



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL  
DO PARANÁ  
CÂMPUS CAMPO MOURÃO

PPGTA UTFPR  
Programa de Pós-Graduação  
em Tecnologia de Alimentos

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de  
Alimentos

JULIANA MARQUES PEREIRA

**Metodologia alternativa para detecção rápida de *Salmonella* ssp. em  
leite via espectroscopia e quimiometria**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
PPGTA

Dissertação

CAMPO MOURÃO  
2016

**JULIANA MARQUES PEREIRA**

**Metodologia alternativa para detecção rápida de *Salmonella* ssp. em  
leite via espectroscopia e quimiometria**

Dissertação apresentada ao programa de Pós Graduação em Tecnologia de Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Tecnologia de Alimentos.

Orientador(a): Paulo Henrique Março

Co-orientador(a): Patrícia Valderrama

**CAMPO MOURÃO  
2016**



## TERMO DE APROVAÇÃO



### METODOLOGIA ALTERNATIVA PARA DETECÇÃO RÁPIDA DE *SALMONELLA* SSP. EM LEITE VIA ESPECTROSCOPIA E QUIMIOMETRIA

Por:

**JULIANA MARQUES PEREIRA**

Essa dissertação foi apresentada às catorze horas, do dia seis de maio de dois mil e dezesseis, como requisito para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos, Linha de Pesquisa Ciências e Tecnologia de Alimentos, no Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

---

Prof. Dr. Paulo Henrique Março (Orientador – PPGTA)

---

Profa. Dra. Aline Coqueiro (Membro Externo – UTFPR)

---

Profa. Dra. Lívia Bracht (Membro Externo – UEM)

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

P436m Pereira, Juliana Marques

Metodologia alternativa para detecção rápida de Salmonella ssp. em leite via espectroscopia e quimiometria – 2016. 45 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Paulo Henrique Março.

Coorientadora: Patrícia Valderrama.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. Campo Mourão, 2016.

Inclui bibliografias.

1. Leite - Contaminação. 2. Salmonela. 3. Alimentos – Dissertações. I. Março, Paulo Henrique, orient. II. Valderrama, Patrícia, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. IV. Título.

CDD: 637.127

Biblioteca Câmpus Campo Mourão

Lígia Patrícia Torino CRB 9/1278

*“Dedico esta dissertação a Deus, meu pai que sempre esteve ao meu lado, a minha madrasta que sempre me ajudou como uma mãe, a minha mãe pelas palavras de incentivo e apoio, meus irmãos pelo carinho, amor e companheirismo, aos meus amigos e orientadores pelo apoio, força, incentivo e amizade.”*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço em primeiro lugar a Deus, que através da força do teu espírito, me fez superar as dificuldades encontradas no caminho, e de conseguir mais uma conquista ao concluir este trabalho.

Ao meu pai Sinésio, por tudo que fez por mim, pelo exemplo e pelo apoio, e por nunca me deixar desistir, a minha madrasta Cleide por ter sido como uma mãe para mim, por todo o apoio e dedicação. Agradeço também a minha mãe Márcia que mesmo estando longe me tem em suas orações me apoiando sempre.

Aos Professores Dr. Paulo Henrique Março e Dr<sup>a</sup> Patrícia Valderrama, responsáveis pela realização deste trabalho, pela paciência e inteligência na orientação e valorização desta pesquisa, pelo apoio, ensinamentos, compreensão e amizade.

Aos meus irmãos Carina e João Vitor por me fazerem feliz e amada, pelo apoio, companheirismo, carinho e atenção quando preciso.

Aos meus amigos que conquistei durante o mestrado Anderson, Larissa, Jacqueline e Débora, que se tornaram verdadeiros amigos, pelos momentos divididos juntos, vou sentir muita falta de todos vocês. À Luiza pela dedicação durante todo o trabalho, pelas sugestões, apoio e pela amizade, sem você eu não teria conseguido. Ao meu amigo Marlon Jr. pelo apoio, amizade e companheirismo para que eu pudesse realizar o meu trabalho.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Tecnologia de Alimentos, pelos ensinamentos.

Agradeço, também, à CAPES pelo apoio financeiro.

Agradeço aos membros da banca examinadora, por terem aceitado o convite, pela disponibilidade e contribuições para este trabalho.

## RESUMO

O leite é um alimento com poder nutricional considerável e, por ser rico em componentes nutritivos, apresenta-se como um ótimo meio de crescimento para microrganismos. Portanto, o leite “cru”, deve passar por um tratamento térmico para reduzir ou eliminar as bactérias nocivas. O consumo de leite que tenha passado por um tratamento inadequado pode levar a infecções devido a diversos agentes patogênicos como, por exemplo, a *Salmonella* spp.. Por ser altamente nociva, a presença desta bactéria em alimentos é intolerável, tornando obrigatórios os testes microbiológicos de amostras de alimentos para determinar a presença deste microrganismo. Os métodos convencionais para a detecção da *Salmonella* spp. são lentos e trabalhosos, exigem o uso de volumes consideráveis de meios líquidos e sólidos e reagentes. Desta forma, metodologias alternativas que apresentem vantagens, tais como um custo relativamente baixo, rapidez, não ser destrutiva, ser livre de uso de reagentes, e conseqüentemente, não gerar *Q Residuals*, são demandas urgentes no controle de qualidade deste tipo de alimento. Assim, esta pesquisa teve como objetivo oferecer uma metodologia alternativa baseada em Espectroscopia no Infravermelho Próximo (NIR) para discriminar entre presença e ausência de *Salmonella* spp. em leite integral e desnatado UHT (*Ultra High Temperature*). Para isso, foram adquiridas diferentes amostras de leite integral e desnatado, ambos tratados de forma UHT. O tratamento dos dados foi realizado em *software* Matlab®, utilizando-se ferramentas do PLS toolbox®. Os modelos PLS-DA obtidos foram centrados na média, utilizando-se validação cruzada com algoritmo “deixe um fora”. O modelo para a discriminação de amostras de leite desnatado foi construído utilizando-se 4 variáveis latentes e apresentou RMSEC = 0,1639; RMSECV = 0,2084 e RMSEP = 0,0971. Já para leite integral, o modelo foi construído utilizando-se 6 variáveis latentes com valores de RMSEC = 0,1351; RMSECV = 0,2076 e RMSEP = 0,0928. Os resultados mostraram que a metodologia sugerida foi capaz de discriminar as amostras contaminadas das não contaminadas com êxito, apresentando potencial para implementação no setor de controle de qualidade deste tipo de alimento.

