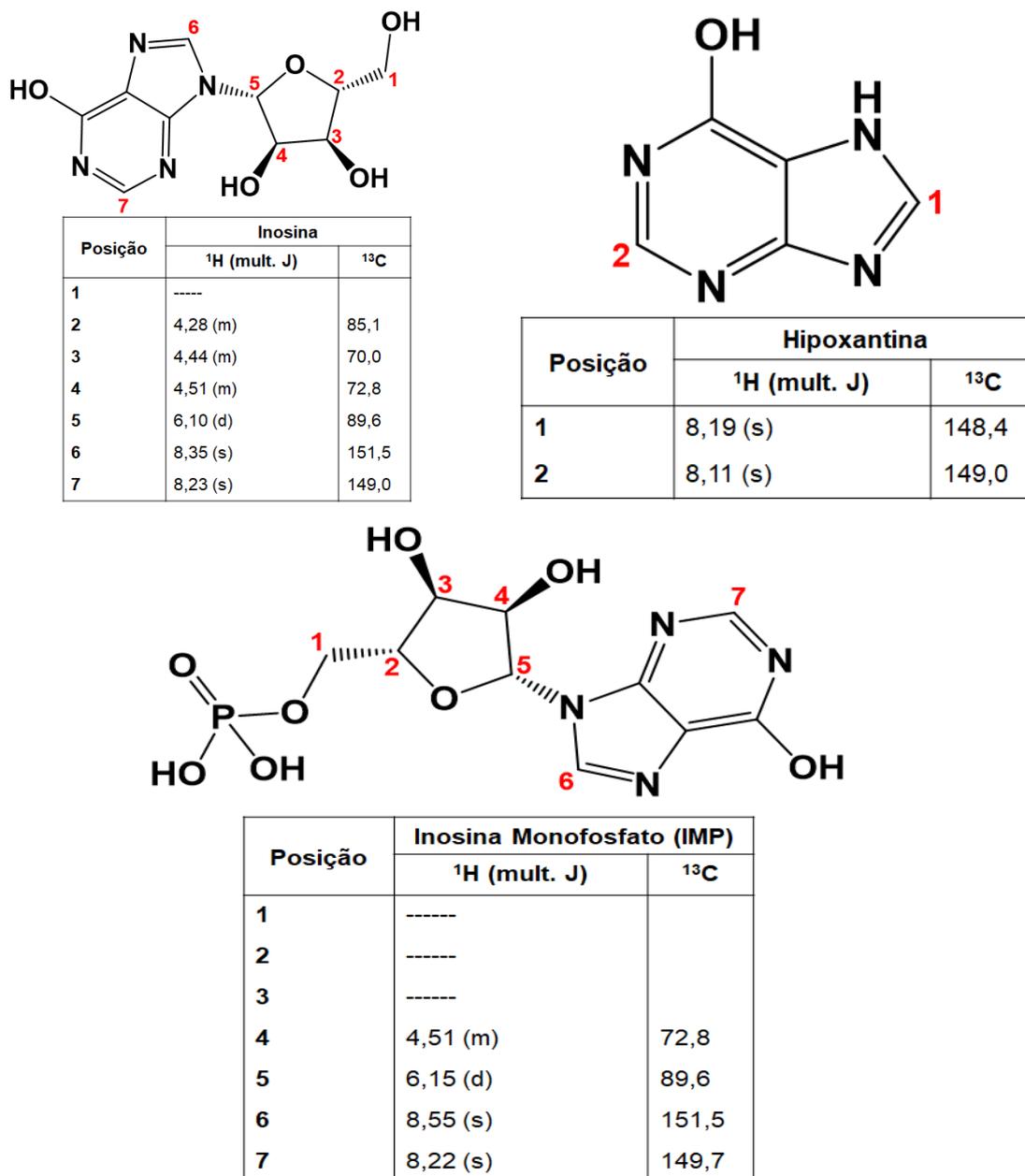


Figura 42. Estrutura química com os respectivos valores de deslocamento químico no espectro de RMN ¹H e ¹³C dos metabólitos inosina e hipoxantina (em cima) IMP (em baixo).

5.4.2 Perfil Metabólico das Amostras Produzidas

A Figura 43 demonstra o espectro representativo de RMN de ¹H das amostras produzidas de pirarucu fresco (PFP) e pirarucu salgado-seco (PSP). Conforme pode ser observado, os espectros possuem grande quantidade de sinais de compostos na região de baixa frequência (δ 0,70 a 2,10) e na região de

média frequência (δ 2,20 a 4,50).

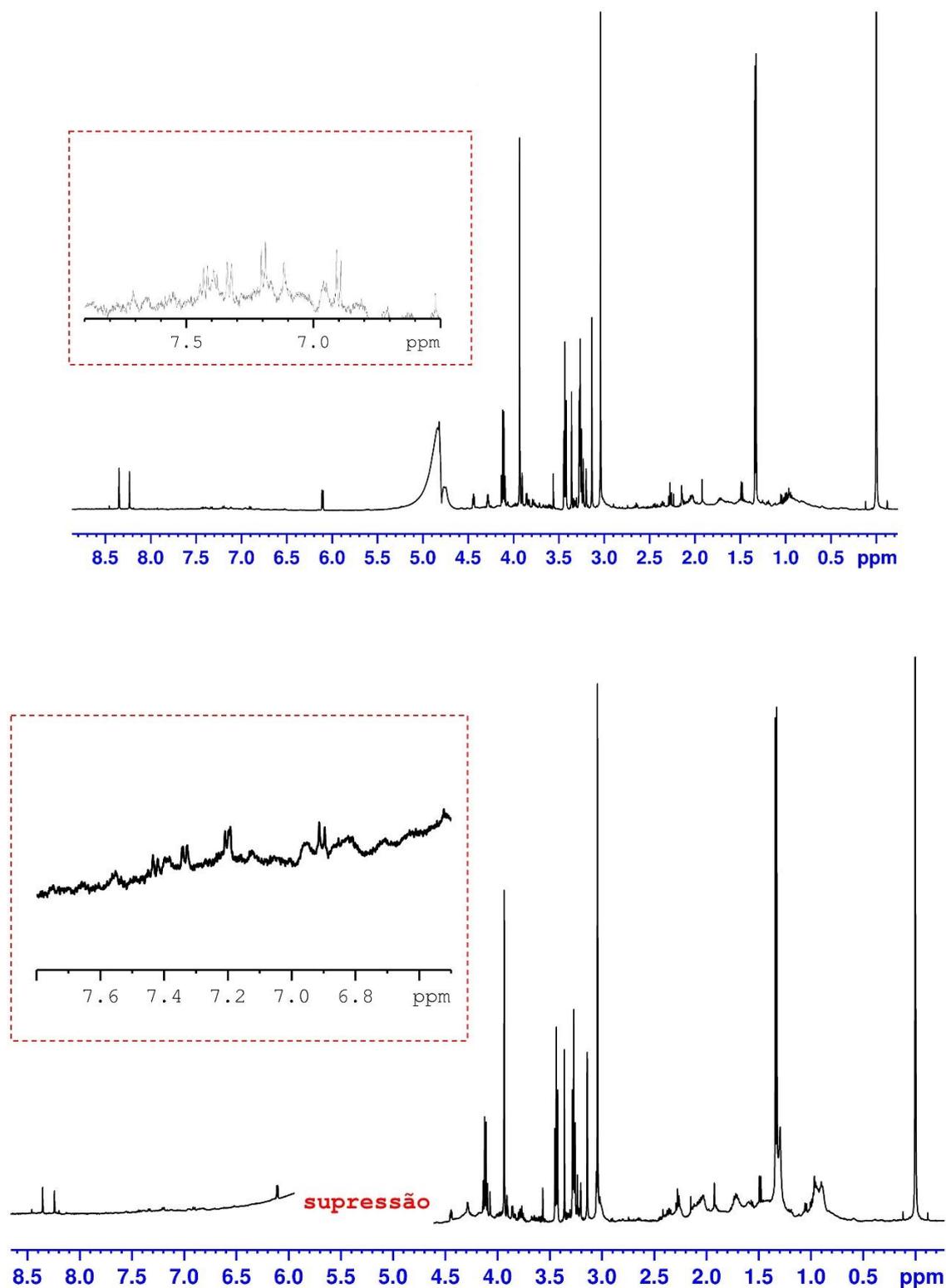


Figura 43. Espectro de RMN de ¹H representativo das amostras de pirarucu fresco (cima) e salgado-seco(em baixo) do experimento produzido.

O espectro de RMN de ^1H mostra que embora tenha-se observado similaridades entre os compostos presentes nas amostras comerciais e produzidas, foi possível observar que nas amostras frescas produzidas ocorre a presença de trimetilamina e metionina e na salga-seca formaldeído, compostos não identificados no experimento com amostras das feiras.

O assinalamento dos principais sinais dos metabolitos identificados no espectro de RMN de ^1H são visualizados na Figura 44. Os valores exatos de deslocamento químico e constante de acoplamentos podem ser vistas na tabela 6 citada anteriormente.

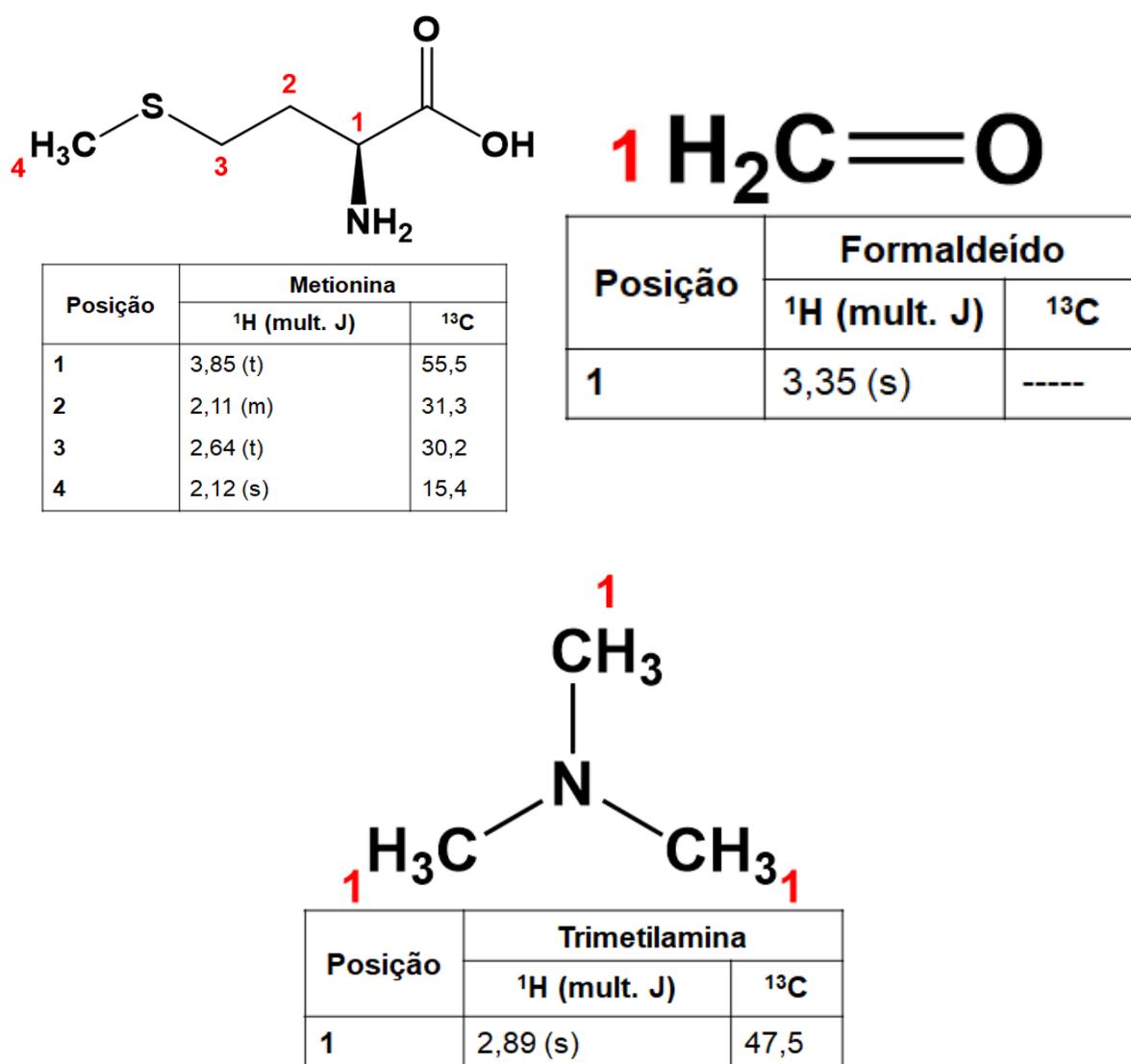


Figura 44. Estrutura química com os respectivos valores de deslocamento químico no espectro de RMN ^1H e ^{13}C dos metabolitos metionina e formaldeído (em cima) trimetilamina (em baixo).

A metionina possui importante papel na síntese de proteínas e no metabolismo de outros aminoácidos, além de ser muito importante no desenvolvimento muscular do peixe. No processo de combate ao estresse oxidativo, a metionina está envolvida na biosíntese da glutatona, um composto antioxidante que protege as células do estresse oxidativo.

A trimetilamina, encontrada nas amostras de pirarucu fresco e salgado seco do experimento produzido, é uma amina biogênica produzida pela ação de bactérias presentes na carne do peixe logo após o processo de abate do animal. As bactérias do gênero *Pseudomonas* através da enzima triaminase são as responsáveis pela redução do óxido de trimetilamina em trimetilamina. Além desse gênero, os estudos de Araújo (1975) relataram que as bactérias *Escherichia coli* apresentam altas taxas de atividades triaminasicas as temperaturas ambiente. Nesse sentido, a trimetilamina possui importância na indicação do índice de deterioração do pescado (CHUM, 2014).

O formaldeído, metabólito descrito presente nas amostras de pirarucu salgado-seco, é um dos subprodutos do processo de degradação do óxido de trimetilamina (TMAO) logo após o início do período *post mortem*. A degradação do TMAO produz trimetilamina, dimetilamina e formaldeído através da catálise realizada pela enzima endógena trimetilamina-N-óxido demetilase (TMAOase) (JINADASA, 2022). A formação de formaldeído depende do tempo e da temperatura de armazenamento do congelado, a presença em altas concentrações resulta no endurecimento muscular (LALY, 2018).

Além desses metabólitos, os espectros de RMN de ^1H das amostras salgadas secas produzidas mostram um sinal em 1,29 ppm que se sobrepõe a sinais de alguns aminoácidos importantes para a identificação no espectro. Conforme pode ser visualizado na Figura 45, o sinal se sobrepõe na região de hidrogênios alifáticos nos espectros de RMN de ^1H . O mesmo sinal foi observado nas amostras de pirarucu salgado seco coletadas na zona leste da cidade de Manaus, no experimento com amostras comerciais.

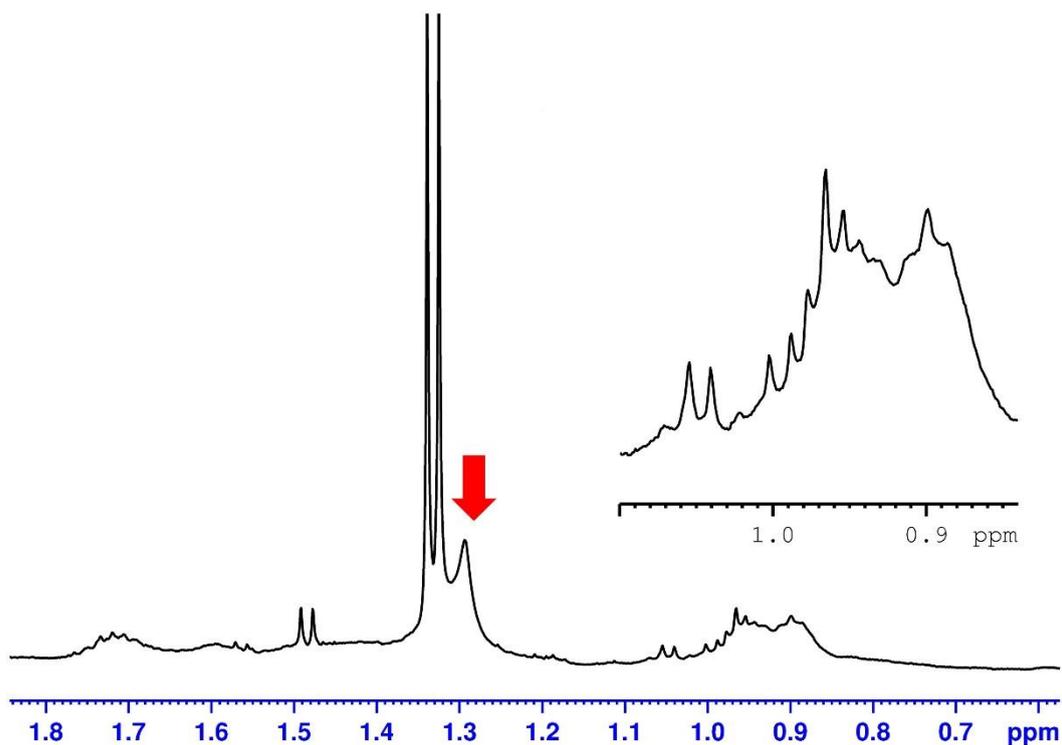


Figura 45. Espectro de RMN de ¹H com a presença de um sinal sobreposto ao dubleto do lactato nas amostras de pirarucu salgado-seco.

O experimento com as amostras produzidas permitem identificar mudanças no perfil espectral que são mais promissoras na descrição de compostos que podem ser relacionados ao processo de salga e secagem. Isso se dá devido ao maior controle das variáveis no experimento das amostras produzidas em laboratório. Nele é possível acessar o perfil químico dos mesmos peixes nos dois momentos do experimento: fresco e depois do processo de salga.

5.5 Análise dos Dados Quimiométricos

Para a discriminação entre as amostras de pirarucu fresco e seco, foi realizada a análise por componentes principais (PCA) e análise discriminante de mínimos quadrados parciais (PLS-DA) a fim de avaliar a diferença dos perfis espectrais obtidos.

A intensidade dos sinais obtidos foi tabelada em matrizes contendo todas as amostras em réplicas e os seus respectivos valores de deslocamento químico. Essa matriz de dados foi importada para o programa matemático *PLS Toolbox Solo*, versão 9.0 para a realização das análises estatísticas.

5.5.1 Etapa de Pré-processamento dos dados

Em análises de metabólitos de matrizes complexas, uma etapa significativamente importante é o pré-processamento dos dados, considerando que todas as amostras devem estar comparáveis entre si. A utilização de pré-processamento visa eliminar informações não relevantes do ponto de vista químico e tornar a matriz de dados melhor condicionada para a análise, possibilitando maior eficiência na exploração dos dados (SOUZA, 2012). Nesse sentido, os espectros foram então ajustados mediante a aplicação de três pré-processamentos padrões em análises de espectros de RMN. As amostras comerciais foram utilizadas nessa etapa do estudo.

A Figura 46 mostra os dados de RMN de ^1H obtidos a partir das amostras de pirarucu fresco e seco sem a aplicação dos pré-processamentos. A presença de ruídos em espectros de ressonância magnética nuclear pode ocasionar em possíveis interpretações equivocadas dos dados. Outro fator importante em dados de RMN é a fase dos sinais dos metabólitos, caso não seja eficientemente corrigida, esta pode acarretar em divergências na sua intensidade, que podem ser confundidas com alterações na composição química das amostras.

Desta forma, a linha de base e a fase dos espectros foram ajustados utilizando o método *baseline (Automatic Weighted Squares, order 3)* do software *PLS TooBox*. Esse método utiliza uma abordagem automática para determinar quais pontos são mais prováveis levando em consideração a linha de base, dessa forma, ocorre um ajuste da linha de base para cada espectro determinando quais variáveis estão acima da linha de base e quais estão abaixo. Nesse método também é possível determinar a ordem do polinômio usado para aproximar as linhas de base, para essas amostras a ordem do polinômio usada foi 3.

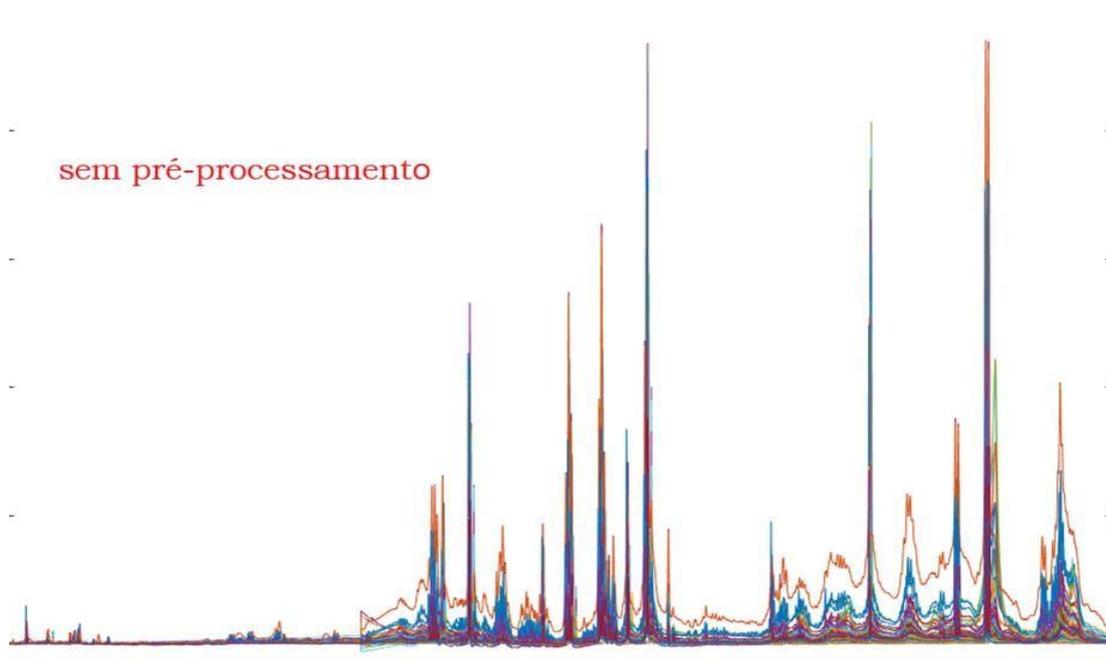


Figura 46. Matriz de dados de RMN de 1H das amostras de pirarucu comercial sem aplicação de nenhum tipo de pré-tratamento dos dados, demonstrando variações entre os espectros.

Além da preocupação com a linha de base e com a fase dos espectros, é imprescindível na etapa de pré-processamento o alinhamento dos sinais para que se obtenha melhor interpretação dos dados. Em análises de RMN muitos fatores podem influenciar na aquisição dos dados, entre eles pode se citar a variação da temperatura e até mesmo alterações no pH das amostras em aquisição. Tais fatores podem alterar a mudança na posição dos sinais dos metabólitos e conseqüentemente levar a interpretações indevidas.

De acordo com Ebrahimi e colaboradores (2017), o sucesso das

análises multivariadas para um conjunto de dados de RMN depende da boa reprodutibilidade nos dados e da mínima variação na posição dos sinais entre as medições. Para nosso conjunto de dados foi aplicado o processo de alinhamento *Variable Alignment (COW, slack=5)* esse método ajusta os dados para o deslocamento dos eixos variáveis, através da utilização do algoritmo de alinhamento *correlation optimized warping (COW)* que transforma as amostras por partes, ajustando os segmentos no processo de correlação. O deslocamento máximo (*slack*) que cada segmento pode ser deslocado foi definido para 5. A Figura 47 mostra os dados espectrais em uma região com deslocamento químico entre 2,2 – 4,5 ppm após a aplicação do método de alinhamento e correção da linha de base.

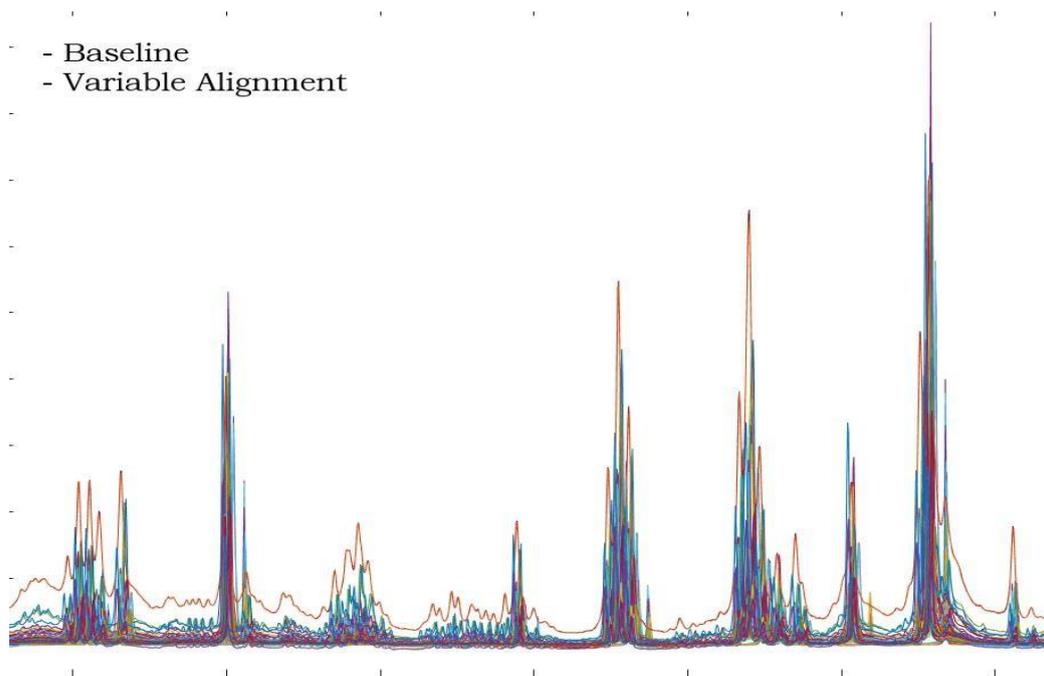


Figura 47. Matriz de dados de RMN de ^1H das amostras de pirarucu comerciais após a correção da linha de base e alinhamento dos sinais dos metabolitos para PCA (expansão 2,20-4,50 ppm).

Em dados de espectroscopia, apenas o alinhamento e a correção da linha de base dos espectros de RMN muitas vezes não são suficientes para que se obtenha uma discriminação real das amostras. Os problemas de aquisição referente a não reprodutibilidade do *shimming* e variações na concentração das amostras quando comparadas às outras, tornam necessário a aplicação de

transformações matemáticas que são aplicadas aos dados com o objetivo de diminuir essas variações sistemáticas indesejadas e trazer informações químicas relevantes.

Dentre as transformações matemáticas, a normalização é um método que visa corrigir esses efeitos em dados de RMN, através da identificação de aspectos de cada amostra que são essencialmente constantes de uma amostra para a outra, dessa forma, a normalização corrige a escala das variáveis com base nessa característica constante (WISE,2006).

Nesse aspecto, os espectros de RMN das amostras de pirarucu, foram normalizados para a norma um, que determina a ordem de normalização, ou seja, a área sob cada espectro foi considerada igual a um. Além da correção das variações indesejadas, a normalização ajudou a inferir aos dados o mesmo valor de impacto no modelo. A Figura 48 mostra a mesma região descrita anteriormente, após a aplicação do método de normalização em torno da norma e área 1.

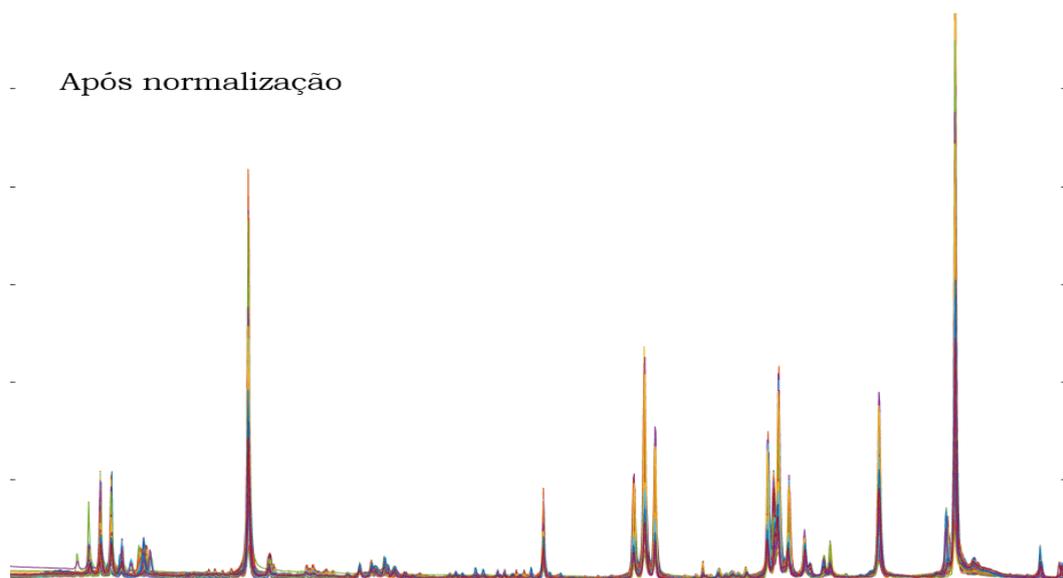


Figura 48. Matriz de dados de RMN de ^1H após a correção da linha de base, alinhamento e normalização dos sinais dos metabolitos para PCA (expansão 2,70 -4,10 ppm).

Em alinhamento com os pré-processamento das amostras, outra etapa de grande relevância em análises de dados multivariados é o pré- processamento nas variáveis. Entre os pré-processamentos mais indicados na utilização de

dados de RMN a centralização em torno da média e o “escalamento *paretto*” são os mais utilizados em análises metabolômicas (BRERETON e colaboradores, 2017).

O método de pré-processamento centralização na média é o mais comum, através de algoritmos, o método remove um deslocamento espectral comum de cada espectro medido, permitindo-se dar enfoque na análise das diferenças entre as amostras. Após a aplicação da centralização os valores dos sinais se aproximam de zero em vez do valor médio dos sinais. A centralização na média é útil quando não se quer que os ruídos interfiram negativamente na discriminação das amostras. Nas análises desses dados foram testados os dois pré- processamentos citados anteriormente, a fim de se obter o melhor resultado. No entanto, baseando-se nos resultados obtidos, optou-se pela centralização na média, uma vez que não houve diferença entre os dois pré-processamentos.

A Figura 49 mostra a região dos hidrogênios de média frequência (2,70 – 4,10 ppm) já citados anteriormente após a aplicação do pré-processamento sobre a variável centralizada na média.

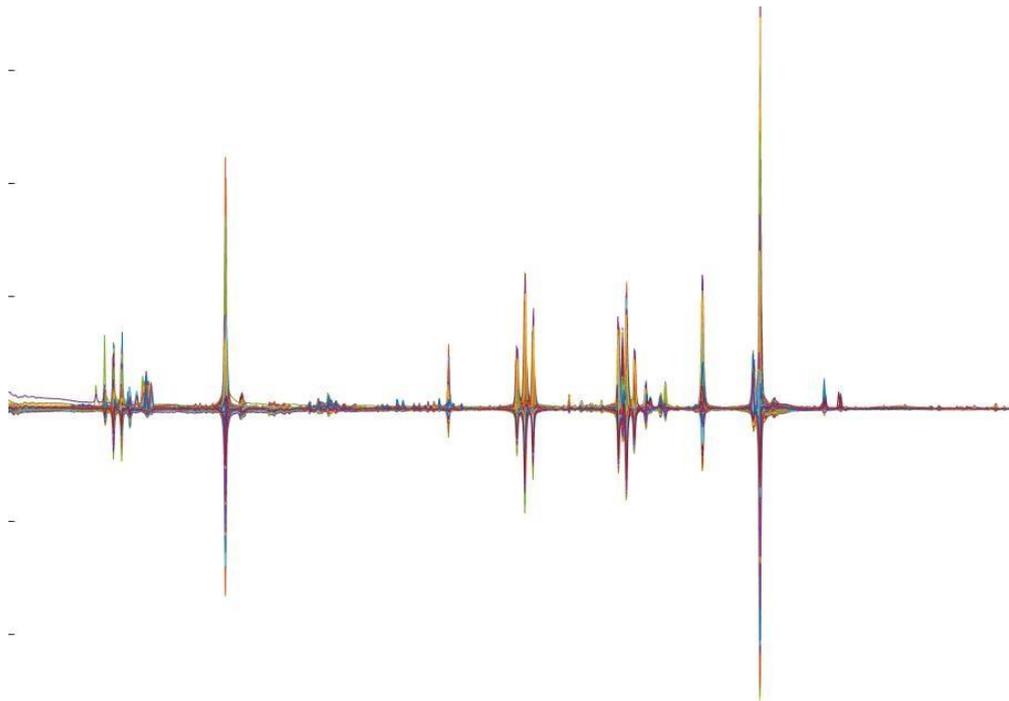


Figura 49. Matriz de dados de RMN de ^1H a aplicação dos pré-processamentos sobre as variáveis e sobre os dados para análise por PCA (expansão 2,70 – 4,10 ppm).

5.5.2 Análise por componentes principais (PCA) das amostras comerciais

Discriminação entre matrizes de Pirarucu Fresco e Salgado-Seco

Para avaliar as diferenças metabólicas entre as amostras de pirarucu fresco e pirarucu seco realizou-se a análise por componentes principais (PCA). PCA é uma abordagem estatística multivariada que permite visualizar as variações presentes no conjunto amostral, por meio do agrupamento das amostras ou pela dispersão dos dados nas componentes principais.

Para isso, inicialmente é necessário determinar a quantidade de componentes principais (PCs) que poderão ser usadas para a melhor compreensão dos dados quimiométricos. A Figura 50 mostra o gráfico de variância acumulada por número de componentes principais.

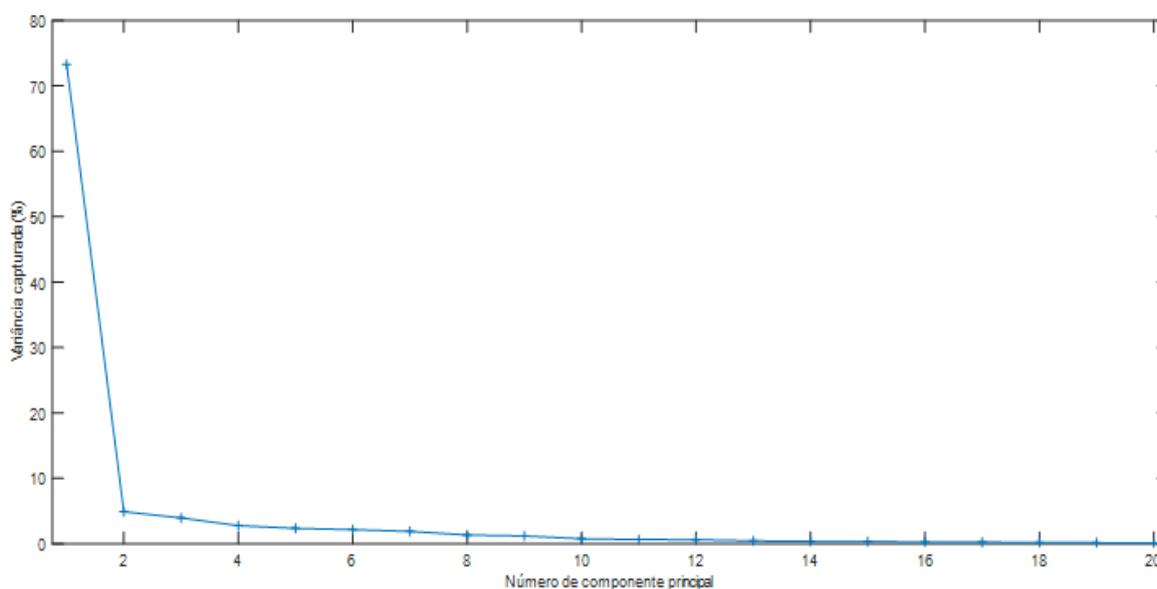


Figura 50. Gráfico de variância acumulada VS número de componentes principais para explicar a utilização de 4 PCs nesse modelo.

O gráfico demonstra um decréscimo nítido de variância com o aumento do número de PCs, logo cada componente principal sucessiva vai possuir cada vez menos informação a respeito dos dados. Com isso observa-se que a partir de 4 PCs a variância cumulativa para esse conjunto de dados diminui consideravelmente, portanto, foi definido a utilização de 4 componentes principais para análise dos dados de RMN de ^1H das amostras de pirarucu fresco e salgado.

A Figura 51 evidencia a análise por PCA realizada entre as amostras frescas e secas de pirarucu por meio do gráfico de scores selecionando-se as componentes PC1 e PC2. As semelhanças entre as amostras podem ser vistas através da formação de agrupamentos em uma região da PC enquanto que as discrepâncias entre as amostras apresentam significativa distância. Os dados obtidos evidenciam uma forte tendência de separação entre as amostras de pirarucu fresco (vermelho) das amostras de pirarucu salgado-seco (verde). A combinação de PC1 versus PC2 demonstra uma variância total de 78,17% (sendo 73,27% da variância explicada pela PC1 e 4,90% referente à PC2).

Por fim, a combinação de PC1 versus PC4 demonstra uma variância total de 76,05% (sendo 73,27% da variância explicada pela PC1 e 2,78% referente à PC4). (Figura 53)

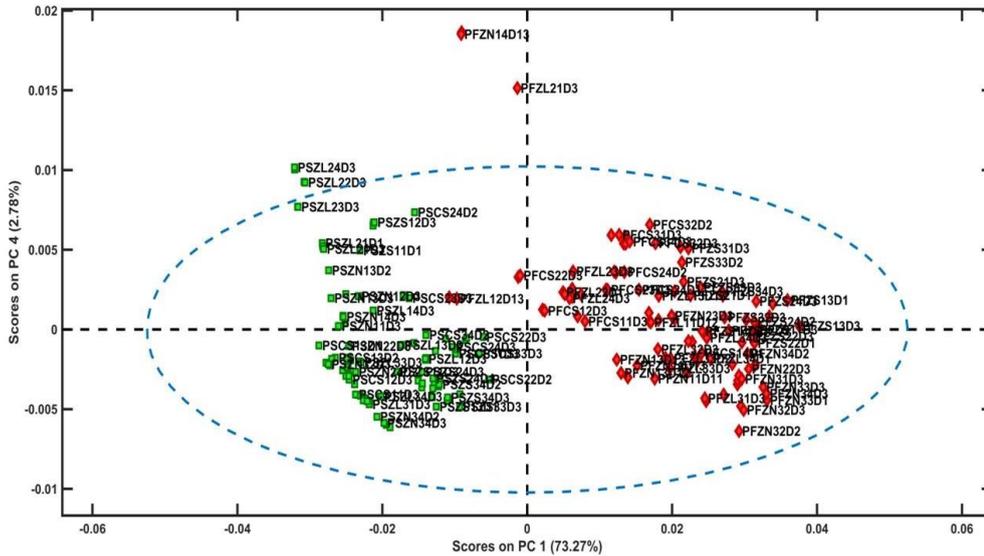


Figura 53. Gráfico de scores da análise por PCA de espectros de RMN de 1H das amostras de pirarucu fresco e salgado seco, em PC1 e PC3.

As combinações entre as componentes principais mostraram o mesmo comportamento na distinção entre as amostras de pirarucu fresco e pirarucu salgado-seco. Todos os gráficos de combinação entre as PCs demonstraram maior contribuição de PC1 na separação entre as matrizes de pirarucu. As amostras de pirarucu fresco, representado pela cor verde no gráfico, agruparam-se de acordo com as suas semelhanças em eixo positivo de PC1. Enquanto que as amostras de pirarucu salgado-seco agruparam-se em eixo negativo de PC1.

No entanto, como não houve distinção nos scores com a combinação entre as PCs, optou-se pela utilização da combinação entre PC1 vs PC2 para a discussão desse trabalho, pois se obteve a maior variância explicada (78,17%). (Figura 54)

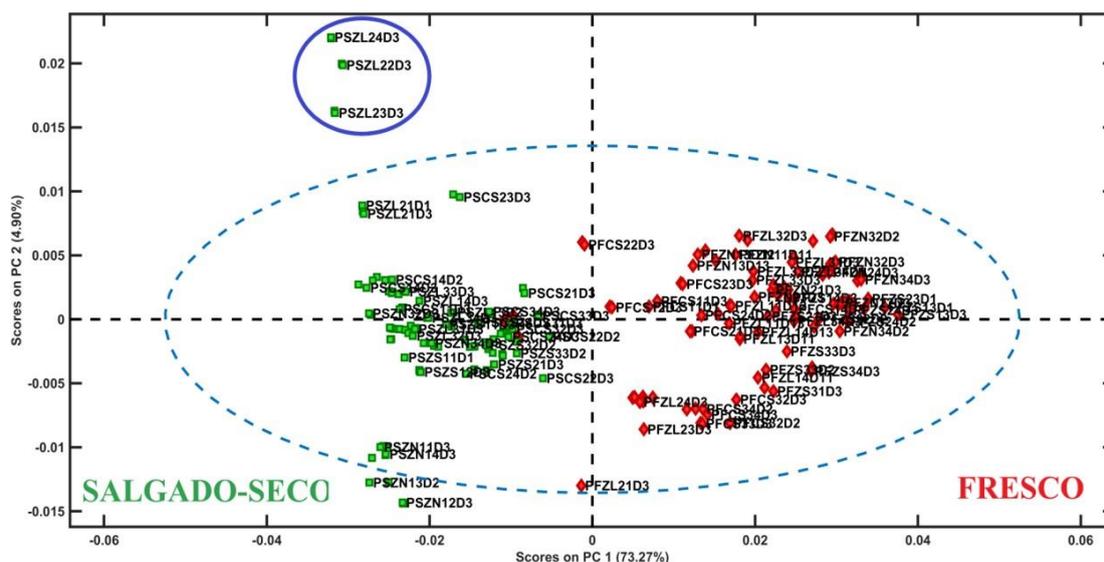


Figura 54. Gráfico de scores de PC1 vs PC2 dos espectros de RMN de 1H das amostras de pirarucu fresco e salgado-seco com amostras anômalas.

A combinação entre PC1 e PC2 revela a presença de um grupo de amostras fora do limite de confiança na matriz de pirarucu salgado-seco coletados na zona leste de Manaus, conforme pode ser visto na Figura 54, logo se utilizou os espectros de RMN de ^1H das respectivas amostras para análise de possíveis erros de aquisição dos espectros, a fim de classificá-las como *outliers* ou não. Os parâmetros de aquisição para os espectros em questão, não havia divergências das demais amostras de pirarucu salgado-seco. No entanto, verificou-se a presença de um sinal característico de hidrogênio metílico (δ 1,29) na região de hidrogênios alifáticos (δ 0,7 a 2,5) que se sobrepôs ao sinal do lactato (δ 1,32), conforme pode ser visto na Figura 55, que mostra a comparação do perfil químico, numa extensão de δ 0,7 a 2,0 entre as amostras de zona leste e as demais zonas de coleta.

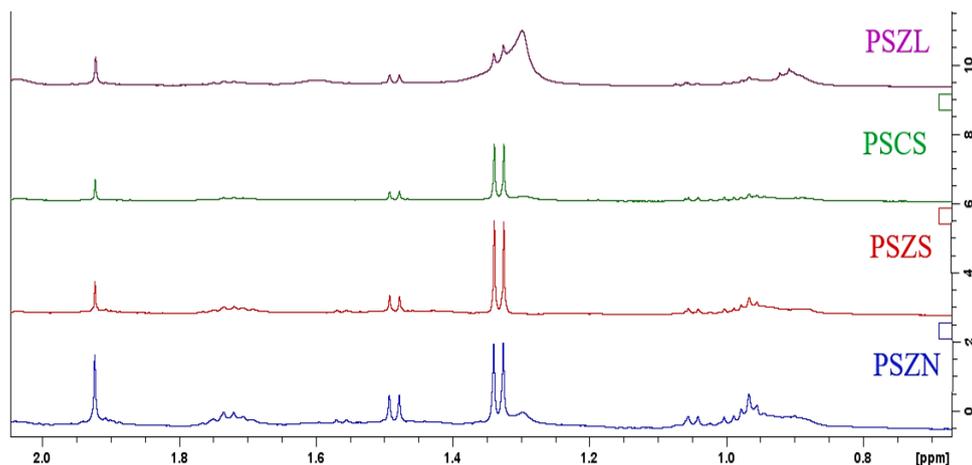


Figura 55. Comparação entre os espectros de RMN de ^1H das amostras de pirarucu salgado-seco coletado na zona leste e demais zonas de Manaus mostrando a diferença no perfil químico.

A análise do gráfico de *scores* de PC1 vs PC2 mostra a distinção entre as amostras de pirarucu fresco e salgado-seco de maneira bem clara. Ao observar o gráfico de *loadings* das amostras, é possível compreender quais os metabólitos responsáveis pela separação entre as matrizes de pirarucu.