**Palavras-chave:** Leite UHT, *Salmonella* spp., Infravermelho próximo (NIR), quimiometria.

## **ABSTRACT**

Milk is a food with significant nutritional value and for being rich in nutritional constituents is presented as a great growth medium for microorganisms. Therefore, the "raw" milk, must undergo a thermal treatment to reduce or eliminate the most harmful bacteria. The consumption of milk that has passed through improper treatment, can lead to infections due to various pathogens such as, *Salmonella* spp.. For being highly detrimental, the presence of these bacteria in food is intolerable, making the microbiological food testing's to determine the presence of this microorganism, absolutely required. Conventional methods to detect *Salmonella* spp. are laborious, requiring the use of significant amounts of liquid and solid media and reagents, besides demanding time-consuming procedures. Therefore, alternative methods which provide advantages, such as, relatively low cost, fast, non-destructive, free of reagents and, consequently, which does not generate waste are urgent demand did to the quality control of this kind of food. Thus, this research aimed to offer an alternative methodology based on Near Infrared (NIR) spectroscopy to discriminate between the presence and absence of *Salmonella* spp. in whole and skimmed UHT milk. Different samples of whole and skimmed milk, both treated through UHT were submitted to data analysis conducted in Matlab ® software, using PLS toolbox® tools. The PLS-DA models were median centered and cross-validated using leave one out algorithm. The model to discriminate skimmed milk samples was constructed using four latent variables and presented RMSEC = 0.1639; RMSECV = 0.2084 and RMSEP = 0.0971. To the whole milk, the model was built using six latent variables with RMSEC = 0.1351 values; RMSECV = 0.2076 and RMSEP = 0.0928. The results showed that the suggested methodology was able to differentiate between contaminated and uncontaminated samples successfully, presenting potential to be implemented in the quality control sector of milk industry.

**Key-words:** UHT milk, *Salmonella* spp., Near Infrared (NIR), Chemometrics.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Espectros das amostras de leite desnatado (A) sem pré-processamento e (B) após suavização por 1º derivada (Savitzky-Golay).....26
- Figura 2** – Avaliação da presença de amostras anômalas de leite desnatado.....27
- Figura 3** – Desempenho em discriminação do modelo PLS-DA para amostras de leite desnatado (A) não contaminadas e (B) contaminadas com *Salmonella* spp. Classe 1 (♦): amostras não contaminadas; Classe 2 (■): amostras contaminadas; Classe 1 val (◇): amostras não contaminadas previstas pelo modelo; Classe 2 val (□): amostras contaminadas previstas pelo modelo.....28
- Figura 4** – Scores das amostras de leite desnatado contaminadas e não contaminadas com *Salmonella* spp. Classe 1 (♦): amostras não contaminadas; Classe 2 (■): amostras contaminadas; Classe 1 val (◇): amostras não contaminadas previstas pelo modelo; Classe 2 val (□): amostras contaminadas previstas pelo modelo.....29
- Figura 5** – Gráfico dos *loadings* da segunda Variável Latente contra as variáveis.....30
- Figura 6** – Principais bandas e posições relativas dos picos de absorções proeminentes do infravermelho próximo. (Figura adaptada de “METROHM: NIR Spectroscopy - A guide to near-infrared spectroscopic analysis of industrial manufacturing processes”).....31
- Figura 7** – Espectros das amostras de leite integral (A) sem pré-processamento (B) após suavização por Savitzky-Golay e (C) após derivada com janela de 7 pontos.....32
- Figura 8** – Avaliação da presença de amostras anômalas no leite integral.....32
- Figura 9** – Desempenho em discriminação do modelo PLS-DA para amostras de leite integral (A) não contaminadas e (B) contaminadas com *Salmonella* spp. Classe 1 (♦): amostras não contaminadas; Classe 2 (■): amostras contaminadas; Classe 1 val (◇): amostras não contaminadas previstas pelo modelo; Classe 2 val (□): amostras contaminadas previstas pelo modelo.....34
- Figura 10** – Scores das amostras de leite integral contaminadas e não contaminadas com *Salmonella* spp. Classe 1 (♦): amostras não contaminadas; Classe 2 (■): amostras contaminadas; Classe 1 val (◇): amostras não contaminadas previstas pelo modelo; Classe 2 val (□): amostras contaminadas previstas pelo modelo.....35

**Figura 11** – Gráfico dos *loadings* da primeira Variável Latente contra as variáveis.....**36**

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

UHT – Ultra High Temperature  
UAT - Ultra Alta Temperatura  
APPCC - Análise dos Perigos e Pontos Críticos de Controle  
MRA - Avaliação de Risco Microbiológico  
NIRS - Near Infrared Reflectance Spectroscopy  
MIR - Medium Infrared  
PLS-DA - Partial Least Squares – Discriminant Analysis  
PLS - Partial Least Squares  
PCA - Principal Component Analysis  
VLs - Variáveis Latentes  
RMSECV - Root Mean Square Error of Cross Validation  
RMSEP – Root Mean Squares Error of Prediction  
RMSEC - Root Mean Squares Error of Calibration  
SIMPLS - Straight forward implementation of statistically  
UFC – Unidade Formadora de Colônia

## Sumário

1. INTRODUÇÃO .....	13
2. QUIMIOMETRIA .....	17
2.1- Mínimos Quadrados Parciais (PLS, Partial Least Squares) .....	18
2.2- Mínimos Quadrados Parciais com Análise Discriminante (PLS-DA, Partial Least Squares- Discriminant Analysis).....	19
3. OBJETIVOS .....	22
3.1- Objetivo Geral.....	22
3.2- Objetivos Específicos .....	22
4. EXPERIMENTAL .....	23
4.1- Materiais .....	23
4.2- Inóculo.....	23
4.3- Coleta de dados .....	23
4.4- Softwares.....	24
4.5- Métodos quimiométricos .....	24
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	25
6. CONCLUSÕES .....	37
7. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	38
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	39