O gráfico de *loadings* indica quais os compostos são responsáveis pela variância entre as duas matrizes. A Figura 56 mostra as variáveis responsáveis pelo agrupamento e diferenciação dos dados. De acordo com o gráfico de *loadings*, as amostras localizadas em eixo positivo de PC1 compreendem as amostras de pirarucu fresco, sendo agrupadas pela presença dos compostos: creatina (3,04 ppm; 3,93 ppm), ácido láctico (1,33 ppm; 4,11 ppm), taurina (3,43 ppm), betaína (3,26 ppm) e glicina (3,55 ppm). Para as amostras de pirarucu salgado-seco, agrupadas em eixo negativo de PC1 as amostras apresentam similaridade pela presença dos compostos: ácido acético (1,92 ppm), ácido succínico (2,41 ppm), N,N-dimetilglicina (2,93 ppm) e creatinina (3,05 ppm – 4,06 ppm).

Influência da região espectral na discriminação entre as matrizes

Com o intuito de verificar a influência de cada região espectral na separação das amostras de pirarucu, as matrizes de dados foram organizadas por valores de deslocamento químico. Dessa maneira, foram construídas três matrizes de dados que estavam relacionadas a cada região no espectro de RMN de ^1H que foram denominadas, matriz da região de baixa frequência contemplando a região de 0,70 a 2,10 ppm; matriz da região de média frequência contemplando a região de 2,20 a 4,50 ppm e região de alta frequência com região de 6,10 a 8,50 ppm.

REGIÃO DE BAIXA FREQUÊNCIA (δ 0,70 – 2,10)

A Figura 57 evidencia a análise por componentes principais das amostras de pirarucu frescas e salgadas-secas, contemplando apenas a região de hidrogênios alifáticos. Através das componentes principais obtém-se a separação de dois grupos amostrais com contribuição de PC1 (80,41%), as amostras de pirarucu fresco tendem a se agrupar em eixos positivos de PC1, porém, as amostras de pirarucu salgado-seco, agrupam-se em valores negativos de PC1, com menor distância entre elas.

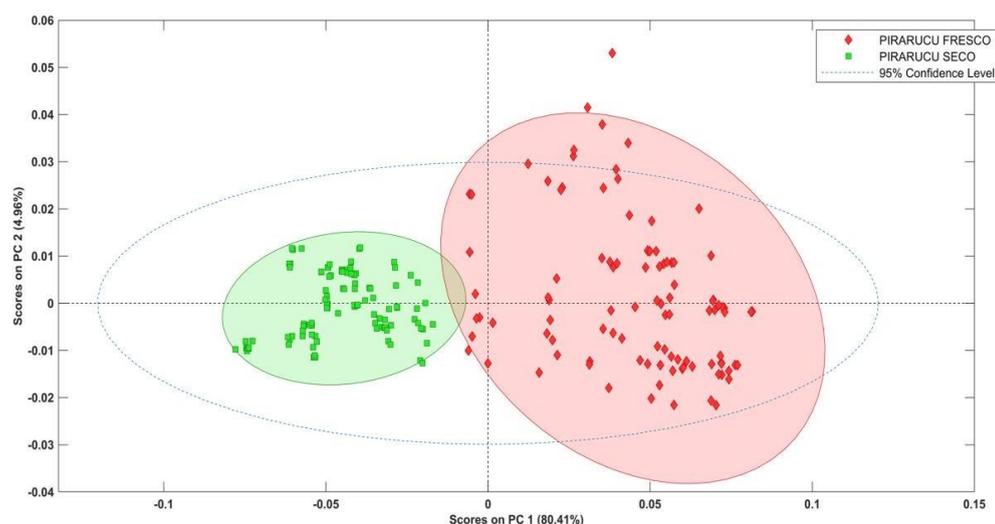


Figura 57. Gráfico de scores da análise por PCA de espectros de RMN de ^1H das amostras de pirarucu fresco e salgado seco, considerando a região de baixa frequência.

Como mostra o gráfico de *loadings* (Figura 58), os resultados observados são similares ao discutidos anteriormente, sendo o lactato (δ 1,33) e ácido acético (δ 1,92) os responsáveis pela separação entre o conjunto de dados. As amostras de pirarucu fresco se agrupam em eixo positivo de PC1 pela intensidade alta do sinal do lactato na sua matriz e as amostras de pirarucu salgado-seco se agrupam em eixo negativo de PC1 pela presença do sinal com alta intensidade do composto ácido acético.

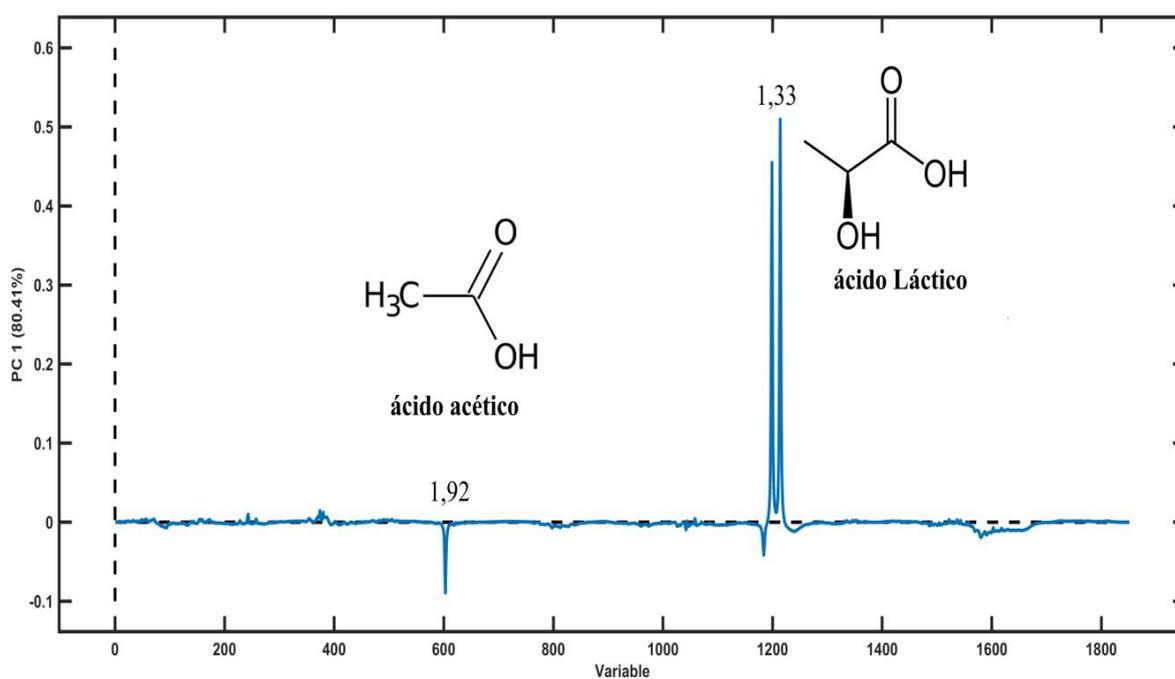


Figura 58. Gráfico de influências da análise por PCA de espectros de RMN de 1H das amostras de pirarucu fresco e salgado seco, considerando a região de baixa frequência com os metabolitos responsáveis pela discriminação entre as amostras.

O gráfico de scores das amostras de pirarucu fresco e salgado-seco para região de baixa frequência mostram alta variabilidade das amostras de matriz fresca, o comportamento dessas amostras pode está relacionado à variação da quantidade de lactato na carne desse pescado. O lactato é um dos compostos que é produzido após a morte do peixe, resultado do processo de abate do animal, logo pode se esperar maior variabilidade entre as zonas de Manaus, uma vez que não há o controle no processo de transporte do peixe entre os variados bairros, resultando em diferentes quantidades do ácido orgânico nas amostras.

REGIÃO DE MÉDIA FREQUÊNCIA (δ 2,20 - 4,50)

A análise exploratória por PCA dos conjuntos de dados do espectro de RMN de ^1H discriminou por PC1(63,50%), as amostras em duas classes, idênticas àquelas obtidas nas matrizes de baixa frequência. Em valores de PC1 positivos as amostras de pirarucu fresco apresentaram-se mais agrupadas sobre as componentes, igualmente nas amostras de pirarucu sagado-seco em eixos negativos de PC1. Além disso, as amostras de pirarucu salgado-seco coletados na zona centro-sul de Manaus demonstraram uma tendência de separação de amostras das demais zonas de coleta por PC2 (Figura 59).

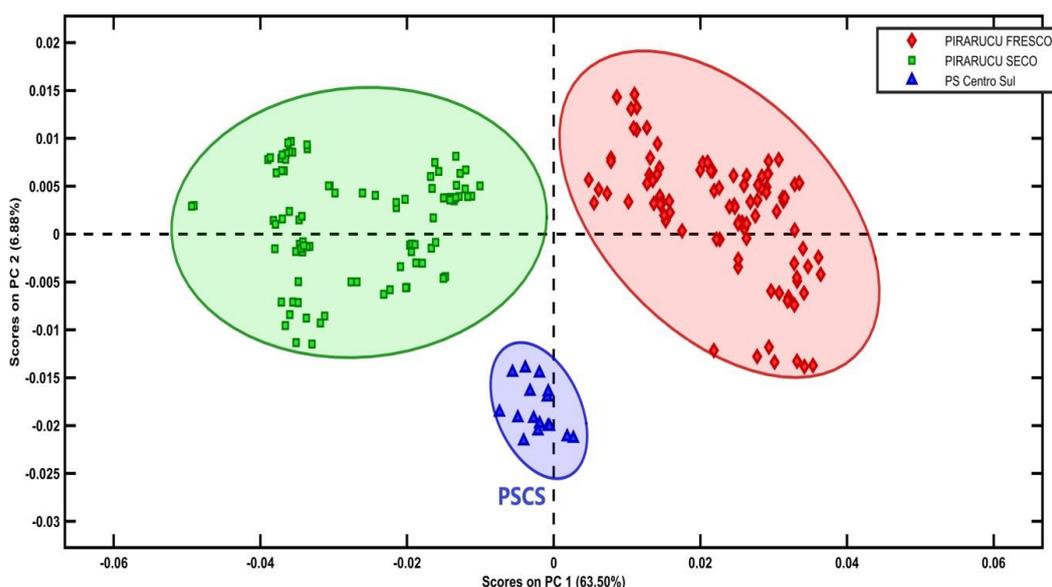


Figura 59. Gráfico de scores da análise por PCA de espectros de RMN de ^1H das amostras de pirarucu fresco e salgado seco, considerando a região de média frequência.

A análise do gráfico de influência (Figura 60) revelou que as amostras de pirarucu fresco e pirarucu salgado-seco, diferem-se entre si pela presença de alguns metabólitos exclusivos para cada matriz. As amostras de pirarucu fresco foram agrupadas pela presença dos compostos creatina (δ 3,04-3,39), fosfocolina (δ 3,23), taurina (δ 3,26- 3,43), glicina (δ 3,55) e lactato (δ 4,10).

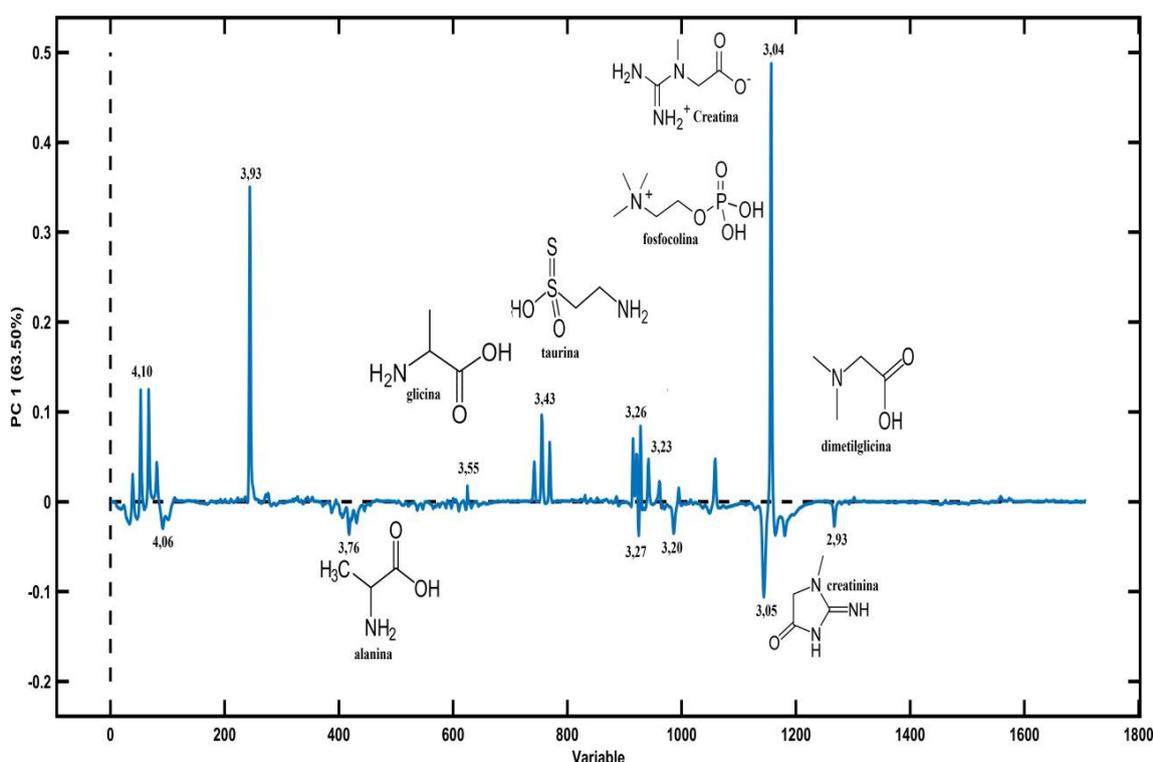


Figura 60. Gráfico de influências da análise por PCA de espectros de RMN de 1H das amostras de pirarucu fresco e salgado seco, considerando a região de média frequência os com os metabólitos responsáveis pela discriminação entre as amostras.

Para as amostras de pirarucu salgado-seco, o gráfico de influências revelou que os sinais dos metabólitos responsáveis pela similaridade desse conjunto amostral são os compostos, dimetilglicina (δ 2,93), creatinina (δ 3,05) e alanina (δ 3,76).

A fim de justificar a causa do comportamento das amostras de pirarucu salgado- seco da zona centro sul, foi verificado o gráfico de *loadings* em PC2. As amostras de pirarucu salgado-seco da zona centro sul se agruparam em eixo negativo de PC2, e são agrupadas por causa do composto creatinina (δ 3,05), conforme pode ser visto na Figura 61.

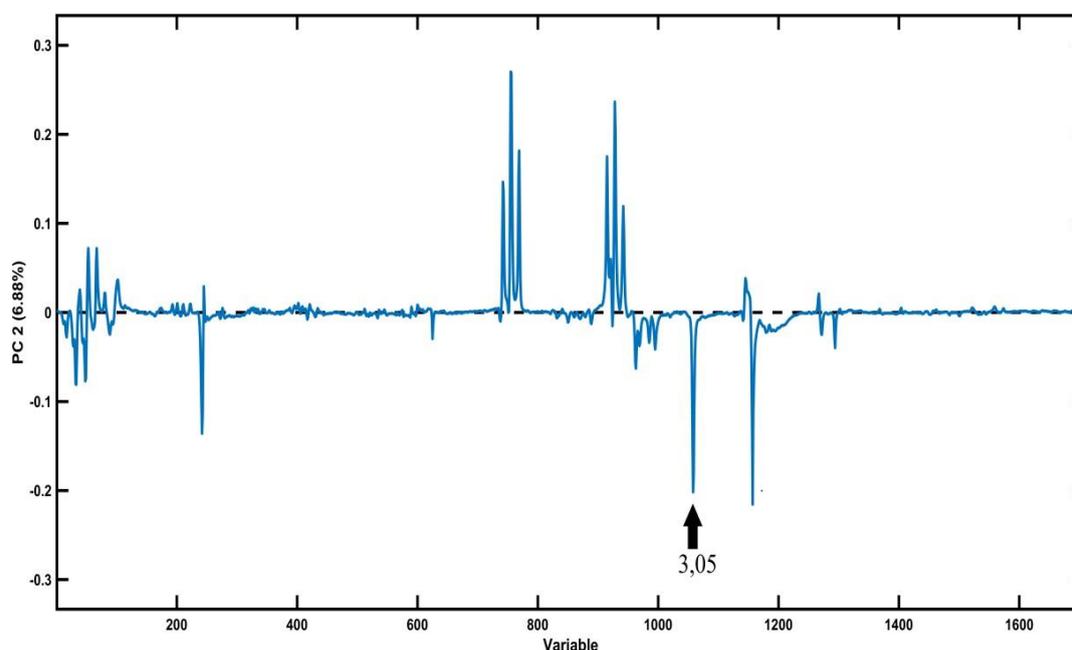


Figura 61. Gráfico de influências da análise de PC2 de espectros de RMN de ^1H das amostras de pirarucu fresco e salgado seco, considerando a região de média frequência os com os metabolitos responsáveis pela discriminação entre as amostras.

Através da análise visual dos espectros de RMN de ^1H é possível verificar a diferença espectral entre as amostras de pirarucu salgado-seco coletado na zona centro-sul das demais zonas de coleta. As amostras de pirarucu salgado-seco coletadas na zona centro-sul não possuem o sinal de hidrogênio da creatinina (δ 3,05) tão intenso como nas demais zonas de coleta, o que fez com que essas amostras se aproximassem do eixo positivo de PC1 onde se agrupam as amostras de pirarucu fresco. (Figura 62)

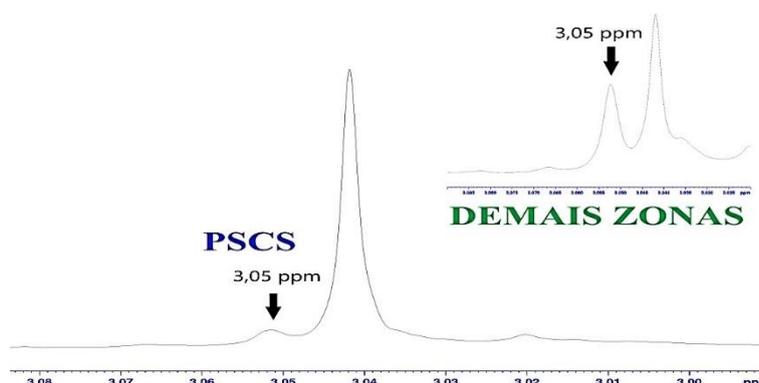


Figura 62. Comparação entre os espectros de RMN de ^1H das amostras de pirarucu salgado-seco coletados na zona centro-sul com as demais zonas de coleta, demonstrando a ausência da creatinina.

REGIÃO DE ALTA FREQUÊNCIA (δ 6,10 – 8,90)

Para verificação da influência da região de alta frequência na separação entre as amostras de pirarucu fresco e salgado seco, plotou-se o gráfico de *scores* de PC1 vs PC2. A separação entre as matrizes de pirarucu foi a mesma observada para as outras regiões espectrais. A PC1 foi responsável pela separação entre as amostras com variância acumulada de 65,26%, conforme pode ser visto na figura 63.

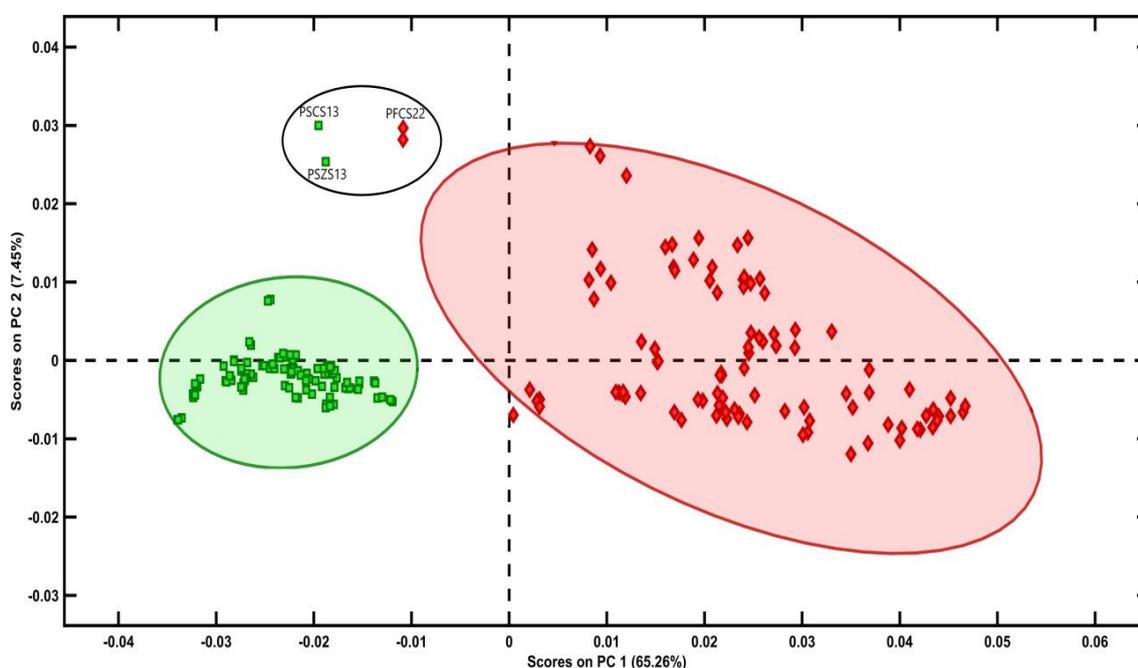


Figura 63. Gráfico de scores da análise por PCA de espectros de RMN de ^1H das amostras de pirarucu fresco e salgado seco, considerando a região de alta frequência.

O gráfico de scores de PC1 vs PC2, mostra uma dispersão das amostras de pirarucufresco em eixo positivo de PC1, e menor discrepância entre as amostras de pirarucu salgado seco em eixo negativo de PC1. No entanto, algumas amostras apresentaram comportamento anômalo às demais. As primeiras amostras de pirarucu salgado-seco coletadas nas zonas centro-sul e sul, respectivamente, agruparam-se distante das demais amostras, além disso, observa-se que as amostras de pirarucu fresco coletadas na zona centro-sul de Manaus, agruparam-se em eixo negativo de PC1, ou seja, possuem maior similaridade com as amostras de matriz salgada – seca.

O gráfico de *loadings* foi utilizado para verificar quais os metabolitos responsáveis por essa separação entre as matrizes de pirarucu fresco e salgado-seco. Conforme mostra a figura 64, os metabolitos responsáveis pelo agrupamento entre as amostras de pirarucu fresco foram, inosina (δ 6,10; 8,23; 8,33), IMP (δ 6,15; 8,55), ácido fumárico (δ 6,52) e histidina (δ 7,09).

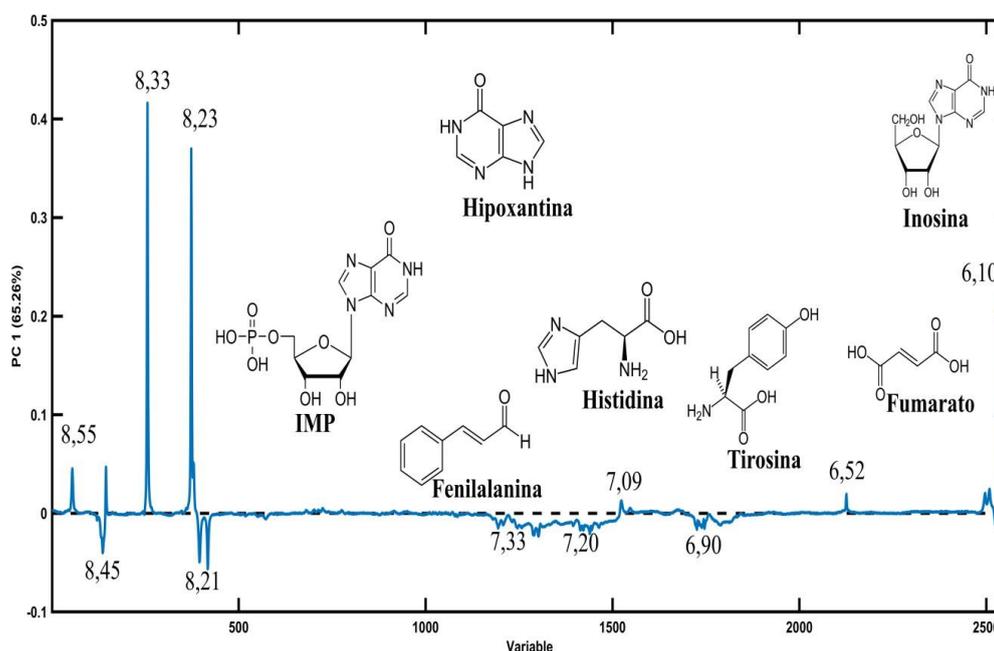


Figura 64. Gráfico de influências da análise por PCA de espectros de RMN de 1H das amostras de pirarucu fresco e salgado seco, considerando a região de alta frequência os com os metabolitos responsáveis pela discriminação entre as amostras.

Para as amostras de pirarucu salgado-seco, observadas em eixo negativo de PC1, o gráfico de *loadings* revela os metabolitos responsáveis pela

similaridade dessa matriz, são os compostos, tirosina (δ 6,90 – 7,20); fenilalanina (δ 7,33) e hipoxantina (δ 8,21).

Enquanto que as amostras, PSCS₁ e PFCS₂ que apresentaram comportamento anômalo às demais amostras de suas matrizes, não foi possível identificar na inspeção visual dos espectros de RMN de ¹H os motivos para justificar o comportamento no gráfico de scores.

5.5.3 Análise por componentes principais (PCA) das amostras produzidas

Os dados espectrais das amostras produzidas em laboratório também foram submetidas as análises quimométricas. O intuito era verificar se a PCA desse conjunto de dados levaria a uma diferenciação dos grupos amostrais e se os compostos responsáveis pela separação eram compatíveis com aqueles encontrados nas amostras comerciais. As análises de componentes principais destas amostras foram realizadas utilizando os mesmos parâmetros aplicados as amostras comerciais.

Conforme já citado, antes de realizar o método de componentes principais, é necessário definir a quantidade de componentes principais (PCs) necessária para a melhor compreensão dos dados, uma vez que a análise da variância capturada é uma ferramenta fundamental para a avaliação da qualidade das representações gráficas do conjunto de dados (JOLLIFFEE, 2016). A Figura 65 mostra o gráfico de variância capturada em função do número de componentes principais para esse modelo.

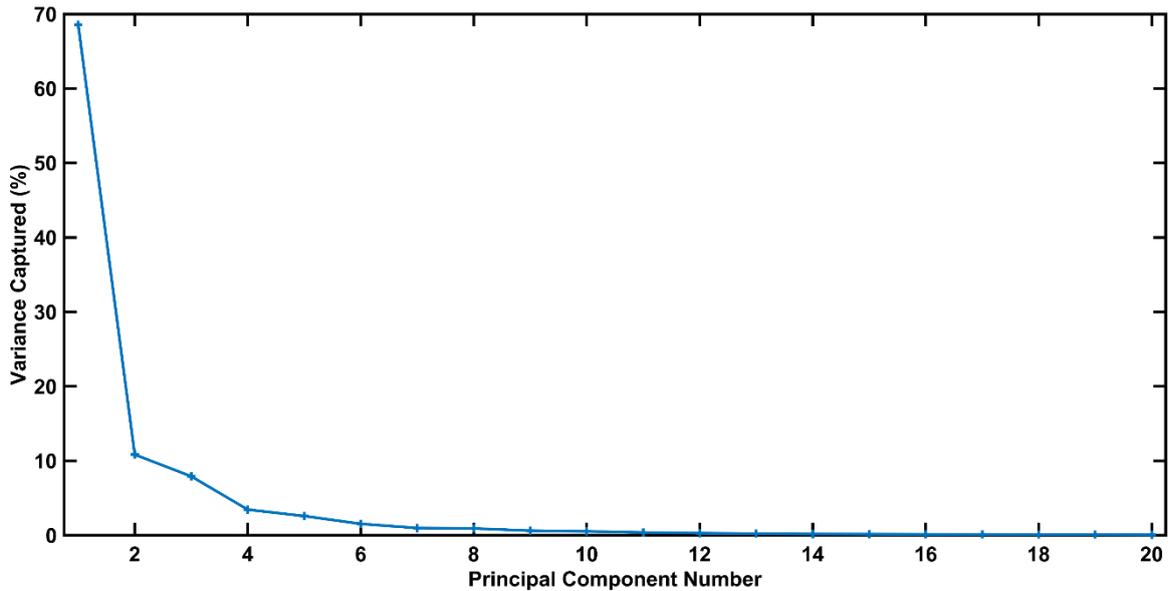


Figura 65. Gráfico de correlação entre a quantidade de PCs para o modelo e a variância capturada no experimento produzido.

De acordo com o gráfico obtido, as combinações entre PC1 vs PC2 foram suficientemente responsáveis para visualização das diferenças e similaridades entre as amostras de pirarucu fresco e salgado seco.

A Figura 66 mostra a combinação entre PC1 vs PC2 das amostras de pirarucu fresco e salgado-seco produzidos. As similaridades e diferenças entre as amostras no gráfico de scores foram as mesmas observadas no experimento com amostras comerciais. As amostras de pirarucu fresco agruparam-se no eixo positivo de PC1, enquanto as amostras de pirarucu salgado-seco agruparam-se no eixo negativo de PC1. A combinação entre as duas primeiras PCs resultou em uma variância acumulada de 79,40 % com PC1 contribuindo com 68,57% e PC2 contribuiu com 10,83% da variância total explicada .

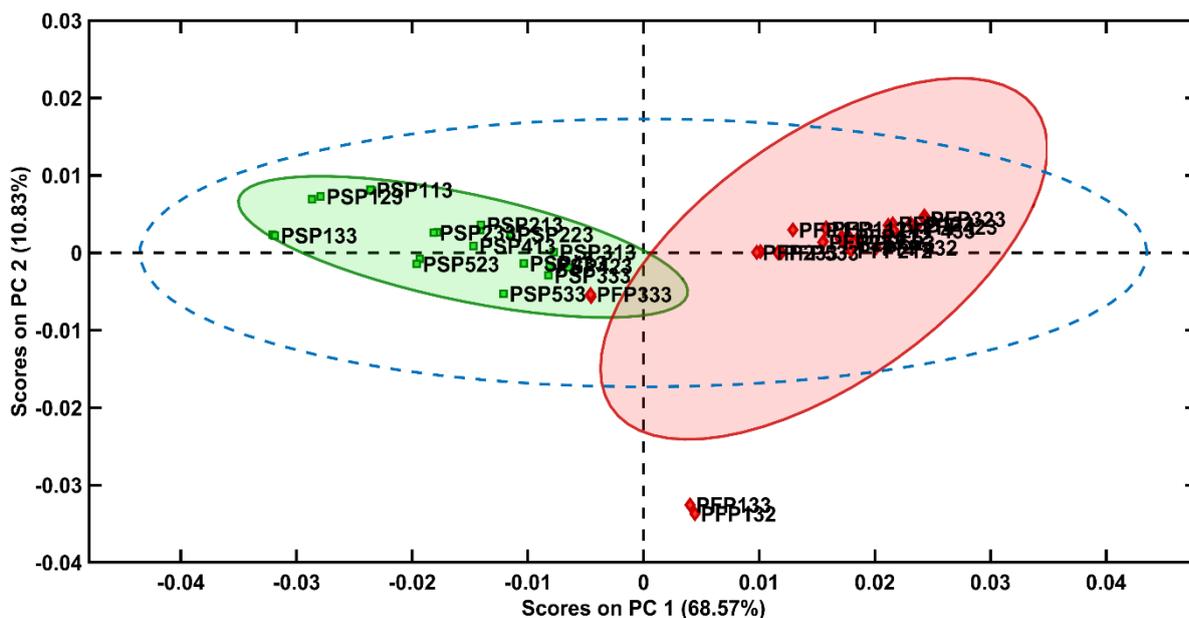


Figura 66. Gráfico de scores (PC1 vs PC2) das amostras de pirarucu fresco e salgado seco de pirarucu no experimento produzido.

O gráfico de *scores* das amostras produzidas demonstrou menor dispersão entre os grupos amostrais comparado aos resultados das amostras comerciais. As amostras de pirarucu fresco (vermelho) ficaram mais agrupadas entre as diferentes replicatas, o que indica menor variabilidade intragrupo dos compostos responsáveis por esse agrupamento. A mesma informação é possível de ser avaliada nas amostras de pirarucu salgado-seco (verde) que não se mostram dispersas entre as replicatas amostrais.

Pela análise do gráfico de *loadings* foi possível determinar os compostos responsáveis pela separação entre esses grupos amostrais. A Figura 67 mostra o gráfico de *loadings* das amostras produzidas, mostrando que os compostos lactato, creatina, taurina e inosina são responsáveis pelo agrupamento das amostras de pirarucu fresco, enquanto os compostos isoleucina, leucina, succinato, creatinina, trimetilamina e hipoxantina são os responsáveis pelo agrupamento das amostras de pirarucu salgado-seco.

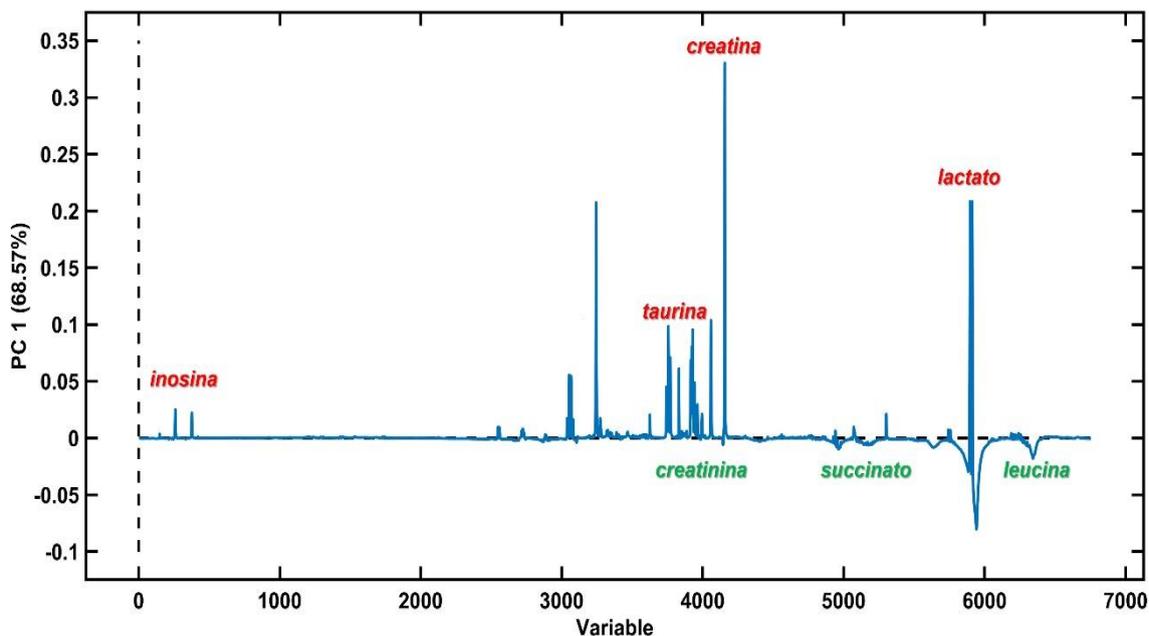


Figura 67. Gráfico de *loadings* de PC1 das amostras de pirarucu fresco e salgado seco produzido.

5.5.4 Métodos de Classificação Supervisionada das Amostras Comerciais

O método de calibração multivariada PLS-DA (*Partial Least Square – Discriminant Analysis*) é um método versátil que permite construir modelos de predição e descritivo, bem como viabiliza a seleção de variável discriminativa (LEE, 2013). Uma vez que a diferença entre amostras frescas e salgadas são visíveis – aparência, cor, textura, entre outros atributos – o uso da PLS-DA para prever o tipo de amostra seria redundante. Sendo assim, o objetivo da PLS-DA neste trabalho está relacionado com o estudo das variáveis que leve a seleção de compostos com potencial para serem utilizados como marcadores do processo de salga e/ou qualidade do produto curado.

Os compostos que foram responsáveis na discriminação dos grupos amostrais na PCA foram selecionados para as análises de PLS-DA, são eles: alanina, ácido acético, succinato, dimetilamina, creatina, colina, taurina, glicina, lactato, inosina, formato e hipoxantina. Para cada metabólito foi selecionado um sinal no espectro de RMN de hidrogênio e a intensidade do sinal foi calculada com o auxílio da ferramenta de multi integração do *software AMIX*. Ao final

obteve-se uma nova matriz de dados com os valores de integração para todos os sinais, e esta foi submetida a análise por PLS-DA.

A Figura 68 mostra o gráfico de *scores* obtido no método de PLS-DA para as amostras comerciais de pirarucu fresco e salgado seco. O gráfico de *scores* demonstra uma separação entre o conjunto de dados, onde as amostras de pirarucu fresco agruparam-se em eixo negativo da componente 1 e as amostras de pirarucu salgado-seco agruparam-se em eixos positivos da componente 1 que explica 55,1% da variância dos resultados contra 20,4% da componente 2. A primeira componente é, portanto, responsável pela separação dos grupos. O gráfico de *scores* também mostrou a sobreposição de algumas amostras, o que pode indicar que tais amostras, embora sejam de matrizes diferentes, possuem características químicas similares e não podem ser claramente discriminadas, ou ainda, que as variáveis utilizadas não possuem peso suficiente para separar as amostras sobrepostas.

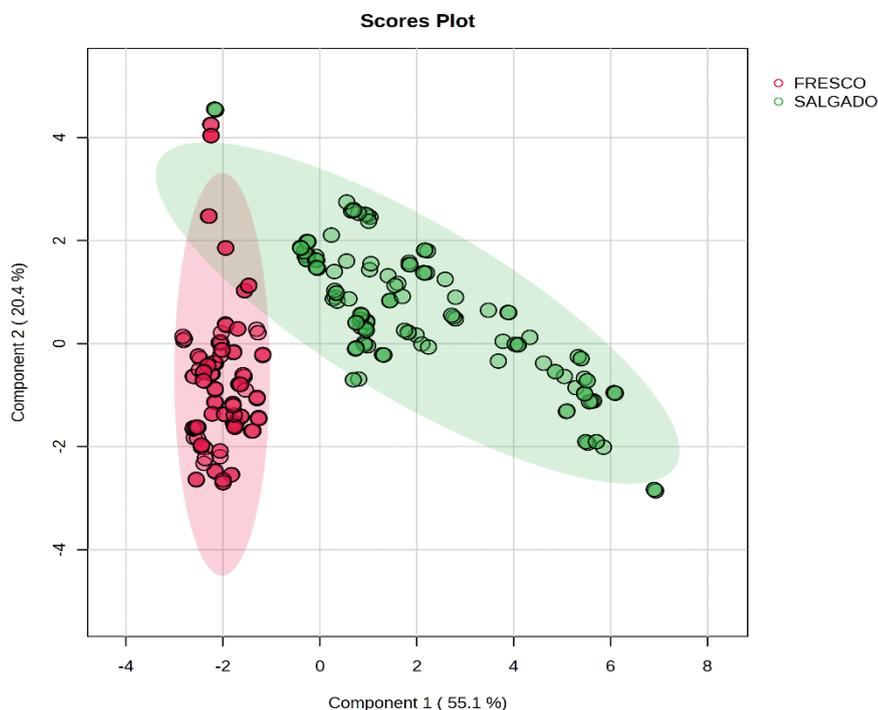


Figura 68. Gráfico de *scores* do método de PLS-DA das amostras de pirarucu frescas e salgadas-secas comerciais.

Através da análise do gráfico de *loadings* (Figura 69) verificou-se que os metabólitos, inosina e creatina, são as variáveis responsáveis pelo agrupamento das amostras de pirarucu fresco enquanto os metabólitos, lactato, glicina, colina, dimetilamina, formato, alanina, hipoxantina, succinato e aceto foram os responsáveis pelo agrupamento das amostras de pirarucu salgado-seco.

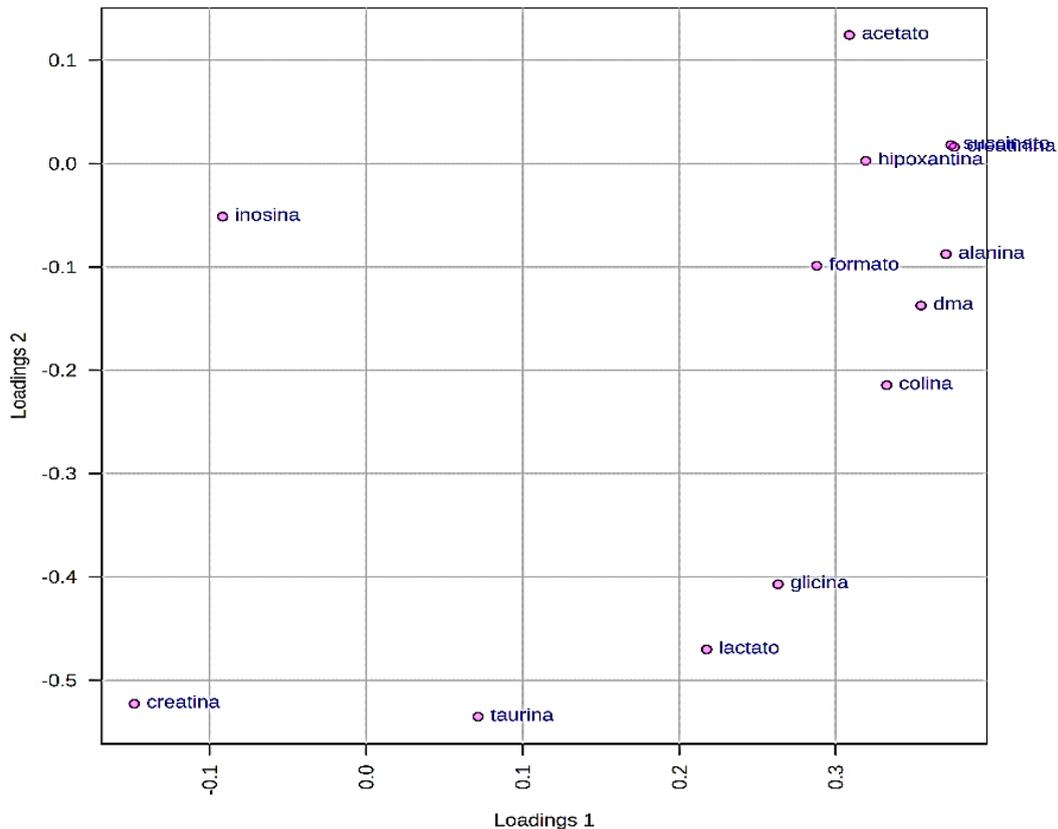


Figura 69. Gráfico de loadings do método de PLS-DA das amostras frescas e salgadas secas comerciais com os metabólitos discriminantes.

Um dos desafios da aplicação da PLS-DA é estimar a qualidade do modelo obtido e, portanto, as reais diferenças entre as classes. O *MetaboAnalyst* disponibiliza, através do método de validação cruzada, o diagnóstico estatístico através dos valores de acurácia, Q^2 e R^2 (XIA, 2009). Tais valores são mostrados na tabela 7 para um modelo com três componentes. A estatística Q^2 indica a capacidade preditiva do modelo e é calculada a partir da avaliação do erro entre a variável prevista e a variável conhecida. O erro de predição é somada em todas

as amostras (*PRESS*) e está relacionada a soma total dos quadrados (*TSS*). Assim a estatística Q^2 é calculada pela seguinte relação:

$$Q^2 = 1 - \frac{PRESS}{TSS}$$

Valores de Q^2 positivos e maior que 0,3 são aceitos na literatura. Para o modelo com as três primeiras componentes o valor de Q^2 é de 0,79, mostrando uma expressiva capacidade preditiva.

Tabela 7. Valores de acuracia, R^2 e Q^2 obtidos na validação cruzada do modelo PLS-DA em relação a quantidade de PCs utilizadas.

Medida	1º componente	2º componente	3º componente
Accuray	0,91026	0,97215	0,97215
R^2	0,61933	0,75905	0,79744
Q^2	0,61405	0,75162	0,78826

A estatística R^2 , por sua vez, indica a capacidade do modelo de explicar os dados e prevê novas observações, sendo calculada através da comparação entre a variação total com a variação explicada. Para isso, faz-se necessário determinar a soma de quadrado total (*SST*) que representa a variação total dos dados, e por fim determinar a soma dos quadrados da regressão (*SSR*) que representa a variação explicada do modelo. A estatística R^2 pode ser determinada pela seguinte relação:

$$R^2 = \frac{SSR}{SST}$$

Os valores da estatística R^2 para o modelo com 3 componentes foi 0,79. No entanto, o mais importante é observar que os valores de R^2 estão na mesma magnitude dos valores de Q^2 para todos os modelos calculados, mostrando que nenhum deles está superajustado (*overfitting*). Por fim, o diagnóstico da acurácia que se mostrou maior que 90% nos modelos calculados.

A acurácia é calculada a partir da análise da proporção de amostras classificadas corretamente em relação ao número total de amostras. Em outras

palavras, a acurácia mede a porcentagem de amostras classificadas em suas respectivas classes. Dessa forma, podemos concluir que o modelo proposto possui significativa capacidade de predição e explicação dos dados (Figura 70).