## 1. INTRODUÇÃO

Dentre a grande variedade de alimentos o leite se destaca pela sua rica constituição e, dentre os alimentos de origem animal de maior consumo, em muitos casos, este é consumido como a única fonte de alimento para recém-nascidos (REZENDE et al., 2000; MARTINS et al., 2008). Considerado um alimento completo, o leite contém gordura, proteínas, carboidratos, minerais, vitaminas, enzimas e cerca de 100.000 compostos químicos diferentes em vários estados de dispersão (WALSTRA, et al., 2006; PINTO et al., 2014).

Por ser um alimento rico em componentes nutritivos, o leite é um ótimo meio de cultura para vários microrganismos. Portanto, quando obtido ou processado em más condições higiênico-sanitárias, pode-se tornar um importante veículo de transmissão de microrganismos patogênicos ao homem (VIDAL-MARTINS et al., 2005). Assim, para ser consumido, o leite em seu estado “cru” deve passar por um tratamento térmico para eliminar bactérias nocivas e reduzir outras bactérias (MARTINS et al., 2008).

Os tratamentos utilizados, tais como o processamento térmico, são tecnologias utilizadas para oferecer condições de consumo seguro e aumentar a vida útil deste alimento, já que tal procedimento inativa enzimas e destrói bactérias patogênicas, fornecendo ao alimento estabilidade suficientes durante o armazenamento. Dependendo da intensidade do tratamento, o alimento estará apto a permanecer mais tempo na prateleira sob condições de refrigeração (pasteurização) ou por vários meses à temperatura ambiente (esterilização) (BERMÚDEZ-AGUIRRE; CORRADINI, 2012).

Dentre os tratamentos térmicos utilizados, os mais comuns são os do tipo Temperatura Ultra-Elevada [“UHT” - do inglês “*Ultra High Temperature*”, ou Ultra Alta Temperatura (UAT)] e a Pasteurização. Segundo o Ministério da Agricultura, Abastecimento e Reforma Agrária, através da portaria nº 146 de 1996, leite UHT ou UAT é o leite homogeneizado submetido à temperatura de 130 a 150°C por 2 a 4 segundos, mediante processo térmico de fluxo contínuo, imediatamente resfriado a temperatura inferior a 32°C e envasado sob condições assépticas em embalagens estéreis e hermeticamente fechadas.

A legislação brasileira permite dois tipos de pasteurização do leite, a pasteurização rápida, realizada a temperaturas entre 73 e 75°C por 15 a 20 segundos, e a

pasteurização lenta, entre 62 e 65°C durante 30 minutos, sendo que segundo a Instrução Normativa nº 51 de 2002 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, a pasteurização lenta pode ser adotada na produção de leite pasteurizado para abastecimento público em estabelecimentos de laticínios de pequeno porte, entretanto a pasteurização lenta de leite previamente envasado não é permitida em estabelecimentos sob inspeção sanitária federal.

Um tratamento térmico inadequado ou o leite cru podem causar infecção graças a diversos agentes patogênicos, sendo os mais comuns a *Salmonella* spp., *Campylobacter*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, entre outros. A *Salmonella* spp. continua a ser um grande problema para a saúde pública, principalmente em países em desenvolvimento (EFSA, 2009; FANG, 2005), sendo o segundo microrganismo patogênico mais comum de origem alimentar (BERMÚDEZ-AGUIRRE; CORRADINI, 2012). O gênero *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae*. São bacilos Gram-negativos anaeróbios facultativos, não formadores de endósporos e quando móveis, apresentam flagelos peritríquios. As colônias são oxidase-negativas e fermentadoras de glicose, com formação de ácido e gás (GERMANO e GERMANO, 2003).

De acordo com EUZÉBY, 2008, o gênero *Salmonella* spp compreende 2 espécies, como: *Salmonella enterica*, dividida em 6 sub-espécies: *arizonae*, *diarizonae*, *enterica*, *houtenae*, *indica* e *salamae* e *Salmonella bongori*. As *Salmonellas* spp se multiplicam em temperaturas entre 7 °C e 49,5 °C, sendo 35 °C a 37 °C a temperatura ótima para o seu desenvolvimento (KILLNER, 2008).

*Salmonella* é uma bactéria entérica patogênica para humanos e muitas espécies de animais, agentes de febre tifoide, febres entéricas, gastroenterites e septicemia. É responsável por graves surtos de intoxicações alimentares em diversos países, inclusive o Brasil, devido ao consumo de alimentos e água contaminados com este microrganismo (ALCOCER e OLIVEIRA, 2003). Por isso, a presença desta bactéria em alimentos é intolerável e os testes microbiológicos de amostras de alimentos para determinação da presença deste microrganismo são obrigatórios (CHATTOPADHYAY et al., 2013).

Ainda que obrigatórios, os métodos convencionais para detectar *Salmonella* spp. em amostras de alimentos geralmente envolvem etapas que demandam tempo considerável para a análise. Dentre as etapas, podemos citar pré-enriquecimento,

enriquecimento seletivo, isolamento em meios seletivos e confirmação dos isolados positivos presuntivos por testes bioquímicos e sorológicos (CHATTOPADHYAY et al., 2013). Estes testes exigem o uso de grandes volumes de meios líquidos e sólidos e reagentes, são de trabalho intensivo e demorado, tanto na operação quanto na coleta de dados, podendo durar de 5 a 7 dias.

Desta forma, a associação do leite e seus derivados com vários microrganismos patogênicos levanta a necessidade de intensificar esforços para garantir a segurança desses produtos alimentares. Para este fim, considera-se importante o desenvolvimento de métodos analíticos mais rápidos e eficientes na detecção desses microrganismos em leites e seus derivados, capazes de acusar a presença de patógenos.

Além disso, tais metodologias devem satisfazer as exigências do sistema de segurança alimentar tais como APPCC (Análise dos Perigos e Pontos Críticos de Controle) e MRA (Avaliação de Risco Microbiológico) (KRAMER et al., 2011; MALORNY et al., 2008; EL-SHAROUD, 2015) através de uma detecção rápida, eficiente, com o mínimo de preparo de amostra e uso reduzido (ou nenhum) de reagentes químicos, almejando a aplicação *online* no monitoramento de bactérias que possam estar presentes no leite.

Para atender a esta demanda, uma das possibilidades está na aplicação de métodos ópticos, dentre os quais a espectroscopia na região do infravermelho próximo (NIRS, do inglês “*Near Infrared Spectroscopy*”). A região do infravermelho estende-se desde o final da região espectral visível (700 nm) até ao início da região espectral do infravermelho fundamental (2500 nm) (METROHM, 2013).

Os métodos baseados em espectroscopia, tais como NIRS, apresentam vantagens como baixo custo relativo, simplicidade operacional, além de propiciar análises rápidas (muitas vezes instantâneas), sem necessidade de preparo de amostras (ou com um mínimo de preparo), sem emprego de reagentes e, conseqüentemente, sem geração de *Q Residuals*. Além disso, estas técnicas permitem medidas não destrutivas e não invasivas e podem servir para se extrair informação de uma grande variedade de amostras, já que se medem vibrações de moléculas que apresentem ligações C-H, N-H, S-H e ou O-H (desde que as moléculas sofram variações no momento de dipolo) (CEITIL, 2007).

As bandas de absorção observadas na região NIR são chamadas de sobretons e da combinação de bandas fundamentais de vibrações de estiramentos que têm lugar no MIR (do inglês “*Medium Infrared*”). As ligações do tipo C-H, O-H e N-H, possuem

comprimentos de onda de absorção características. Estas absorções não são muito intensas, e muitas vezes sobrepõem-se, tornando as bandas observadas largas e com baixa absorvidade molar (baixa sensibilidade). Consequentemente, os espectros NIR não são facilmente interpretáveis, havendo a necessidade da aplicação de métodos de análise multivariada para extrair a informação neles contido (SOTELO, 2006). Dessa forma, o emprego de métodos quimiométricos torna-se necessário.

Por definição, pode-se dizer que a quimiometria é um conjunto de métodos matemáticos e estatísticos que são aplicados com o intuito de se obter informações não triviais a partir de um conjunto de dados complexos (BARROS NETO et al., 2006; MARÇO, 2009; VALDERRAMA, 2009).

A aplicação de métodos ópticos em conjunto com métodos quimiométricos podem trazer informações de grande utilidade em diversos ramos da ciência e da indústria (LIMA, 2013), podendo ser utilizadas em aplicações qualitativas e quantitativas de um determinado analito (NAES et al., 2002). Desta forma, este trabalho tem como objetivo oferecer uma metodologia alternativa para determinação da presença de *Salmonella* spp. em amostras de leite dos tipos integral e desnatado, ambos processados via tratamento UHT.

A metodologia sugerida implica na aplicação do NIRS nas amostras de leite em conjunto com o método de Mínimos Quadrados Parciais com Análise Discriminante – PLS-DA (do inglês “*Partial Least Squares – With Discriminant Analysis*”), para a geração de um modelo matemático capaz de distinguir entre amostras que contenham *Salmonella* spp. daquelas livres deste microrganismo.



## 2. QUIMIOMETRIA

A quimiometria tem sido empregada nos mais diversos campos das ciências e tecnologias devido à sua capacidade de fornecer informações quando as análises univariadas não conseguem ajudar.

Em alimentos, a quimiometria já foi utilizada de diversas formas como, por exemplo, na classificação de vinhos de acordo com sua origem geográfica (KWAN, 1980;), na determinação da acidez total (MORAIS et al, 2015), na avaliação de chás (LIU, 1987), na avaliação de óleos e azeites de oliva (GONÇALVES, MARÇO e VALDERRAMA, 2014), no controle de processos na indústria de açúcar e álcool (VALDERRAMA, 2007), no controle de qualidade de leite (SANTOS, 2013), extrato de tomates (PEDRO, 2007), na correlação da dieta animal e o teor de ácidos graxos em carne de cabras (COLTRO, 2005), além de outras aplicações.

O método quimiométrico a ser empregado depende dos dados obtidos da amostra e de qual informação se quer extrair do conjunto de dados em questão. Portanto, existem diversas ferramentas quimiométricas para cada problema a ser abordado. Logo, uma das possibilidades de separação das metodologias quimiométricas seria, de acordo com Ferreira (2015), como: métodos para análise exploratória (tais como Análise de Componentes Principais, Análise de Agrupamentos Hierárquicos), métodos de Calibração Multivariada (tais como os Mínimos Quadrados Clássicos, Mínimos Quadrados Parciais, Regressão nas componentes principais, regressão linear múltipla) e métodos de Classificação ou Métodos Supervisionados de Reconhecimento de Padrões (tais como a Análise Discriminante Linear, k-ésimo Vizinho mais Próximo, Mínimos Quadrados Parciais com Análise Discriminante).

A seguir, será feita uma breve descrição da metodologia empregada neste estudo.

## 2.1- Mínimos Quadrados Parciais (PLS, Partial Least Squares)

Métodos de calibração multivariada já foram utilizados de forma a viabilizar algumas análises como as titulações de oxidação-redução na determinação de açúcares redutores (VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2007a), a cromatografia líquida de alta eficiência na análise de fármacos (VALDERRAMA et al., 2010) e a titulação de neutralização na determinação de acidez em vinhos (MORAIS et al., 2015). Tais aplicações foram realizadas com êxito graças a utilização do método de Mínimos Quadrados Parciais, PLS (do inglês *Partial Least Squares*) (GELADI; KOWALSKI, 1986).