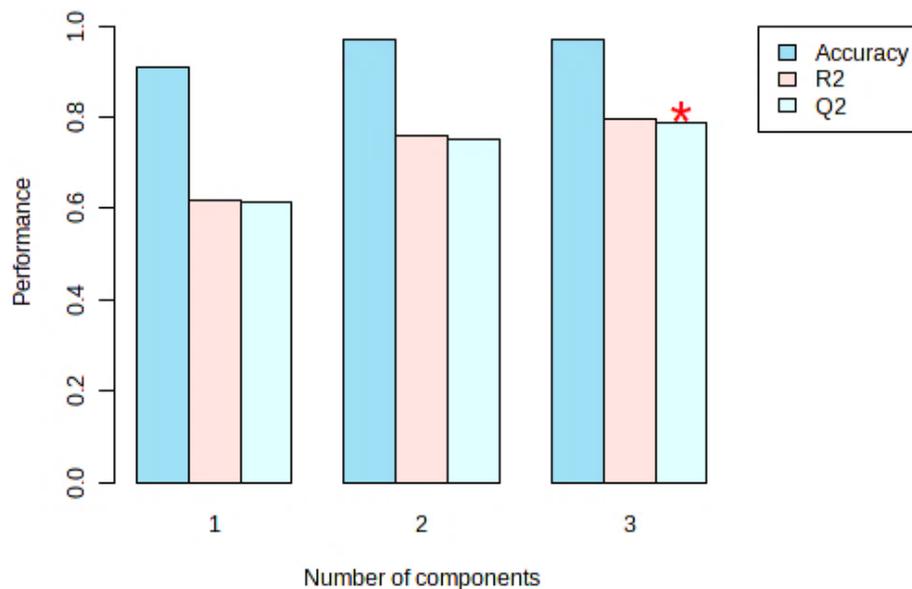


Figura 70. Gráfico da performance do modelo PLS-DA comparando os valores de acurácia, R2 e Q2 em relação ao número de componentes para o experimento comercial.

Embora as estatísticas apresentadas correspondem a um diagnóstico satisfatório do modelo, tais valores podem terem sido obtidos ao acaso, devido a natureza do conjunto amostral. Ou seja, não se sabe quais desses valores do diagnóstico estatístico corresponde realmente a uma boa discriminação dos grupos (SZYMAN´SKA, 2012). Para resolver essa questão, foi realizado o teste de permutação que assume que não há diferença entre dois grupos que são formados randomicamente. Ou seja, a classificação das amostras é permutada randomicamente e um novo modelo de classificação é calculado. Nos nossos experimentos, a estatística escolhida para monitorar a qualidade do modelo no teste de permutação foi Q^2 (BARBERINI, 2016).

De acordo com Westerhuis (2008), os valores de permutação indicam uma medida de probabilidade, de quão improvável é obter a estatística de teste observada nos resultados sob uma hipótese nula. Pelo valor de p obtido ($p < 0,05$) para esse modelo (Figura 71), entende-se que a estatística de teste é improvável

de ser obtida por um acaso, o que se sugere evidências estatísticas a favor da hipótese alternativa, ou seja, os dados obtidos são significativos.

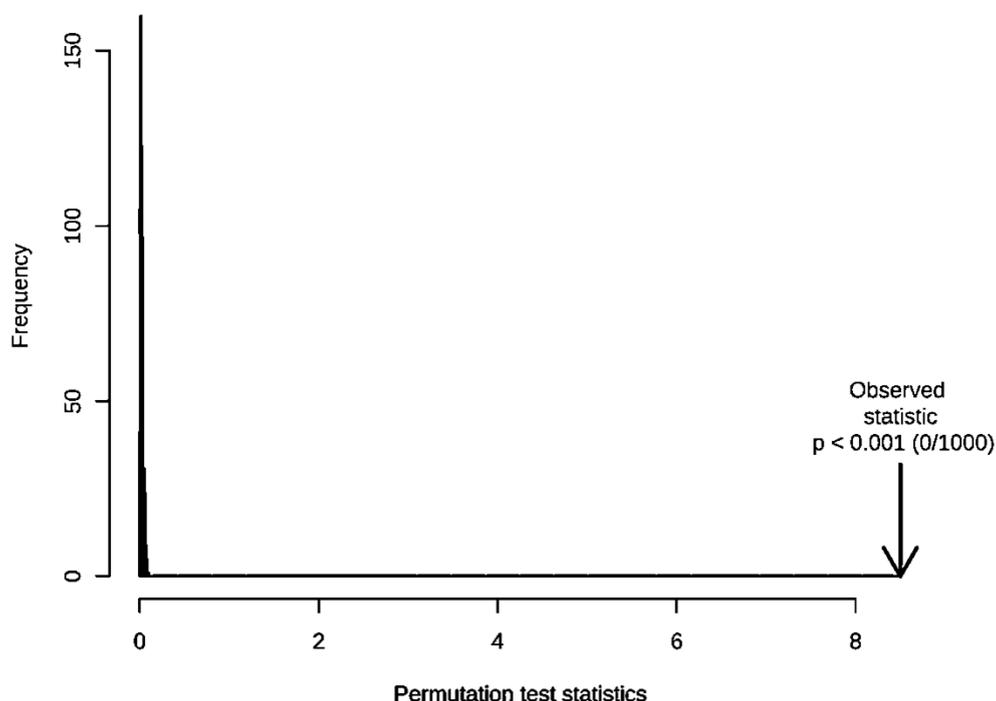


Figura 71. Teste de permutação do modelo de PLS-DA em relação a frequência para o experimento comercial.

Com o método devidamente validado, pode-se utilizar o VIP score (*variance importance for projection score*) como parâmetro para selecionar as variáveis com maiores chances de serem utilizadas como marcadores químicos do processo. O VIP score mede o poder explicativo das variáveis de preditoras com relação a variável resposta. Em outras palavras, VIP score pode ser usado para calcular o grau de contribuição de cada informação utilizada na construção do modelo para avaliar a importância de uma única variável independente para explicar a variável dependente (ZHENG, 2023). Valores de VIP score maior que um é geralmente utilizado para selecionar variáveis (AKARACHANTACHOTE, 2014).

A Figura 72 abaixo, mostra o gráfico de VIP Scores dos metabólitos descritos no modelo PLS-DA. Baseando-se em valores acima de 1, os metabólitos succinato, creatinina, acetato, alanina, dimetilamina e hipoxantina - que foram relacionadas as amostras de pirarucu salgado-seco no gráfico de *loadings* da PLS-DA - e a creatinina – que foi responsável pela discriminação das

amostras frescas, podem ser selecionadas como possíveis marcadores químicos.

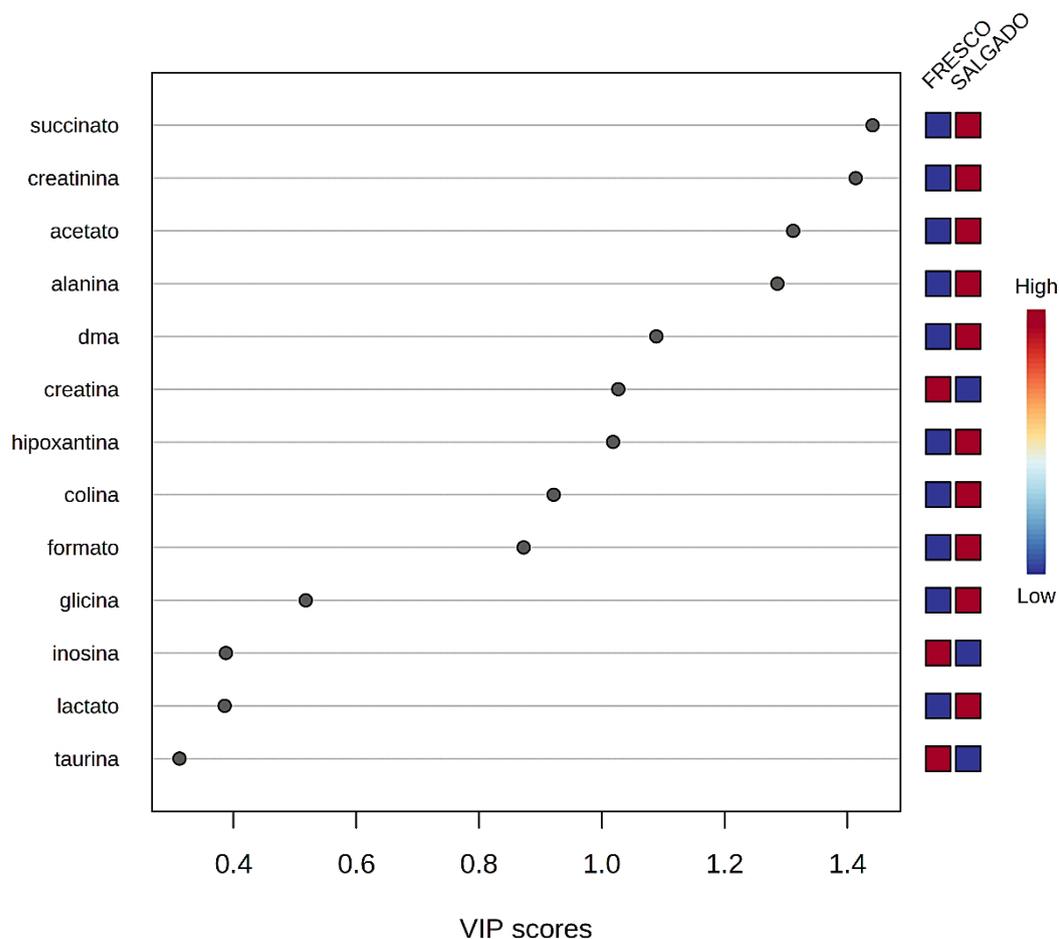


Figura 72. Gráfico de VipScores para os metabólitos visualizados no modelo PLS-DA das amostras comerciais.

5.5.5 Métodos de Classificação Supervisionada das Amostras Produzidas

Os metabólitos discriminantes visualizados no gráfico de *loadings* da PCA, foram selecionados para avaliação no método de PLS-DA. O método para seleção da intensidade foi o mesmo utilizado nas amostras de pirarucu comerciais, gerando uma matriz com os valores de integração de todos os sinais dos metabólitos selecionados. Ao total foram selecionados 10 metabólitos verificados no experimento com amostras de pirarucu produzido, a saber, lactato; acetato; succinato; trimetilamina; creatina; fosfocolina; taurina; glicina; inosina e creatinina.

A Figura 73 mostra o gráfico de *scores* das amostras de pirarucu fresco e salgado-seco para o experimento produzido. Na visualização do gráfico, pode ser verificado que as amostras das duas matrizes se separam entre o conjunto de dados, as amostras de pirarucu fresco agruparam-se em eixo negativo da componente 1 e as amostras de pirarucu salgado-seco agruparam-se em eixos positivo da componente 1 que explica 52,2% da variância dos resultados contra 25,1% da componente 2.

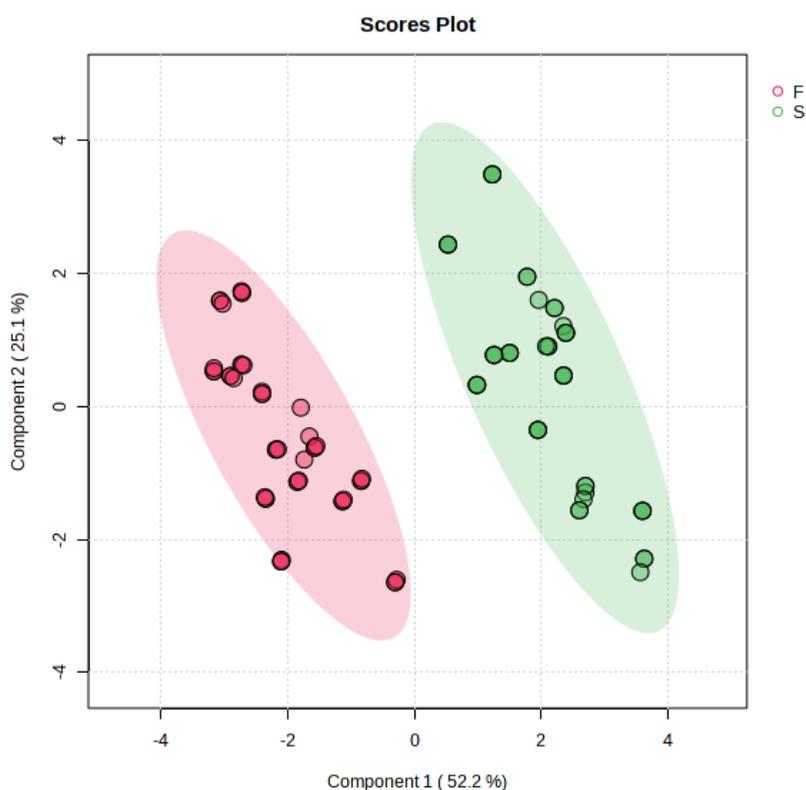


Figura 73. Gráfico de *scores* do método de PLS-DA das amostras de pirarucu frescas e salgadas-secas produzidas.

A análise do gráfico de *loadings* (Figura 74) para esse conjunto de dados demonstram que os compostos lactato, fosfocolina, glicina, creatina, taurina, acetato e inosina são os metabólitos responsáveis pelo agrupamento das amostras de pirarucu fresco no eixo negativo de PC1. No entanto, para as amostras de pirarucu salgado-seco verifica-se que os metabólitos trimetilamina, succinato e creatinina foram responsáveis pelo agrupamento em eixo positivo de PC1.

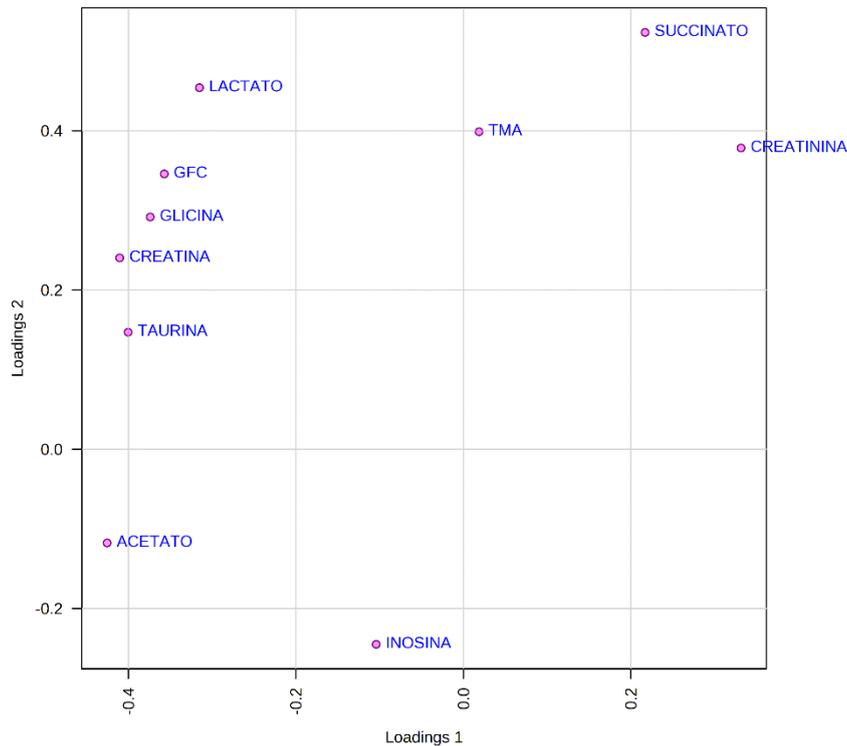


Figura 74. Gráfico de loadings do método de PLS-DA das amostras frescas e salgadas secas produzidas com os metabólitos discriminantes.

As análises dos gráficos de *scores* revelam significativa separação entre os grupos de amostras de pirarucu produzido, ou seja, sem a sobreposição de amostras ao longo das componentes. Nesse sentido, verifica-se que as variáveis utilizadas possuem peso suficiente para separar os grupos.

No processo de estimação da qualidade desse modelo obtido, utilizou-se o método de validação cruzada, observando-se os valores de Q^2 e R^2 . Os valores para o modelo do experimento produzido pode visto na Tabela 8. De acordo com os valores obtidos de Q^2 podemos compreender que esse modelo para as amostras de pirarucu produzidas possuem boa capacidade de predição ($Q^2 > 0,3$) para as 3 primeiras PCs.

Tabela 8. Valores de acuracia, R2 e Q2 obtidos na validação cruzada do modelo PLS-DA do experimento produzido em relação a quantidade de PCs utilizadas.

Medida	1º componente	2º componente	3º componente
Accuracy	1.0	1.0	1.0
R2	0.85984	0.94722	0.96802
Q2	0.85401	0.9439	0.96497

Os valores de R^2 para esse modelo, também mostraram significativa capacidade explicativa. Através desses dados, podemos verificar que o modelo em questão é capaz de explicar a variação na resposta observada, de forma significativamente precisa. Para as três primeiras PCs o valor obtido foi de 0,96. Através da figura 75 pode-se verificar a comparação entre os valores de Q^2 e R^2 para o modelo utilizado nesse experimento. Podemos verificar que os valores estão aproximados, logo, esse modelo possui capacidade de prever com precisão os resultados observados.

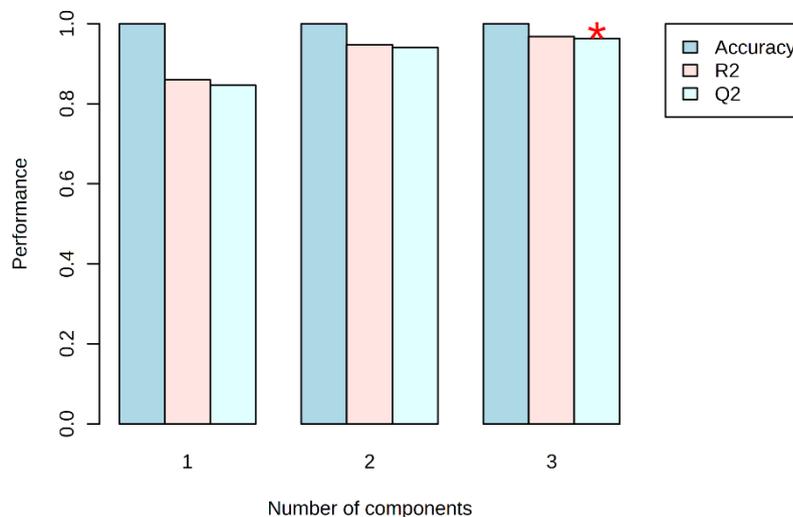


Figura 75. Gráfico da performance do modelo PLS-DA comparando os valores de acurácia, R2 e Q2 em relação ao número de componentes para o experimento produzido.

Para a verificação se os resultados obtidos pelo modelo realmente não foram ao acaso, utilizou-se o teste de permutação. Nesse teste os rótulos dos grupos são permutados de forma aleatória entre as amostras, a fim de se obter

um conjunto de amostras com rótulos de grupos aleatórios. A avaliação da significância estatística do modelo de classificação original é comparada com a distribuição dos modelos permutados. Os modelos que possuírem o valor de p menores que o nível de significância definida, são considerados estatisticamente significativos (BIJLSMA, 2006). Nesse sentido, podemos verificar que o valor de p para esse modelo ($p < 0,05$) está abaixo da significância, logo, possui capacidade de discriminar as amostras de forma significativa (Figura 76).

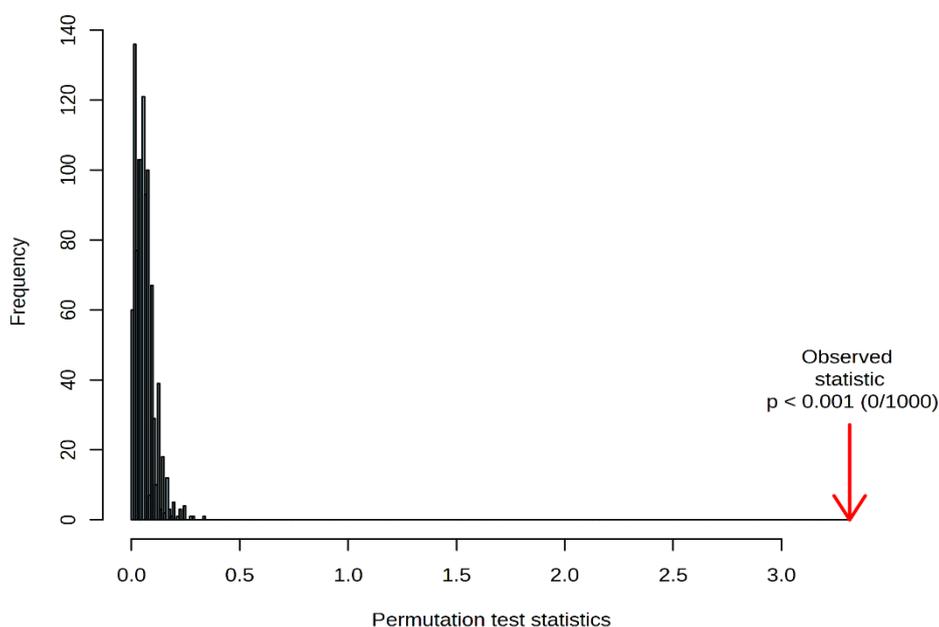


Figura 76. Teste de permutação do modelo de PLS-DA em relação a frequência para o experimento produzido.

A seleção das variáveis com maior significância e que podem ser usadas como potenciais biomarcadores foi realizada através da análise dos valores de *VIP Scores*, o método descreve uma estimativa quantitativa do poder discriminatório de cada variável individual (CHO, 2008). Das 10 variáveis usadas na composição desse modelo, apenas 6 variáveis mostraram significativa importância.

De acordo com os valores de *VIP Scores* (Figura 77) obtidos para os metabolitos utilizados nesse modelo, apenas glicina, creatina, taurina e acetato são mostrados como significativamente importantes para o agrupamento das amostras de pirarucu fresco. No entanto, para as amostras de pirarucu salgado-

seco é visualizado que apenas a creatinina pode ser considerados potenciais biomarcadores para esse grupo amostral.

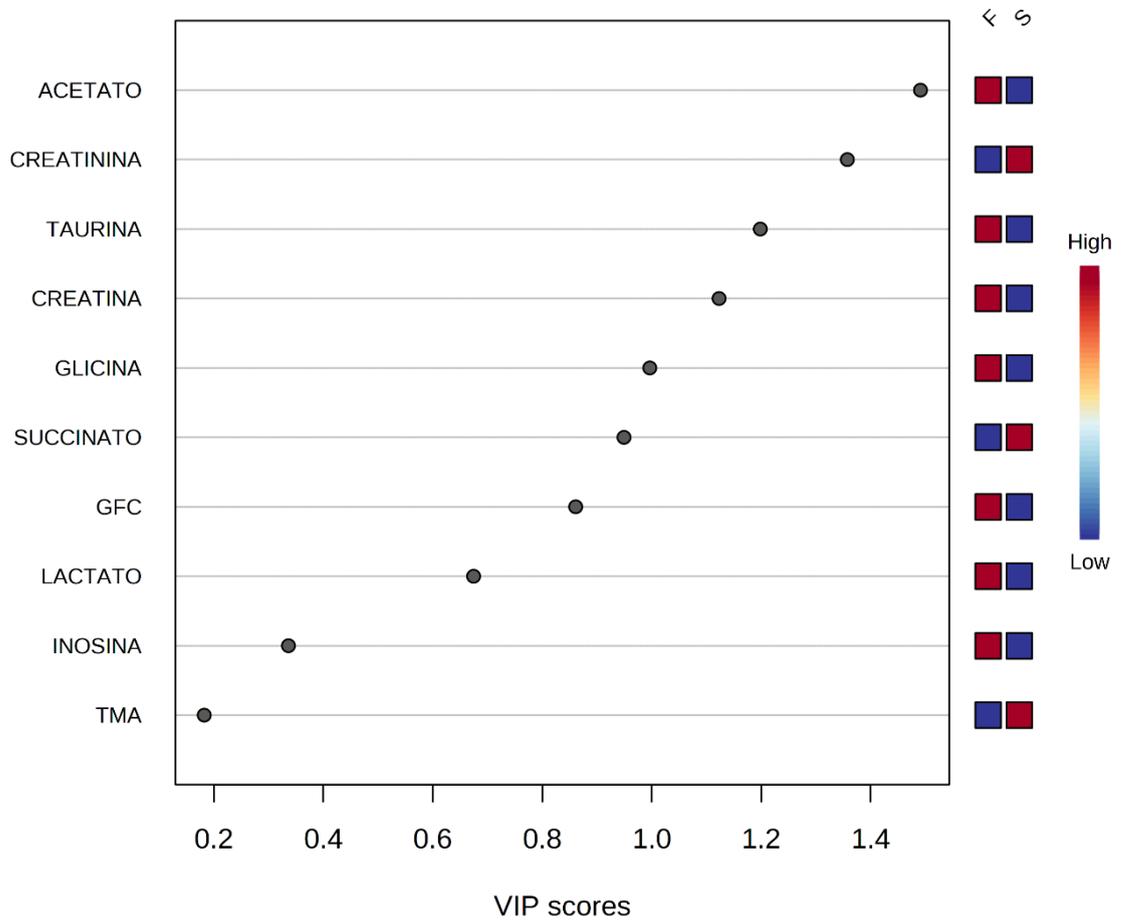


Figura 77. Gráfico de VipScores para os metabolitos visualizados no modelo PLS-DA das amostras produzidas.

5.6 Quantificação dos metabólitos discriminantes por RMNq

Os metabólitos descritos nos modelos de classificação (PLS-DA) das amostras comerciais e produzidas com valores de VIP score maior que um foram quantificados nos espectros quantitativos de RMN. O *shimming* e a calibração do pulso foi realizado de forma a tornar a aquisição especialmente quantitativa. O sinal do ácido 3-(trimetilsilil)propiónico (tm₃sp-d₄) foi utilizado como padrão interno, fornecendo uma referência de concentração identificável isolada de áreas congestionadas por sinais (CROOK, 2020).

A fim de evitar problemas como a sobreposição dos sinais dos metabólitos, utilizou-se sinais mais simples e distantes de outros sinais no espectro de RMN de ¹H, uma vez que o sinal usado para quantificação deve ser claramente separado de todos os outros sinais e deve ser atribuído de forma inequívoca a um átomo da substância a ser quantificada (HOLZGRABE, 2010).

Dessa maneira, os metabólitos foram quantificados e comparados entre suas matrizes fresca e salgada-seca para o experimento comercial e produzido. Os metabólitos quantificados foram acetato, creatina, taurina, creatinina, glicina, hipoxantina, dimetilamina, alanina e succinato e seus teores podem visualizados na Tabela 9 que mostra a concentração molar do metabólito em relação a massa de peixe pesada inicialmente no processo de extração para o experimento com amostras produzidas.

Tabela 9. Quantificação dos metabólitos mais importantes para a discriminação das amostras de pirarucu fresco e salgado-seco expressos em mMol / g⁻¹.

Amostra	acetato	creatina	glicina	taurina	succinato	creatinina	dimetilamina	alanina	hipoxantina
EXPERIMENTO PRODUZIDO									
PFP1	207.9 ± 18.2	63.7 ± 6.4	5.6 ± 0.7	68.4 ± 7.0	1.5 ± 0.3	N/D	N/D	N/D	N/D
PFP2	198.0 ± 5.5	62.8 ± 2.2	5.1 ± 0.5	62.3 ± 2.0	0.6 ± 0.2	N/D	N/D	N/D	N/D
PFP3	165.2 ± 17.4	55.1 ± 3.6	3.9 ± 0.4	62.9 ± 4.0	0.4 ± 0.3	N/D	N/D	N/D	N/D
PFP4	183.9 ± 30.3	58.1 ± 6.0	4.8 ± 0.5	59.5 ± 7.0	0.7 ± 0.1	N/D	N/D	N/D	N/D
PFP5	155.9 ± 22.7	46.3 ± 4.0	2.9 ± 0.4	65.3 ± 6.2	0.6 ± 0.3	N/D	N/D	N/D	N/D
Média	182.18	57.20	4.46	63.68	0.76				
PSP1	2.6 ± 0.46	25.6 ± 6.1	2.3 ± 0.7	23.6 ± 6.5	1.2 ± 0.1	3.0 ± 1.1	N/D	N/D	N/D
PSP2	5.4 ± 1.1	65.5 ± 10.3	5.9 ± 0.7	62.5 ± 9.1	3.2 ± 0.6	10.1 ± 2.1	N/D	N/D	N/D
PSP3	5.5 ± 0.18	69.3 ± 7.2	4.7 ± 0.3	83.0 ± 12.0	2.0 ± 0.4	8.8 ± 2.5	N/D	N/D	N/D
PSP4	7.2 ± 0.87	93.6 ± 10.4	6.7 ± 1.1	94.6 ± 8.9	3.1 ± 0.8	13.2 ± 1.5	N/D	N/D	N/D
PSP5	7.6 ± 3.9	67.6 ± 31.1	4.2 ± 1.7	85.7 ± 37.2	4.3 ± 1.8	10.0 ± 3.7	N/D	N/D	N/D
Média	5.66	64.32	4.76	69.88	2.76	9.02			
Legenda: valores são médias das replicatas + desvio padrão; ND (não encontrado)									

Para as amostras de pirarucu fresco e salgado-seco no experimento com amostras produzidas pode se observar a variação da concentração molar para alguns metabólitos para cada grupo de amostra em questão. O metabólito acetato, possui maior concentração, variando de 155 a 207 (mMol/g) nas amostras frescas de pirarucu enquanto que o metabólito succinato possuem maior concentração nas amostras de pirarucu salgado-seco, com variação de 1,2 a 4,3 (mMol/g) de carne. Os outros compostos químicos aumentaram a sua concentração nas amostras de pirarucu salgado-seco em comparação com as amostras frescas de pirarucu.

Para as amostras de pirarucu comerciais, é possível observar que ocorre mudança nas concentrações entre as matrizes de pirarucu fresco em relação as amostras de pirarucu salgado-seco. Os metabólitos creatina e taurina apresentaram altas concentrações nas amostras de pirarucu fresco, no entanto, suas concentrações aumentam consideravelmente na carne de pirarucu salgado-seco. (Tabela 10).

Tabela 10. Quantificação dos metabólitos mais importantes para a discriminação das amostras de pirarucu fresco e salgado-seco expressos em mMol / g-1 do experimento comercial.

	acetato	creatina	glicina	taurina	succinato	creatinina	dimetilamina	alanina	hipoxantina
amostra	EXPERIMENTO COMERCIAL								
PFZN1	3.6 ± 0.4	46.7 ± 1.3	4.6 ± 0.5	45.7 ± 3.4	0.5 ± 0.2	N/D	0.2 ± 0.1	8.3 ± 1.5	3.6 ± 2.8
PFZN2	1.7 ± 0.2	49.1 ± 3.0	10.0 ± 0.8	76.4 ± 4.7	0.3 ± 0.07	N/D	0.2 ± 0.03	9.0 ± 0.3	0.7 ± 0.2
PFZN3	2.7 ± 0.4	49.7 ± 1.6	9.5 ± 0.3	56.6 ± 1.4	0.3 ± 0.02	N/D	0.3 ± 0.01	7.5 ± 0.18	0.6 ± 0.09
PFZL1	1.6 ± 0.6	38.5 ± 13.2	4.3 ± 1.5	65.8 ± 22.6	0.2 ± 0.2	N/D	0.08 ± 0.04	7.9 ± 2.8	0.75 ± 0.4
PFZL2	4.9 ± 0.5	42.4 ± 2.8	6.6 ± 0.5	82.0 ± 5.3	1.2 ± 0.1	N/D	0.1 ± 0.06	18.5 ± 1.3	1.3 ± 0.2
PFZL3	2.9 ± 0.2	41.2 ± 2.7	3.5 ± 0.1	45.3 ± 3.1	0.2 ± 0.04	N/D	0.2 ± 0.03	7.5 ± 0.5	1.2 ± 0.4
PFCS1	2.1 ± 0.2	46.7 ± 3.2	6.0 ± 0.4	61.8 ± 4.0	0.1 ± 0.03	N/D	0.05 ± 0.01	7.8 ± 0.7	0.8 ± 0.5
PFCS2	3.5 ± 0.4	26.1 ± 3.1	4.3 ± 0.5	49.2 ± 7.5	0.5 ± 0.09	N/D	0.08 ± 0.03	6.9 ± 0.7	1.7 ± 0.4
PFCS3	3.38 ± 0.7	39.1 ± 1.4	6.7 ± 0.2	79.7 ± 2.1	0.6 ± 0.1	N/D	0.1 ± 0.02	10.8 ± 0.8	1.9 ± 0.9
PFZS1	1.46 ± 0.4	54.5 ± 3.3	5.7 ± 0.4	77.4 ± 4.4	0.2 ± 0.09	N/D	0.1 ± 0.05	7.4 ± 1.2	0.3 ± 0.2
PFZS2	1.59 ± 0.1	55.4 ± 2.1	5.8 ± 0.2	82.6 ± 3.4	0.3 ± 0.1	N/D	0.2 ± 0.06	7.6 ± 0.4	0.3 ± 0.2
PFZS3	2.0 ± 0.1	47.9 ± 3.1	4.6 ± 0.3	66.5 ± 3.7	0.3 ± 0.07	N/D	0.2 ± 0.04	7.8 ± 0.7	0.4 ± 0.1
Média	2.6	44.8	6.0	65.8	0.4		0.2	8.9	1.1
PSZN1	116.6 ± 21.9	76.2 ± 13.3	9.5 ± 2.3	147.9 ± 33.4	16.0 ± 4.2	30.5 ± 5.1	1.3 ± 0.7	56.3 ± 12.9	7.2 ± 1.3
PSZN2	72.5 ± 12.8	71.9 ± 12.4	26.1 ± 5.1	197.9 ± 37.9	28.2 ± 6.0	55.6 ± 10.8	4.0 ± 0.9	93.4 ± 17.2	12.0 ± 0.9
PSZN3	59.5 ± 20.5	60.7 ± 17.5	28.6 ± 8.5	209.4 ± 77.9	25.0 ± 10.2	50.3 ± 16.2	4.2 ± 1.7	92.7 ± 36.6	9.5 ± 0.6
PSZL1	76.8 ± 19.0	85.6 ± 23.8	16.3 ± 5.6	156.8 ± 48.9	18.3 ± 5.9	34.1 ± 8.3	2.0 ± 1.2	55.3 ± 16.1	4.7 ± 1.0
PSZL2	39.7 ± 4.2	35.9 ± 1.4	11.1 ± 1.5	77.6 ± 6.6	8.0 ± 0.8	24.0 ± 1.5	1.3 ± 0.3	50.7 ± 2.6	8.3 ± 1.0
PSZL3	52.7 ± 19.9	68.6 ± 26.1	24.1 ± 9.9	122.2 ± 51.0	33.4 ± 14.0	34.5 ± 13.0	3.6 ± 1.8	69.8 ± 28.0	10.1 ± 1.3
PSCS1	32.3 ± 1.7	34.5 ± 2.6	12.7 ± 1.5	73.2 ± 7.1	10.0 ± 1.0	22.0 ± 1.8	0.7 ± 0.2	40.0 ± 2.2	8.5 ± 2.6
PSCS2	12.6 ± 3.0	37.2 ± 8.5	8.1 ± 1.6	41.8 ± 9.0	6.4 ± 1.7	5.0 ± 1.0	0.6 ± 0.2	18.8 ± 5.2	3.0 ± 0.2
PSCS3	12.8 ± 2.4	41.0 ± 7.9	8.5 ± 1.5	44.5 ± 8.3	7.1 ± 1.5	6.0 ± 1.8	0.7 ± 0.2	20.7 ± 4.5	2.7 ± 0.1
PSZS1	30.2 ± 10.0	75.4 ± 22.3	14.9 ± 4.8	131.4 ± 45.3	14.0 ± 5.1	20.7 ± 6.7	1.0 ± 0.5	50.2 ± 18.6	4.2 ± 0.6
PSZS2	16.4 ± 1.5	38.4 ± 3.7	8.6 ± 0.6	77.8 ± 7.3	8.0 ± 0.8	12.0 ± 0.9	0.9 ± 0.1	27.1 ± 3.2	3.0 ± 0.1
PSZS3	17.7 ± 3.7	43.4 ± 9.9	9.5 ± 1.9	88.8 ± 18.1	9.5 ± 2.1	13.0 ± 3.3	1.1 ± 0.2	28.8 ± 6.2	2.9 ± 0.3
Média	45.0	55.7	14.8	114.1	15.3	25.6	1.78	50.3	6.3

Além disso, comparando as zonas de coleta em relação aos compostos que contribuem significativamente para o agrupamento das amostras frescas, tais como a creatina e taurina, observa-se que as zonas sul e leste possuem as maiores concentrações em relação as demais zonas, o que podemos afirmar que tais amostras coletadas nessa zona possui maior índice de frescor do que nas demais zonas de coleta.

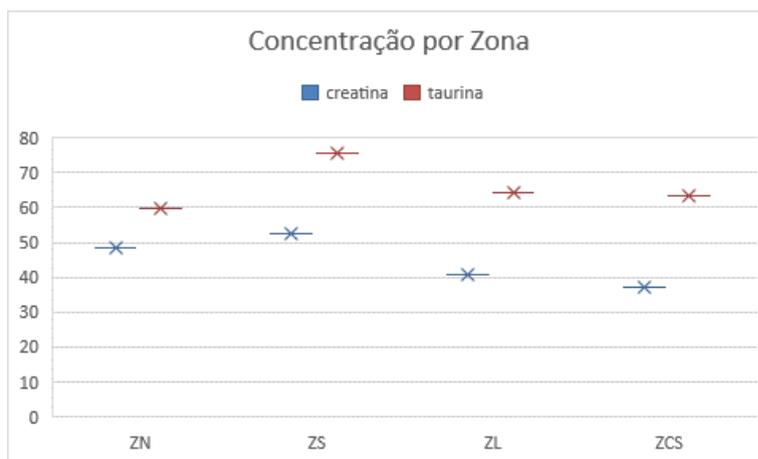


Figura 78. Análise gráfica da variação de concentração de taurina e creatina nas zonas de coleta do experimento comercial.

A mesma análise podemos fazer em relação aos metabólitos responsáveis pelo agrupamento das amostras de pirarucu salgado-seco. Através da verificação da concentração na tabela 10, verifica-se que a concentração desses metabólitos estão maiores nas zonas norte e leste quando comparada a outras zonas de coleta, logo, podemos afirmar que a qualidade das amostras de pirarucu salgado-seco nessa zona não é tão satisfatória.

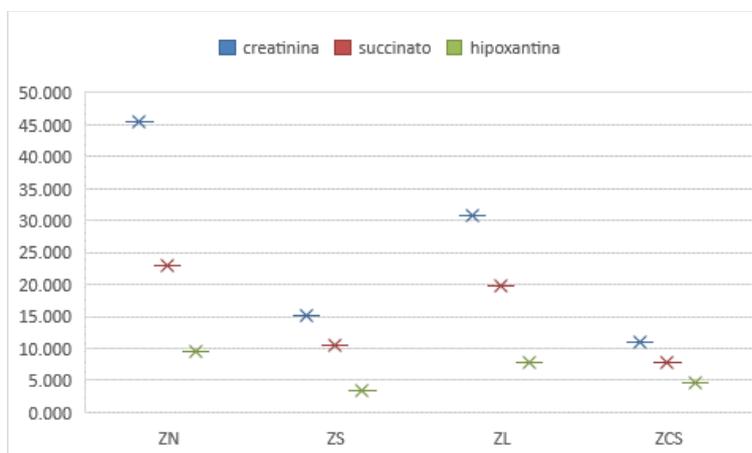


Figura 79. Análise gráfica da variação de concentração de succinato, creatinina e hipoxantina nas zonas de coleta do experimento comercial.

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho, a RMN de alta resolução em conjunto com métodos de análises quimiométricas mostrou-se uma importante ferramenta na diferenciação metabólica dos perfis da carne fresca e salgada-seca de pirarucu (*Arapaima gigas*) sob condições produzidas e comerciais. A reprodutibilidade do método de aquisição dos dados mostrou que o planejamento experimental aplicado nessa metodologia pode ser considerado eficiente na determinação das diferenças metabólicas entre os diferentes perfis de pirarucu.

A análise direta dos espectros de RMN de ^1H revelou a presença discreta de aminoácidos, ácidos orgânicos, amins biogênicas e nucleotídeos nos perfis de pirarucu. Através do auxílio de experimentos de correlação homo e heteronuclear e dados da literatura científica foram caracterizados um total de 29 metabólitos. O perfil metabólico das amostras frescas e secas possuem bastante similaridade, no entanto, algumas substâncias são características de determinadas matrizes, como a creatinina, encontrada apenas nas amostras salgadas secas e a inosina monofosfato (IMP) encontrada somente nas amostras de carne fresca de pirarucu.

A análise por componentes principais (PCA) foi aplicada para a exploração das variáveis. O método de análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) foi utilizado para a seleção das variáveis mais importantes na diferenciação entre os perfis fresco e salgado-seco. Em ambos os experimentos com amostras produzidas e comerciais obteve-se diferenciação entre os perfis de pirarucu. Os compostos responsáveis pela classificação das amostras de pirarucu fresco nos dois experimentos foram taurina, creatina, inosina e glicina enquanto que os compostos responsáveis pela classificação das amostras salgadas-secas foram, succinato, creatinina e hipoxantina. Os metabólitos obtidos nessa análise podem ser promissores no desenvolvimento de métodos de controle de qualidade para as matrizes de pirarucu fresca e salgada-seca.

A quantificação dos metabólitos com potencialidade de serem biomarcadores dos processos de salga e secagem, revelou que os compostos possuem maiores concentrações nas amostras de pirarucu salgado-seco. No

entanto, alguns metabólitos como acetato e succinato variam suas concentrações em função da matriz de pirarucu fresco e salgado-seco, respectivamente. Nas amostras comerciais, a quantificação mostrou que as amostras frescas das zonas sul e leste apresentaram maiores teores de metabólitos relacionados ao índice de frescor da carne do pescado, enquanto que nas amostras salgadas secas, as zonas norte e leste apresentaram as maiores concentrações de metabólitos característicos dos processos de degradação metabólica.

Para os próximos estudos, baseando-se nos resultados obtidos, faz-se necessário a validação entre a relação dos biomarcadores em potencial com a qualidade dos produtos. Dessa forma pode-se utilizar os biomarcadores em potencial para otimizar o processo de salga que ainda é realizado de forma artesanal pelos produtores de pescado salgado-seco. Além disso, a compressão dos metabólitos descritos podem levar ao desenvolvimento de biosensores a base desses metabólitos para o controle de qualidade dos produtos de pirarucu *in loco*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKARACHANTACHOTE, N. Cutoff threshold of variable importance in projection for variable selection.” International journal of pure and applied mathematics, v. 94, p.307-322, 2014.

ALVES, G.; ZABINE, L.; BANTLE, J.F.; RODRIGUES, L.C.S.; PASQUALI, R.; NASCIMENTO, I.A. Avaliação físico-química, microbiológica e sensorial de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) inteiras evisceradas submetidas a salga e secagem natural. Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR, Umuarama, v. 13, n. 2, p. 71-75, 2010.

ARAÚJO, Genésio Alves de. Redução do óxido de trimetilamina por bactérias. 1975. 17 f. TCC (Graduação em Engenharia de Pesca) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1975.

B.K.K.K. JINADASA, B.K.K.K., ELLIOTT, C., JAYASINGHE, G.D.T.M. A review of the presence of formaldehyde in fish and seafood. Food Control, v. 136, 2022.

BARBERINI L, NOTO A, SABA L, PALMAS F, FANOS V, DESSÌ A, ZAVATTONI M, FATTUONI C, MUSSAP M. Multivariate data validation for investigating primary HCMV infection in pregnancy. Data Brief. V. 31, n. 9, p.220-230, 2016.

BARISON, A. application of HR-MAS NMR and chemometric analysis for detection and evaluation of genetically modified soybean (*glycine max*) crops. Tese (Doutorado em Ciências Exatas e da Terra) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, Brasil, 2005.

BARUFFALDI, R.; OLIVEIRA, M. N. Fundamentos da tecnologia de alimentos. São Paulo: Atheneu, 1998. v. 3, 317 p. Ilustrado de Piscicultura para iniciantes. Região Norte. 2016.

BEZERRA, R.F. et al. Seasonality influence on biochemical and hematological indicators of stress and growth of pirarucu (*Arapaima gigas*), an Amazonian airbreathing fish. The Scientific World Journal, v. 4, p. 6, 2014.

BHARTI, S., ROY, R. Quantitative ¹H NMR spectroscopy. TrAC - Trends in Analytical Chemistry, v. 35, 2012.

BIJLSMA, S., BOBELDIJK I., VERHEIJ, E.R., RAMAKER, R., KOCHHAR, S., MACDONALD, I.A., VAN OMMEN, B., SMILDE, A.K. Large-scale human metabolomics studies: a strategy for data pre-processing and validation. *Anal Chem.* v.15, n. 2, p.567-74, 2006.

BLUMICH, B.; PERLO, J.; CASANOVA, F. Mobile Single – Sided NMR. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 52, 197-269, 2008.