O método PLS se baseia em um método de reconhecimento de padrões não supervisionado conhecido como Análise de Componentes Principais (PCA, do inglês *Principal Component Analysis*) (WOLD, 1987). Ambos, PLS e PCA, são métodos quimiométricos aplicáveis a dados de primeira ordem, ou seja, quando se tem um vetor de respostas instrumentais para cada amostra (VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2009), como, por exemplo, um espectro na região espectral do Infravermelho Próximo (NIR, do inglês *Near Infrared*). Na utilização desses métodos, os espectros são organizados no formato de uma matriz **X**, em que cada linha da matriz corresponde a um espectro e cada coluna corresponde à absorbância nos diferentes comprimentos de onda (MORAIS et al., 2015).

Considerando um caso geral para a determinação de mais de uma espécie de interesse, tem-se uma outra matriz, denominada **Y**, que contém as informações dessas propriedades. No PLS, as matrizes **X** e **Y** são decompostas em um produto de duas matrizes, uma matriz de *scores* (**T** e **U**) e uma matriz de *loadings* (**P** e **Q**), conforme Equações (1) e (2) (OTTO, 1999).

$$\mathbf{X} = \mathbf{T} \mathbf{P}^T \quad (1)$$

$$\mathbf{Y} = \mathbf{U} \mathbf{Q}^T \quad (2)$$

O conjunto de *scores* e *loadings* é denominado de Componentes Principais (PCs) que, no PLS, sofre pequenas modificações para buscar a máxima covariância entre **X** e

Y. Assim, os PCs que são obrigatoriamente ortogonais na Análise de Componentes Principais, no PLS recebem a terminologia de Variáveis Latentes (VLs) por perderem sua ortogonalidade.

A decomposição das matrizes em *scores* e *loadings* é realizada por algoritmos como, por exemplo, o SIMPLS (do inglês, “*Straight forward implementation of statistically*”). (JONG, 1993), e após a decomposição os coeficientes de regressão para o modelo são estimados por mínimos quadrados entre os *scores* e *loadings* de **X** e os *scores* de **Y** (OTTO, 1999). Nesse caso será obtido um vetor de coeficientes de regressão, ou seja, um coeficiente de regressão para cada comprimento de onda utilizado na matriz **X** (GELADI; KOWALSKI, 1986).

## **2.2- Mínimos Quadrados Parciais com Análise Discriminante (PLS-DA, Partial Least Squares- Discriminant Analysis)**

No PLS-DA (do inglês “*Partial Least Squares-Discriminant Analysis*”), a matriz **Y** contém informações acerca das classes de cada amostra e, por isso, o método de reconhecimento de padrões é dito supervisionado. A matriz **Y** assume valores iguais a 0 ou 1 indicando se a amostra pertence ou não à classe. Por exemplo, no caso de quatro classes e a amostra pertencendo à classe 2 o valor de **y** para esta amostra seriam **y** = {0 1 0 0} (BARKER; RAYENS, 2003). Os valores previstos pelo modelo PLS-DA serão idealmente os valores zero e um, entretanto, na prática estes valores se aproximam destes. É calculado um valor limite (*threshold*) entre os valores previstos onde valores acima deste valor limite indicam que a amostra pertence à classe modelada. Valores previstos abaixo deste limite indicam que a amostra não pertence à classe modelada (PATACA, 2006). Este método já foi empregado, por exemplo, para discriminar amostras de própolis (PATACA, 2006; PAGANOTTI, 2013), madeira (PASTORE et al., 2011), espécies comerciais de árvores (PEERBHAY; MUTANGA; ISMAIL, 2013), em análises farmacêuticas (FERNANDES et al., 2012; MALTAS et al., 2013), na autenticação de origem geográfica (BASSBASI et al., 2014), em análises forenses de documentoscopia (SILVA et al., 2014) e avaliação de notas falsificadas de Real (ALMEIDA et al., 2013).

Na escolha adequada do número de variáveis latentes para composição do modelo, um procedimento de validação cruzada (do inglês, *Cross Validation*) pode ser realizado (BRERETON, 2000). A validação cruzada se baseia na habilidade de previsão de um modelo construído por parte de um conjunto de dados seguido pela previsão do restante. Esse tipo de validação pode ser realizado em blocos contínuos, blocos randômicos ou ainda no modo “deixe um de fora” (do inglês “*leave-one-out*”). Neste último caso, uma amostra é deixada de fora no processo de construção do modelo e a seguir essa amostra é prevista pelo modelo construído. Esse processo se repete até que todas as amostras tenham sido deixadas de fora e previstas. O número de variáveis latentes pode ser então escolhido com base no valor da raiz quadrada da soma do quadrado dos erros de validação cruzada (RMSECV, do inglês *Root Mean Square Error of Cross Validation*), como demonstrado na Equação (3). A exatidão do conjunto de previsão é avaliada pelo erro médio quadrático de previsão (RMSEP – do inglês, “*Root Mean Squares Error of Prediction*”), calibração (RMSEC - do inglês, “*Root Mean Squares Error of Calibration*”) e validação cruzada (RMSECV - do inglês, *Root Mean Squares Error of Cross-validation*) (SANTOS et. al, 2013).

$$\text{RMSECV} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n}} \quad (3)$$

$$\text{RMSEP} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n}} \quad (4)$$

$$\text{RMSEC} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n}} \quad (5)$$

Em que,  $y_i$  é o valor de referência para a propriedade de interesse da amostra “i”,  $\hat{y}_i$  é o valor da propriedade de interesse da amostra “i” previsto pelo modelo e n é o número de amostras previstas no processo de validação cruzada.

O modelo consiste em etapas de calibração, onde as características dos dados são investigadas com a finalidade de encontrar um modelo para seu comportamento, e em etapas de validação, em que algumas amostras que não participaram da calibração são utilizadas para avaliar a qualidade do modelo construído (GELADI; KOWALSKI, 1986). A qualidade do modelo construído também pode ser avaliada através dos

parâmetros de sensibilidade e especificidade. A sensibilidade do modelo refere-se ao número de amostras previstas como sendo da classe, dividido pelo número de amostras que realmente pertencem de fato à classe. Enquanto que a especificidade do modelo corresponde ao número de amostras previstas como não sendo da classe, dividido pelo número real de amostras que não são da classe (ALMEIDA et al., 2013).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1- Objetivo Geral**

O objetivo geral do trabalho foi construir modelos PLS-DA capazes de discriminar amostras de leites contaminados com *Salmonella* spp. de leites não contaminados.