BODIN, N; AMIEL, A.; SARDENNE, E. F; CHASSOT, E. DEBRAUWER, L; GUILLOU, H; FRANCO, M. T. CANLET, C. NMR-based metabolic profiling and discrimination of wild tropical tunas by species, size category, geographic origin, and on- board storage condition, *Food Chemistry*, Vol. 371, 2022.

BRAMSTEDT, F. Amino acid composition of fresh fish and influence of storage and processing. In *Fish in Nutrition*; Heen, E., Kreuzer, R., Eds.; Fishing News (Books) Ltd.: London, UK, 1962; pg. 61–67.

BRASIL, IBAMA – Instituto Brasileiro de Amparo ao Meio Ambiente. Portaria nº. 39 de 02 de dezembro de 1987. Brasília, 1987.

BRASIL, IBAMA – Instituto Brasileiro de Amparo ao Meio Ambiente. Instrução Normativa nº. 01 de 01 de junho de 2005. Brasília, 2005.

BRASIL. Aprova o Regulamento Técnico Da Identidade e Qualidade Do peixe salgado e peixe salgado-seco. *Diário Oficial da União (DOU)*. 13th ed. Brasília, Brasil. 2019.

BRERETON, RG, Jansen, J., Lopes, J. et al. Quimiometria em química analítica - parte I: história, projeto experimental e ferramentas de análise de dados. *Anal Bioanal Chem* 409 , 5891-5899, 2017.

BUSTAMAM, M. S. A., PANTAMI, H. A., AZAM, A. A., SHAARI, K., MIN, C. C., ISMAIL, I. C. The Immunostimulant Effects of Isochrysis galbana Supplemented Diet on the Spleen of Red Hybrid Tilapia (*Oreochromis spp.*) Evaluated by Nuclear Magnetic Resonance Metabolomics. *Aquaculture Nutrition*, v. 2022, 2022.

CARNEIRO, C. DA S., MÁRSICO, E. T., RIBEIRO, R. de O. R., CONTE-JÚNIOR, C. A., MANO, S. B., AUGUSTO, C. J. C., OLIVEIRA DE JESUS, E. F. Low-Field Nuclear Magnetic Resonance (LF NMR 1H) to assess the mobility of water during storage of salted fish (*Sardinella brasiliensis*). *Journal of Food Engineering*, Vol. 169, Pg. 321–325, 2016.

CARVALHO, G.G.A. Salga e dessalga de peixes: Aspectos químicos, físicos e efeito antioxidante do extrato aquoso de manjeriço (*Ocimum basilicum*). Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista – UNESP, Brasil, 2013.

CASTEJÓN, D.; VILLA, P.; CALVO, M. M.; SANTA-MARÍA, G.; HERRAIZ, M.; HERRERA, A. ¹H-NMR study of smoked Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Magn. Reson. Chem. Sep*; vol. 48(9):693-703, 2010.

CASTELLO, L.; STEWART, D. J.; ARANTES, C. C. Modeling population dynamics and conservation of arapaima in the Amazon. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, v. 21, p. 623-640, 2011.

CATELAN, C. A. ; PEDRO, M. Estudos de Métodos de Conservação de Pescados por Adição de Sal: Uma breve Revisão. *Revista UNILAGO* , v. 1, p. 1-10, 2018.

CELESTINO, S.M.C. Princípios de secagem de alimentos. Documentos 276. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA, 2010.

CHAN, K. M., DECKER, E. A; FEUSTMAN, D. C. Endogenous skeletal muscle antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 34, p. 403–426, 1994.

CHAVES, Mariana Valentim. Pescado salgado seco: o bacalhau (uma revisão). Monografia (Bacharelado em Medicina Veterinária) Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

CHO, H.W, KIM, S.B, JEONG, M.K, PARK, Y., MILLER, N.G, ZIEGLER, T.R, JONES, D.P. Discovery of metabolite features for the modelling and analysis of high-resolution NMR spectra. *Int J Data Min Bioinform*, v. 2, n. 2, p.176-92, 2008.

CHUN, HN., CHO, JH. & SHIN, HS. Influence of different storage conditions on production of trimethylamine and microbial spoilage characteristics of mackerel products. *Food Sci Biotechnol* ,v. 23, p. 1411–1416, 2014.

CIAMPA, A., PICONE, G., LAGHI, L., NIKZAD, H., & CAPOZZI, F. Changes in the amino acid composition of Bogue (*Boops boops*) fish during storage at different temperatures by ¹H-NMR spectroscopy. *Nutrients*, v. 4(6), p. 542–553. 2012.

CIPRIANO, F. S. Digestibility of animal and vegetable protein ingredients by pirarucu juveniles (*Arapaima gigas*). *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 45, p. 581- 586, 2016.

CONNELL, J.J. and HOWGATE, P.F. The amino-acid composition of some British food fishes. *J. Sci. Food Agric.*, v.10: p. 241-244, 1959.

CONSTANTINO, G. M.; SILVA, G. V. J. *A transformada de Fourier em Basic*, Departamento de Química, FFCLRP, USP, Ribeirão Preto, Brasil, 1999.

CORRÊA, A. C. L. Estudo do processo de salga e secagem de camarão cultivado no estado do Pará. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Belém, 2011.

CROOK, A. A; PODERES, R. Quantitative NMR-Based Biomedical Metabolomics: Status atual e aplicações. *Moléculas*, v. 25, n. 5128, 2020.

DAINTY, R. H. Chemical/biochemical detection of spoilage, *International Journal of Food Microbiology*, V. 33, n. 1, 1996.

DALBOSCO, E. SILVA, C. G., MELHORANÇA, E. A., MIRANDA, A., SILVA, C. Otimização do protocolo para extração de dna genômico de *epidendrum viviparum lindl.* (orchidaceae). *Enciclopedia Biosfera*, v.11, n. 21, 2015.

DEBEVERE, J., DEVLIEGHIERE, F., VAN SPRUNDEL, P., & DE MEULENAER, B. Influence of acetate and CO₂ on the TMAO-reduction reaction by *Shewanella baltica*. *International Journal of Food Microbiology*, v. 68, p. 115–123, 2001.

DUYNHOVEN, J.V., VELZEN, E. V., JACOBS, D, M. Quantification of Complex Mixtures by NMR. *Annual Reports on NMR Spectroscopy*, v. 80, p. 181-236, 2013.

DUYNHOVEN, J.V; VODA, A.; WITEK, M. V. Time Domain NMR Applied to Food Products. *Annual Reports on NMR Spectroscopy*, v. 69, p.145-197, 2010.

EBRAHIMI, P., VIERECK, N., BRO, R., & ENGELSEN, S. B. Chemometric Analysis of NMR Spectra. In *Modern Magnetic Resonance* (pp. 1–20). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-28275-6>, p. 1-20, 2017.

ERIKSON, U., BEYER, A. R., SIGHOLT, T. Muscle high-energy phosphates and stress affect K-values during ice storage of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal of Food Science*, v. 62, n. 1, p. 43–47, 1997.

ERIKSON, U.; STANDAL, I. B.; AURSAND, I. G.; VELIYULIN, E.; AURSAND, M. Use of NMR in fish processing optimization: a review of recent progress. *Magnetic Resonance in Chemistry*, v. 50, p. 471-480, 2012.

FAO - Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura e Organização Mundial da Saúde. *The State of World Fisheries and Aquaculture: Opportunities and Challenges*, 243 p. 2014.

FAO. Food and Agriculture Organization. *The Prevention of Losses in Cured Fish*. FAO Fishers Technical Paper, v. 219, 1981.

FERREIRA, M. M. C. *Quimiometria – Conceitos, métodos e aplicações*. Campinas, SP: Editora da Unicamp, p.107-238, 2015.

FOGAÇA, F.H.S. *Caracterização do surimi de tilápia do Nilo: morfologia e propriedades físicas, químicas e sensoriais*. Tese. (Programa de Pós Graduação em Aquicultura). Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, Brasil, 2009.

FRANCO, B. D. G. M. *Importância dos microorganismos nos alimentos*. In: FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. *Microbiologia dos alimentos*. São Paulo: Editora Atheneu, 1996.

FREIRE, C. E. C.; GONÇALVES, A. *Diferentes métodos de abate do pescado produzido em aquicultura, qualidade da carne e bem estar do animal*. *Holos*, v. 6, p. 33-41, 2013.

FREITAS-JUNIOR, A.V.C.; COSTA, H.M.S.; ICIMOTO, M.Y.; HIRATA, I.Y.; MARCONDES, M.; CARVALHO JR., L.B., OLIVEIRA, V.; BEZERRA, R.S. *Giant Amazonian fish pirarucu (Arapaima gigas): its viscera as a source of thermostable trypsin*. *Food Chemistry*. Recife, v.133, p.1596-1602, 2012.

FUKE, S; KONOSU, S. *Taste-active components in some foods: A review of Japanese research*. *Physiology and Behavior*, v. 49, p. 863–868, 1991.

GHIDINI S, VARRÀ MO, ZANARDI E. *Approaching Authenticity Issues in Fish and Seafood Products by Qualitative Spectroscopy and Chemometrics*. *Molecules*. v.10, n. 24, 2019.

GIESE, E., ROHN, S; FRITSCHKE, J. *Chemometric tools for the authentication of cod liver oil based on nuclear magnetic resonance and infrared spectroscopy data*. *Anal Bioanal Chem*. v. 411, p. 6931–6942, 2019.

GILL, T. A.; PAULSON, A. T. Localization, characterization, and partial purification of TMAO-ase. *Comp. Biochem Physiol.* 71B, 49-56, 1982.

GOMIDE, C.A. Estudos da qualidade física, química e microbiológica de filés de piracanjuba (*Brycon orbignyanus* Valenciennes, 1849) submetidos à salga seca e úmida. Tese de Livre-Docente. Universidade de São Paulo, Brasil, 2005.

GONELI, A. L. D.; CORRÊA, P. C.; RESENDE, O.; REIS NETO, S. A. dos. Estudo da difusão de umidade em grãos de trigo durante a secagem. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, v. 27, 2007.

GONZAGA JÚNIOR, M.A. Avaliação da qualidade de filés de pirarucu (*Arapaima gigas*, CUVIER 1829), refrigerados e embalados sob atmosfera modificada. Dissertação de Mestrado em Aquicultura. Universidade Federal do Rio Grande, Brasil, 2010.

GRIBBESTAD, INGRID & AURSAND, MARIT, MARTINEZ, ICIAR. High-resolution ¹H magnetic resonance spectroscopy of whole fish, fillets and extracts of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) for quality assessment and compositional analyses. *Aquaculture*. V.250. p. 445-457, 2005.

GUDJÓNSDÓTTIR, M.; ARASON, S., RUSTAD, T.. The effects of pre-salting methods on water distribution and protein denaturation of dry salted and rehydrated cod – A low- field NMR study. *Journal of Food Engineering*. v. 104, p. 23-29, 2011.

GUERRA, A.; GARLONETTI, A.; DZIERVA, L.; COSTA, M.F.C. Aquartilha: Guia

GUPPY, M., HULBERT, W. C., & HOCHACHKA, P. W. Metabolic sources of heat and power in tuna muscles: II. Enzyme and metabolite profiles. *Journal of Experimental Biology*, v. 82. n1, p. 303–320, 1979.

HAARD, N. F. Control of chemical composition and food quality attributes of cultured fish. *Food Research International*, v. 25, n. 4, p. 289-307, 1992.

HERNÁNDEZ-BOLIO, G.I., FAGUNDO-MOLLINEDA, A., CAAMAL-FUENTES, E.E., ROBLEDO, D., FREILE-PELEGRIN, Y. AND HERNÁNDEZ-NÚÑEZ, E. NMR Metabolic Profiling of Sargassum Species Under Different Stabilization/Extraction Processes. *J. Phycol.*, v. 57, p. 655-663, 2021.

HOLZGRABE, U. Quantitative NMR spectroscopy in pharmaceutical

applications. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, v. 57, p. 229–240, 2010.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Atlas Geográfico das Zonas Costeiras e Oceânicas do Brasil*. Rio de Janeiro - Brasil, 177 p. 2010.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. *Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos físico-químicos para análises de alimentos*. 4ª ed. (1ª Edição digital), 2008.

ITUASSÚ, D.R., PEREIRA-FILHO, M., ROUBACH, R. Níveis de proteína bruta para juvenis de pirarucu. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. v. 40, p. 255- 259, 2005.

JOLLIFFE, I. T., CADIMA, J. Principal component analysis: a review and recent developments *Phil. Trans. R. Soc. A*.v. 374, 2016.

KESKA, P; STADNIK, J. Taste-active peptides and amino acids of pork meat as components of dry-cured meat products: An in-silico study. *Journal of Sensory Studies*, v. 32, n.6, 2017.

KING, B. The practical realization of the traceability of chemical measurements standards. *Accred Qual Assur*, v. 5, p. 429–436, 2000.

LARIVE, C. K., JAYAWICKRAMA, D., ORFI, L. Quantitative Analysis of Peptides with NMR Spectroscopy. *Appl. Spectrosc.* v. 51, p. 1531-1536, 1997.

LEE, L. C. LIONG, C. Y., JEMAIN, A. A. Partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) for classification of high-dimensional (HD) data: A review of contemporary practice strategies and knowledge gaps. *Analyst*, v. 143, n. 15, 2018.

LOPES, I; OLIVEIRA, R; RAMOS, F. Perfil do consumo de peixes pela população brasileira. *Biota Amazônia (Biote Amazonie, Biota Amazonia, Amazonian Biota)*. v. 6, n. 2, p. 62-65, 2016.

LOU, X., YE, Y., WANG, Y., SUN, Y., PAN, D., & CAO, J. Effect of high-pressure treatment on taste and metabolite profiles of ducks with two different vinasse- curing processes. *Food Research International*, v.105, p. 703–712, 2018.

LOU, X; ZHAI, D; YANG, H. Changes of metabolite profiles of fish models inoculated with *Shewanella baltica* during spoilage. *Food Control*, V.123,

2021.

MALZ, F., JANCKE, H. Validation of quantitative NMR. *J Pharm Biomed Anal.* v. 10, n. 5, 813-823, 2005.

MANNINA, L., SOBOLEV, A.P., CAPITANI, D., IAFFALDANO, N., ROSATO, M.P., RAGNI, P., REALE, A., SORRENTINO, E., AMICO, I. D., COPPOLA, R. NMR metabolic profiling of organic and aqueous sea bass extracts: Implications in the discrimination of wild and cultured sea bass. *Talanta*, v. 77, p. 433–444, 2008.

MARTINEZ, I., BATHEN, T., STANDAL, IB, HALVORSEN, J., AURSAND, M., GRIBBESTAD, IS, AXELSON, DE. Compostos bioativos em produtos de bacalhau (*Gadus morhua*) e adequação do perfil de metabólito de ^1H NMR para classificação dos produtos usando análises de dados multivariados. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, n. 17, p. 6889-6895, 2005.

MARTINEZ, I; BATHEN, T., STANDAL, I.B., HALVORSEN, J., AURSAND M., GRIBBESTAD, I.S., AXELSON, D. E. Bioactive compounds in cod (*Gadus morhua*) products and suitability of ^1H NMR metabolite profiling for classification of the products using multivariate data analyses. *J Agric Food Chem.* 2005.

MCLEAN, J. S., MAJORS, P. D., REARDON, C. L., BILSKIS, C. L., REED, S. B., ROMINE, M. F. Investigations of structure and metabolism within *Shewanella oneidensis* MR-1 biofilms. *Journal of Microbiological Methods*, v. 74, n.1, p. 47–56, 2008.

MEDINA-VIVANCO, M.; SOBRAL, P. J. A.; HUBINGER, M. D. Osmotic dehydration of tilapia fillets in limited volume of ternary solutions. *Chemical Engineering Journal*, v. 86, n. 1-2, p. 199-205, 2002.

MINOZZO, M. G. *Processamento e Conservação do Pescado*. Paraná: e-Tec Brasil, 2011.

NUNES, E. S. C. L, FRANCO, R, M., MÁRSICO, E.T., NOGUEIRA, E.B., NEVES, M.S., SILVA, F.E.. “Presença de bactérias indicadoras de condições higiênicosanitárias e de patógenos em pirarucu (*Arapaima gigas* Shing, 1822) salgado seco comercializado em supermercados e feiras da cidade de Belém, Pará.” *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, v. 19, n. 2, p. 98–103, 2012.

NUNES, E.S.C.L. Avaliação da qualidade físico-química e microbiológica do pirarucu (*Arapaima gigas* Schinz, 1822) salgado seco comercializado na cidade de Belém, Pará. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Fluminense, Brasil, 2011.

OLIVEIRA, P.R. Qualidade do Pirarucu (*Arapaima gigas*, Schinz 1822) procedente de piscicultura, estocado em gelo, congelado e de seus produtos derivados. Tese de Doutorado. Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia. Universidade Federal do Amazonas, Brasil, 2007.

PAIVA, F.C. Produção de Hidrolisado Proteico de resíduos de Pirarucu (*Arapaima Gigas*). Dissertação de Mestrado em Ciências de Alimentos. Universidade Federal do Amazonas - UFAM, Brasil, 2014.

PARK, J.-N., WATANABE, T., ENDOH, K., WATANABE, K., & ABE, H. Taste-active components in a Vietnamese fish sauce. *Fisheries Science*, v. 68, p. 913–920, 2002.

PARK, K. J.; VOHNIKOZA, Z.; BROD, F. P. R. Evaluation of drying parameters and desorption isotherms of garden mint leaves (*Mentha crispata* L.). *Journal of Food Engineering*, v.51, n.3, p.193-199, 2002.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R.. Introdução à Espectroscopia. Tradução da 4ª edição norte-americana. Cengage Learning, 2010.

PINTO, V.S., FLORES, I.S., FERRI, P.H.. NMR Approach for Monitoring Caranha Fish Meat Alterations due to the Freezing-Thawing Cycles. *Food Anal. Methods* v. 13, p. 2330–2340, 2020.

REIS, K.A.S. Secagem de cortes de pirarucu (*Arapaima gigas*, Schinz 1822) salgados procedentes de áreas de reserva ambiental e de piscicultura do estado do Amazonas. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós- Graduação em Ciências dos Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas, Brasil, 2015.

RODRIGUES, A. P. O. Alimentação e nutrição do pirarucu (*Arapaima gigas*). Palmas, Brasil: Embrapa Pesca e Aquicultura, 2015.

SALLAM, K. I. Chemical, sensory and shelf life evaluation of sliced salmon treated with salts of organic acids. *Food Chem.* v. 101, n. 2, 2007.

SAMUELSSON, L. M, LARSSON, D.G. Contributions from metabolomics to

fish research. Mol Biosyst. v. 4. n.10, 2008.

SANTANA, A.J.R. Desenvolvimento de um modelo de marketing industrial aplicado na indústria alimentar: o caso do Pirarucu da Amazônia. Dissertação de Mestrado. Universidade do Minho, Brasil, 2009.

SANTANA, M. J. Determinação da estrutura terciária do peptídeo Cn-AMP1 isolado da água do coco verde, por Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brasil, 2013.

SANTOS, E. L. Q. de V. "Avaliação da vida de prateleira do pirarucu (*Arapaima gigas*) salgado-seco comercializado em feiras da cidade de Manaus e Fonte Boa, Amazonas." Manaus. 2011.

SANTOS, M.S., COLNAGO, L.A. Validação de método quantitativo por RMN de ¹H para análises de formulações farmacêuticas. Quím. Nova, v. 36, n. 2, 2013.

SÃO JOSÉ, J. F. B., ABRANCHES, M. Microbiologia e Higiene de Alimentos - Teoria e Prática. 1st ed. Rio de Janeiro: Editora Rubio, 2019.

SCANO, P., ROSA, A., LOCCI, E., DESSI, M.A. and LAI, A. NMR study of the lipid profile of mullet raw roe and bottarga. Eur. J. Lipid Sci. Technol., v. 111: p. 505-512, 2009.

SCHLICHTERLE-CERNY, H; GROSCH, W. Evaluation of taste compounds of stewed beef juice. Zeitschrift für Lebensmittel -Untersuchung und -Forschung A, v. 207, p. 369–376, 1998.

SHAH, A.K.M.A; OGASAWARA, M; EGI, M. KURIHARA, H; TAKAHASHI, K. Identification and sensory evaluation of flavour enhancers in Japanese traditional dried herring (*Clupea pallasii*) fillet, Food Chemistry, V.122, n.1, 2010.

SHUMILINA E, CIAMPA A, CAPOZZI F, RUSTAD T, DIKIY A. NMR approach for monitoring post-mortem changes in Atlantic salmon fillets stored at 0 and 4°C. Food Chem. v.1;n.184, p.12-22, 2015.

SILVA, J. A. Tópicos da Tecnologia de Alimentos. Rio de Janeiro: ed. Varela. p. 232, 2000.

SILVA, J. R. Substituição parcial de cloreto de sódio na elaboração de filé de tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) salgado e seco.(Mestrado) -

CCHSA, UFPB, João Pessoa, Brasil, 2015.

SILVA, R. C.; Ressonância Magnética Nuclear de Baixo Campo em Estudos de Petróleos. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Espírito Santo, Brasil, 2009.

SOARES, K. M. P.; GONCALVES, A. A. Qualidade e segurança do pescado. Revista do Instituto Adolfo Lutz, v, 71, n.1, p.1-10, 2012.

SOUSA, A. R. B. Piscicultura de Pirarucu. Coleção Criar. Embrapa. Brasília – DF, 2017.

SOUZA, A. M.. POPPI, R. J. Experimento didático de quimiometria para análise exploratória de óleos vegetais comestíveis por espectroscopia no infravermelho médio e análise de componentes principais: um tutorial, parte I. Química Nova, v.35, n. 1, 2012.

SZYMAŃSKA, E., SACCENTI, E., SMILDE, A.K. ET AL. Double-check: validation of diagnostic statistics for PLS-DA models in metabolomics studies. Metabolomics, v. 8, p. 3–16, 2012.

TANG, F., VASAS, M., HATZAKIS, E., SPYROS, A. Magnetic resonance applications in food analysis. Annual Reports on NMR Spectroscopy, v. 98, 2019.

VENÂNCIO, T. et al. Fast and simultaneous measurement of longitudinal and transverse NMR relaxation times in a single continuous wave free precession experiment. Journal of Magnetic Resonance, v. 173, n. 1, p. 34-39, 2005.

VISCIANO, P., SCHIRONE, M., Paparella, A. An overview of histamine and other biogenic amines in fish and fish products. v. 9, n. 12, 2020.

WEI, Y., LIANG, M., MAI, K., ZHENG, K. AND XU, H. ¹H NMR-based metabolomics studies on the effect of size-fractionated fish protein hydrolysate, fish meal and plant protein in diet for juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.). Aquacult Nutr, v. 23: p. 523-536, 2017.