#### **3.2- Objetivos Específicos**

Especificamente, objetiva-se:

- Proporcionar o crescimento da bactéria a ser utilizada;
- Realizar a contaminação das amostras de leites desnatados e integrais;
- Medir-se espectros NIRS das amostras de leites contaminadas e não contaminadas;
- Construir modelos de discriminação para amostras de leite desnatado;
- Construir modelos de discriminação para amostras de leite integral;
- Avaliar os modelos construídos com relação a capacidade de discriminação a partir dos parâmetros de qualidades provenientes dos modelos construídos.

## **4. EXPERIMENTAL**

### **4.1- Materiais**

As amostras de leite foram adquiridas em comércio local, da cidade de Campo Mourão, e em embalagens do tipo TetraPac ® (caixa) de 1,0 litro, sendo 26 amostras de leite integral UHT e 18 amostras de leite desnatado UHT, de diferentes marcas e lotes.

### **4.2- Inóculo**

A bactéria utilizada para a contaminação das amostras de leite foi a *Salmonella* ATCC 14028. Para a utilização deste microrganismo, foram preparadas 3 placas com ágar nutriente, utilizando-se a técnica do estriamento no ágar para o isolamento de colônias de *Salmonella*, com os devidos cuidados microbiológicos exigidos durante a manipulação (CLSI, 2015). Em seguida foram incubadas em estufa à 37 °C por 24 horas.

Após incubação (durante 24 horas) das placas contendo as colônias de bactérias, foram selecionadas de 3 a 5 colônias adequadamente isoladas. Tocou-se o topo de cada colônia com uma alça, transferindo-se os microrganismos para um tubo contendo de 10 a 15 mL (aproximadamente) de caldo nutriente. Incubou-se a cultura em caldo a 37 °C até que se alcançasse a turbidez óptica, foi utilizado como padrão a escala de McFarland, com concentração aproximada de  $10^8$  UFC/ml. Os tubos contendo a cultura foram reservados afim de realizar a contaminação do leite.

### **4.3- Coleta de dados**

Cada amostra foi avaliada a partir da coleta de 1,0 mL de leite para a medida espectral no infravermelho próximo (NIR), realizada em um equipamento JDSU

MicroNIR®, capaz de medidas na região de comprimentos de onda de 900 a 1700 nm. Em seguida, retirou-se uma segunda alíquota, agora de 5,0 mL da amostra da caixa do leite em análise, e transferiu-se para um *erlenmeyer* de modo a ser enriquecida com 1,0 mL de cultura de *Salmonella* spp., que estava no tubo com uma concentração aproximada de  $10^8$  UFC/ml, homogeneizou e esperou-se por 30 minutos aproximadamente, em temperatura ambiente, após esse tempo foi retirado 1,0 mL desta mistura para a medição em NIR. Todo o procedimento foi realizado de forma asséptica. As medidas foram realizadas à temperatura ambiente.

#### **4.4- Softwares**

Após a aquisição dos espectros, os dados foram organizados em forma de matriz, na qual cada linha representa uma amostra e cada variável uma coluna. O tratamento dos dados foi realizado em *software* Matlab®, utilizando-se ferramentas do PLS toolbox®. Os modelos obtidos PLS-DA foram centrados na média, utilizando-se validação cruzada.

#### **4.5- Métodos quimiométricos**

O método utilizado foi o modelo do tipo PLS-DA que pode ser capaz de classificar as amostras como pertencentes ou não pertencentes a um grupo como, por exemplo, contaminadas e não contaminadas por *Salmonella*, utilizando-se de espectros que podem ser obtidos em tempo real, o que possibilita uma melhora significativa no controle de qualidade deste tipo de alimento.



## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

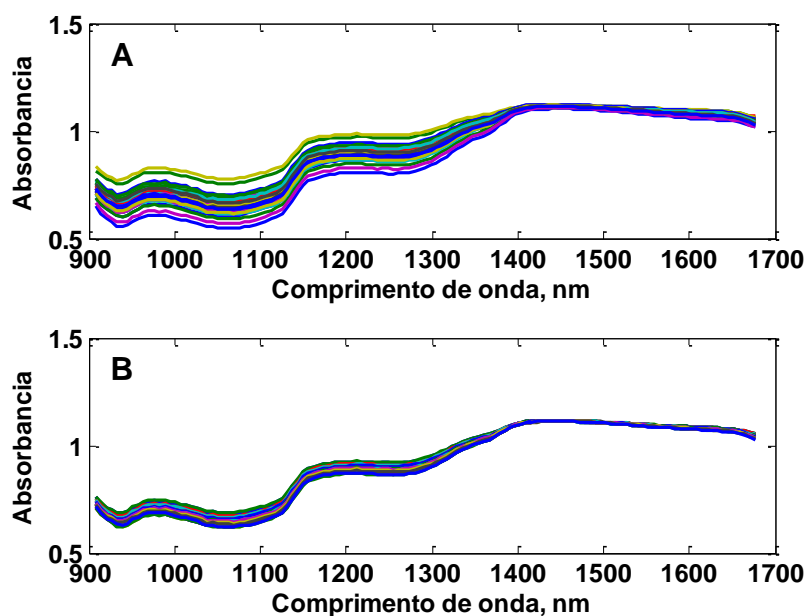
Após as etapas de preparo das amostras e aquisição das medidas espectrais, fez-se a organização dos dados na forma de matrizes de modo que cada linha continha informação sobre as amostras e, cada coluna, informava sobre as diferentes variáveis medidas. Para a construção dos modelos os dados foram centrados na média, tiveram a linha de base corrigida através da primeira derivada empregando o algoritmo de Savitsky-Golay (SAVITSKY; GOLAY, 1964), utilizando-se validação cruzada do tipo “deixe um de fora” para avaliar o número de variáveis latentes no momento da construção dos modelos. Estes passos são necessários para garantir que o modelo está sendo utilizado para medir as diferenças reais entre as amostras e não os erros sistemáticos, como aqueles relativos aos desvios corrigidos (diferenças na linha base e ou diferenças na intensidade).

Primeiramente, foram adquiridos espectros de leites desnatados. A Figura 1 apresenta (A) os espectros brutos e em seguida (B) estes espectros após primeira derivada, forma na qual foram utilizados para a construção do modelo de discriminação em leites desnatados. Observa-se que a simples inspeção visual não permite a diferenciação dos sinais referentes aos espectros das amostras contaminadas das não contaminadas.

A matriz utilizada foi constituída por 36 linhas, contendo 18 espectros de diferentes amostras de leite não contaminadas e 18 espectros de diferentes amostras de leite contaminadas, compostas por 125 colunas, cada uma contendo informação sobre as variáveis (absorbâncias nos diferentes comprimentos de onda) medidas. Neste caso, considerou-se como classe 1 as amostras de leite não contaminadas e como classe 2 as amostras de leite contaminadas com *Salmonella* spp.

Para a construção do modelo, fez-se uma análise para a identificação de amostras anômalas (*outliers*), que correspondem a amostras com um comportamento muito diferente das demais amostras presentes. Esse tipo de amostra pode estar presente em um conjunto de dados por diferentes razões, como por exemplo, erros laboratoriais, amostras de uma outra população ou erros instrumentais (VALDERRAMA et al. 2007). Nesse trabalho, a possibilidade de existência de “amostras anômalas” foi avaliada em conformidade com o gráfico de *Leverage vs Q Residuals*. O *Leverage* representa o

quanto uma amostra pode influenciar o modelo, ou seja, o quanto ela pode influenciar nos parâmetros de qualidade do modelo, enquanto os *Q Residuals* representam os resíduos espectrais não modelados, ou melhor dizendo, a diferença entre o valor original da amostra e sua projeção como variável latente. Para ser considerada anômala, a amostra deve apresentar alto *Leverage* e alto resíduo simultaneamente. Portanto, de acordo com a Figura 2, não foram identificadas amostras anômalas para o conjunto de espectros referentes ao leite desnatado, indicando que nenhuma amostra deve ser descartada na construção do modelo. Amostras com os requisitos mínimos para exclusão deveriam aparecer, neste caso específico, com valores de *Leverage* entre 0.6 - 0.7 e de *Q Residuals* entre 2 e 3 x 10<sup>-5</sup> simultaneamente, o que não é verificado.

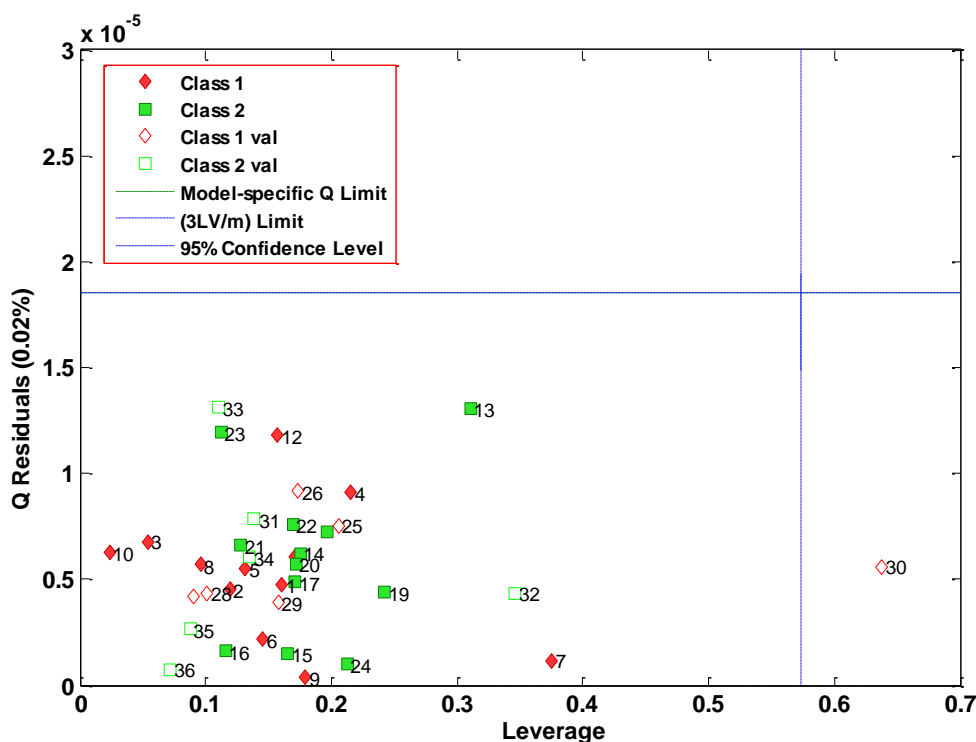


**Figura 1** – Espectros das amostras de leite desnatado (A) sem pré-processamento e (B) após suavização pelo algoritmo proposto por Savitzky-Golay.

A exatidão do modelo construído foi avaliada de acordo com os valores de RMSECV (0,208), RMSEP (0,097) e R<sup>2</sup> (0,893), apresentando os mesmos valores para ambas as classes. O coeficiente de determinação é considerado um outro indicador de exatidão para os modelos construídos via PLS (VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2009). O desempenho do modelo foi testado utilizando-se as amostras de validação,

selecionadas pelo algoritmo de *Kennard-Stone* (KENNARD; STONE, 1969), a partir dos parâmetros sensibilidade e especificidade. Como a sensibilidade do modelo corresponde à sua habilidade em prever corretamente todas as amostras de validação de uma classe em particular, um valor de sensibilidade igual a 1 indica 100% de acerto na previsão das classes. No modelo construído a sensibilidade para ambas as classes não contaminada e contaminada, foi igual a 1, indicando que o modelo foi capaz de classificar corretamente todas as amostras para as duas classes.