WESTERHUIS, J.A., HOEFSLOOT, H.C.J., SMIT, S. ET AL. Assessment of PLSDA cross validation. Metabolomics, v. 4, p. 81–89, 2008.

WISHART, D. Metabolomics: applications to food science and nutrition research. Trends in Food Science e Technology, v. 19, n. 9, p.482-493,

2008.

XIA J, PSYCHOGIOS N, YOUNG N, WISHART DS. MetaboAnalyst: a web server for metabolomic data analysis and interpretation. *Nucleic Acids Res.* V. 37, 2009.

YANG, L., DAI, B., AYED, C., LIU, Y., Comparing the metabolic profiles of raw and cooked Pufferfish (*Takifugu flavidus*) meat by NMR assessment, *Food Chemistry*, v. 290, 2019.

ZHANG, Z.; SUN, Y.; SANG, S.; JIA, L.; OU, C. Emerging Approach for Fish Freshness Evaluation: Principle, Application and Challenges. *Foods*, v. 11, n. 13, 2022.

ZHENG R, CHEN Z, GUAN Z, ZHAO C, CUI H, SHANG H. Variable importance for projection (VIP) scores for analyzing the contribution of risk factors in severe adverse events to Xiyanping injection. *Chin Med.* V.13, n.1, 2023.

8 APÊNDICE

```
Current Data Parameters
NAME          NMR-274-22_PFN14D
EXPNO         11
PROCNO        1

F2 - Acquisition Parameters
Date_         20220414
Time          15.31 h
INSTRUM       spect
PROBHD        Z119470_0223 (
PULPROG       zgpr
TD            32768
SOLVENT       D2O
NS            32
DS            2
SWH           8012.820 Hz
FIDRES        0.489064 Hz
AQ            2.0447233 sec
RG            119.26
DW            62.400 usec
DE            10.00 usec
TE            298.1 K
D1            15.000000000 sec
D12           0.000002000 sec
TD0           1
SFO1          500.1323515 MHz
NUC1          1H
P1            10.02 usec
PLW1          20.32299995 W
PLW9          0.000008129 W

F2 - Processing parameters
SI            131072
SF            500.1299554 MHz
WDW           EM
SSB           0
LB            0.30 Hz
GB            0
PC            1.00
```

Figura 80. Parametros de aquisição de RMN de 1H das amostras de pirarucu comercial e produzido.

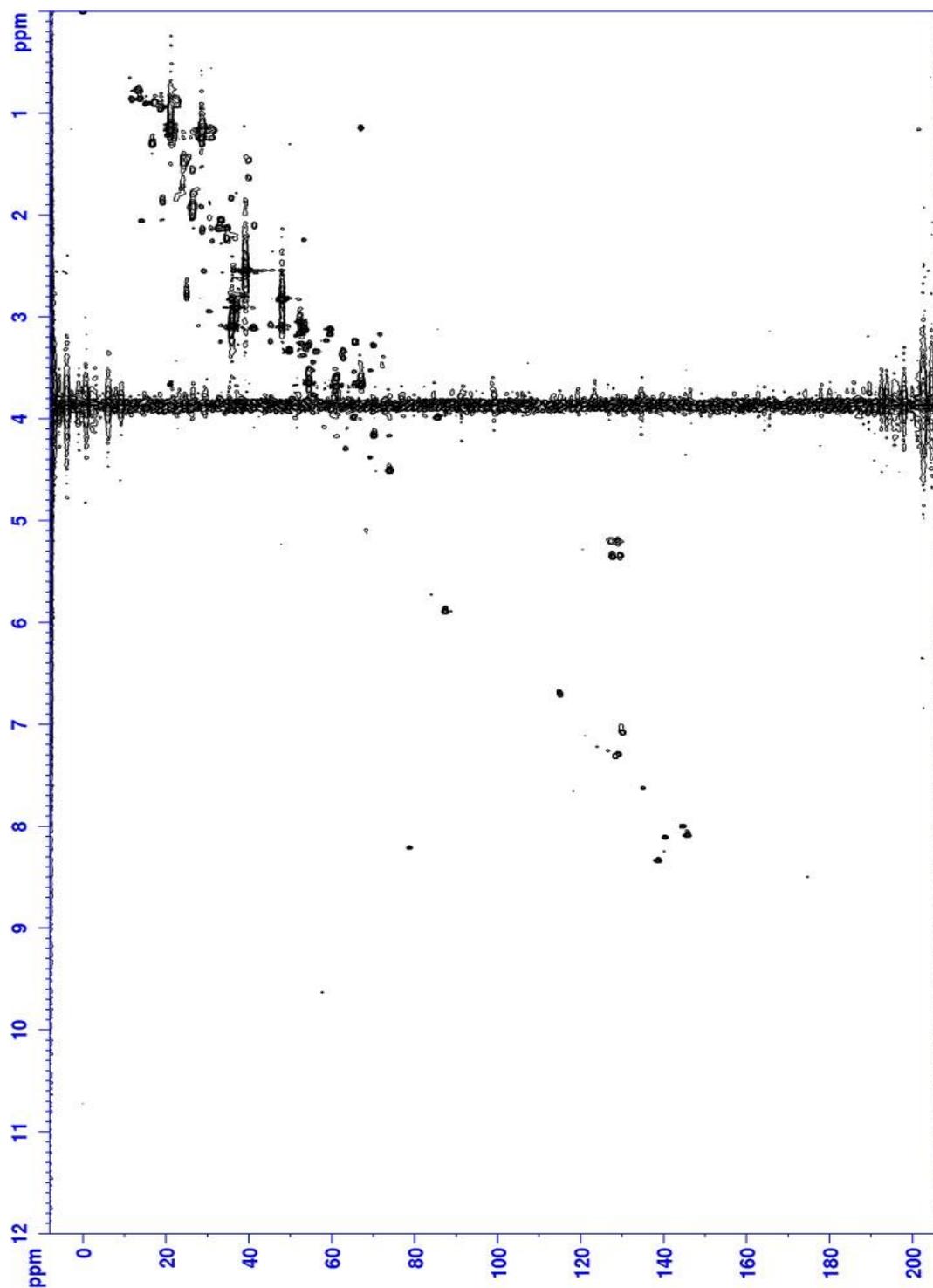


Figura 81. Experimento 2D de correlação heteronuclear (HSQC) das amostras de pirarucu comercial.

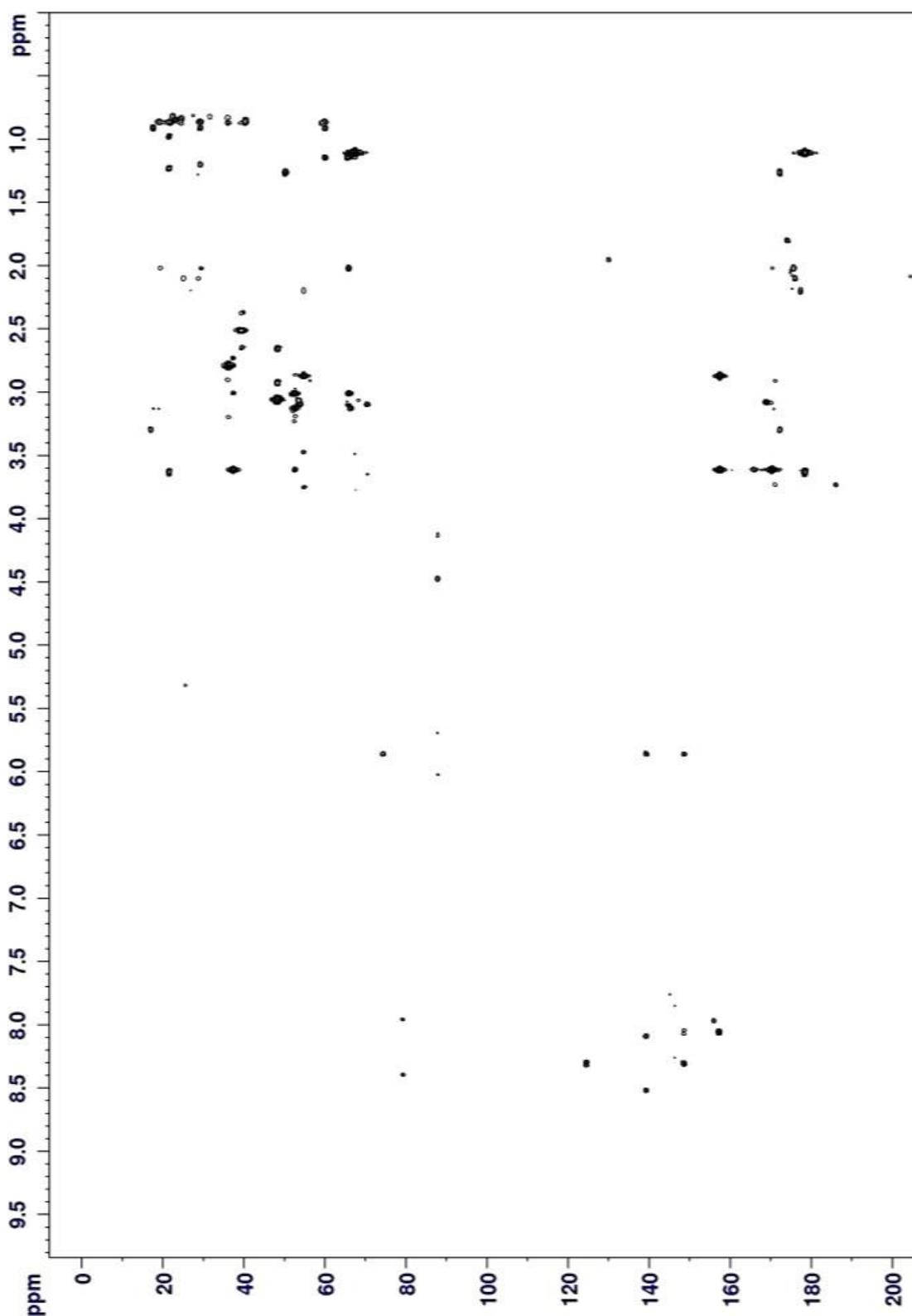


Figura 82. Espectro de RMN 2D de correlação heteronuclear (HMBC) das amostras de pirarucu comercial.

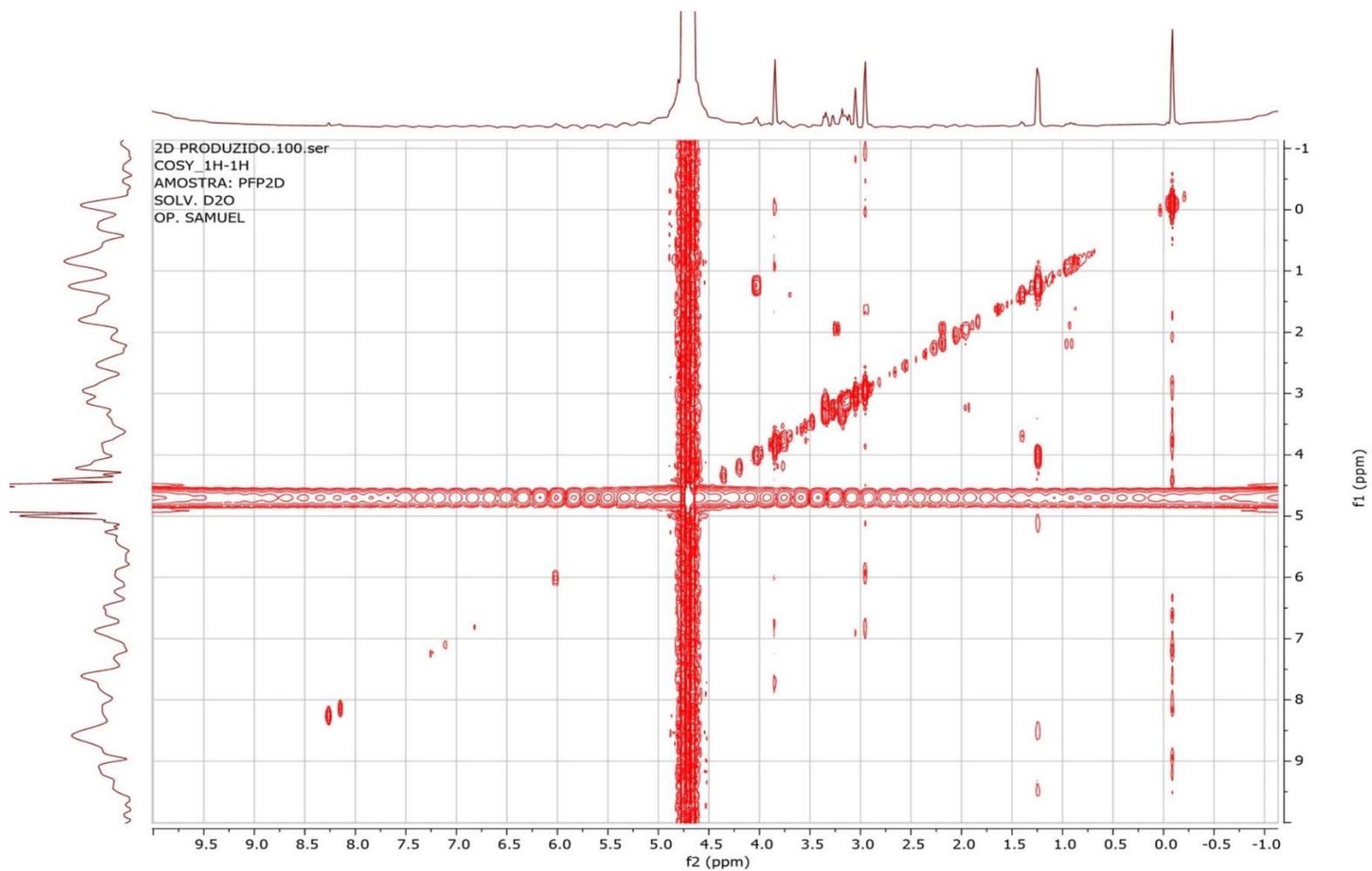


Figura 83. Experimento de RMN 2D de correlação homonuclear (COSY) das amostras de pirarucu produzidas.

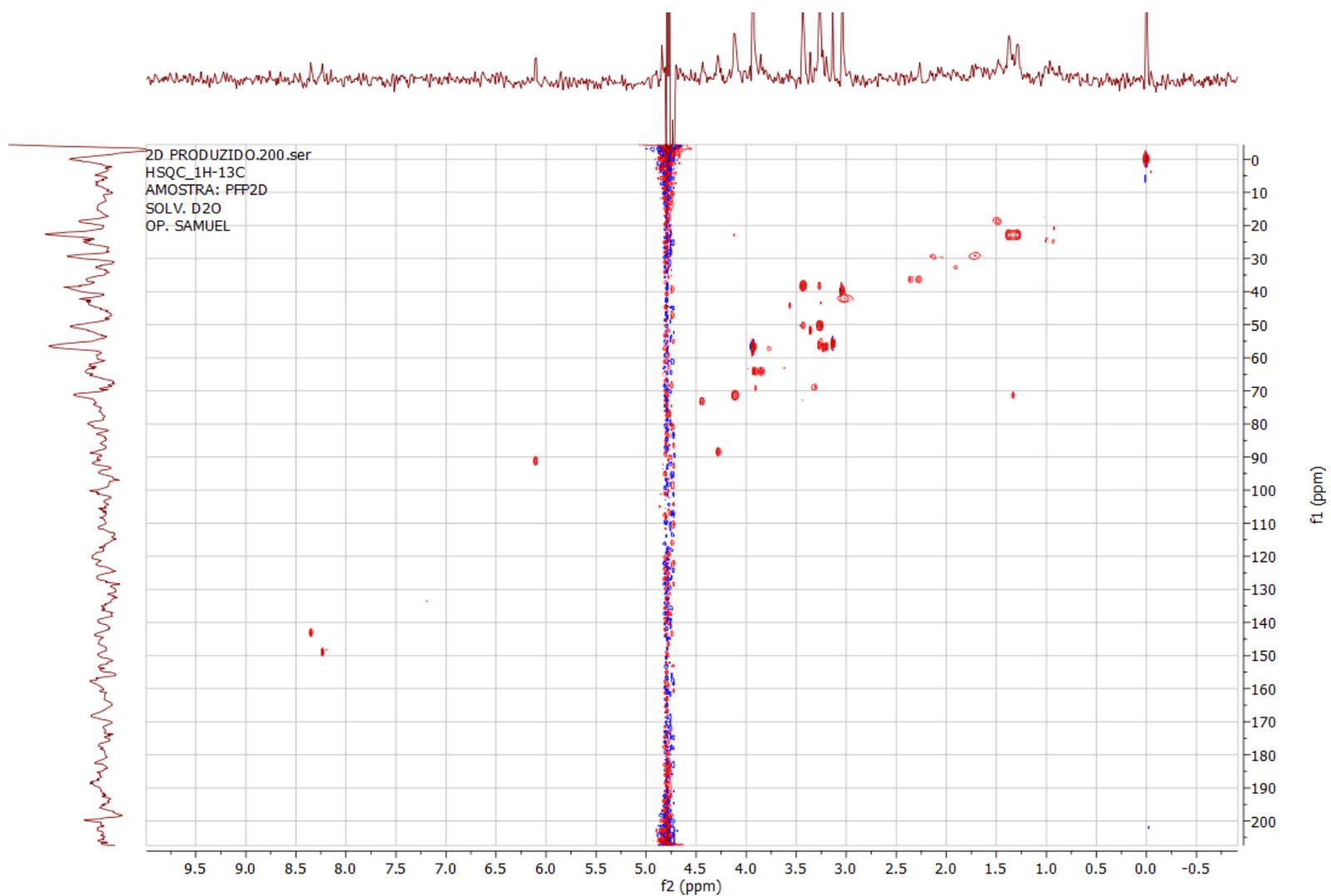


Figura 84. Espectro de RMN 2D de correlação heteronuclear (HSQC) das amostras de pirarucu produzidas.

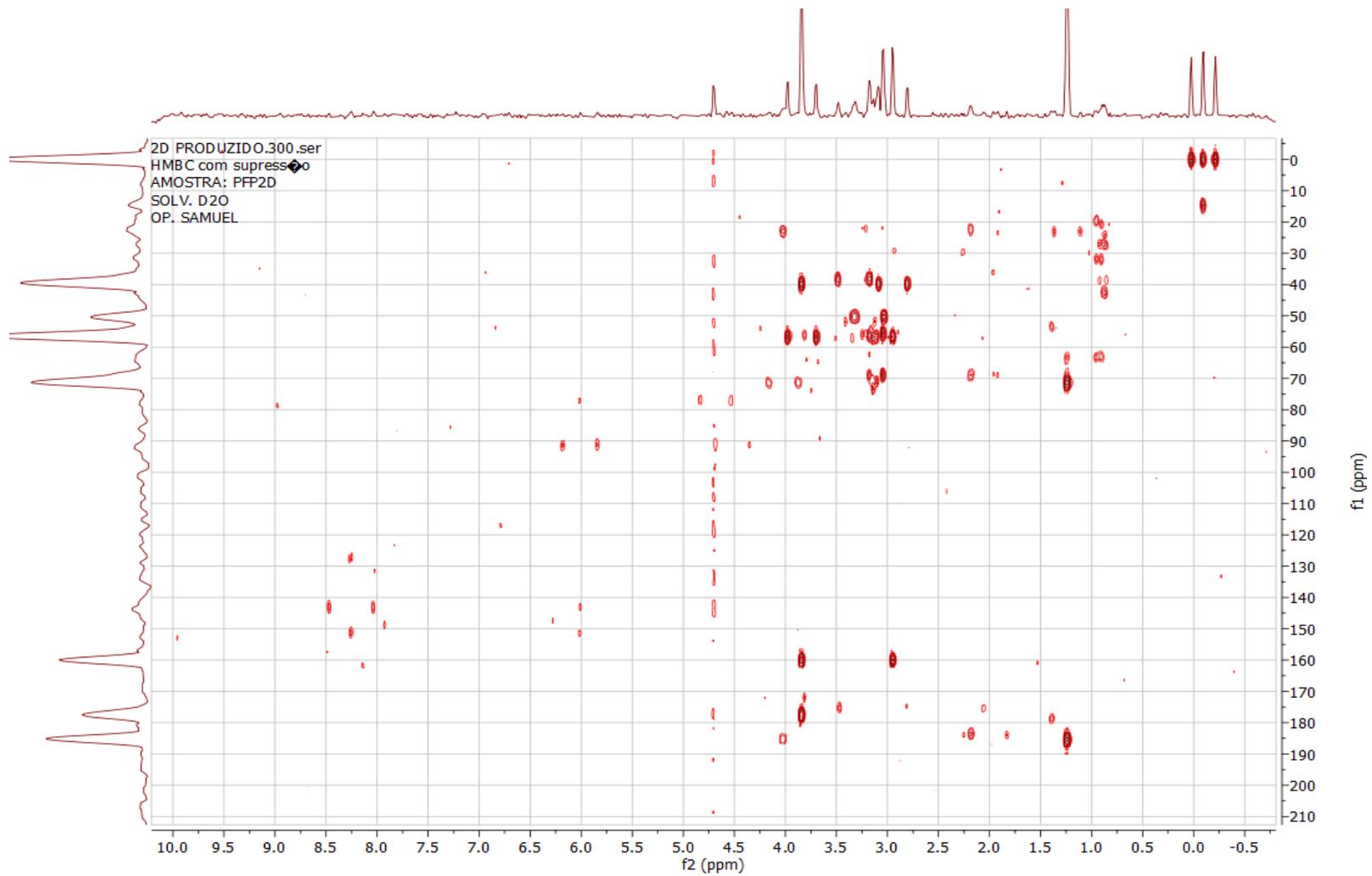


Figura 85. Espectro de RMN 2D de correlação heteronuclear (HMBC) das amostras de pirarucu produzido.

Figura 4. Questionário diagnóstico aplicado com os comerciantes de pirarucu na cidade de Manaus.

 Poder Executivo Ministério da Educação Universidade Federal do Amazonas Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação Programa de Pós-Graduação em Química		 UFAM
TERMO DE COLETA DE AMOSTRA- <i>Arapaima Gigas</i>		
Informações Gerais		Código da amostra:
Amostrador: _____		Data: ____ / ____ / ____
Local da Coleta: _____		Zona: _____
Endereço: _____		
Tipo de Comércio: _____		
Município: _____		Estado: _____
Dados de Origem da Amostra:		
Quantidade de Amostra (g):	<i>Fresco:</i>	<i>Salgado:</i>
Parte do Peixe Coletado:		
Sexo:		
Idade:		
Local de Pesca:		
Processo de Salga Empregado:	*****	
Processo de Secagem Empregado:	*****	
<i>Outras Informações:</i>		