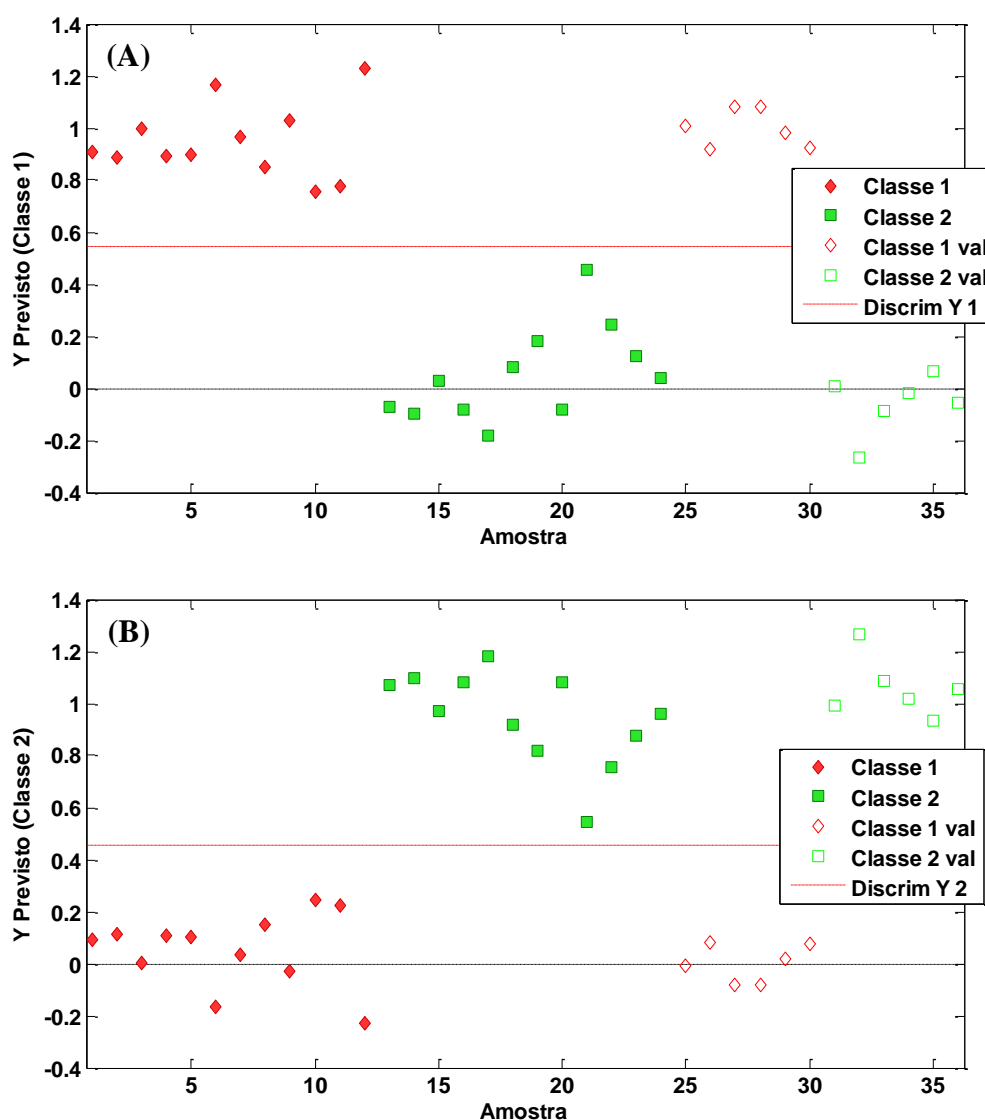
A especificidade do modelo corresponde à previsão incorreta de amostras, ou seja, indicar uma amostra de leite contaminado como sendo não contaminado, ou vice-versa. Logo, se o modelo não apresentar erros de previsão, a especificidade do modelo será igual a 1. Como neste caso nenhuma amostra de classe 1 foi prevista como sendo pertencente à classe 2, e nem da classe 2 prevista como pertencente a classe 1, a especificidade foi igual a 1.



**Figura 2** – Avaliação da presença de amostras anômalas de leite desnatado.

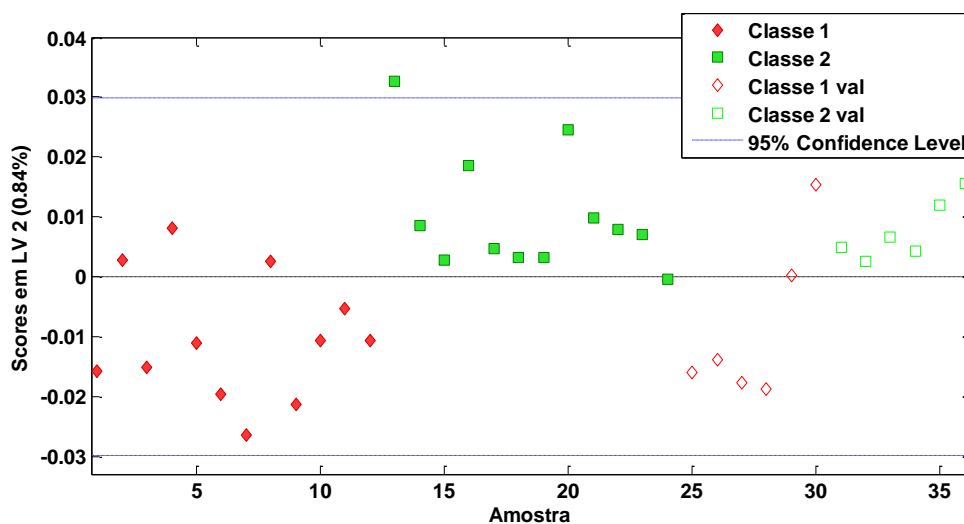
A Figura 3 A apresenta a distribuição para as amostras não contaminadas enquanto a Figura 3 B a distribuição para amostras contaminadas. As amostras

simbolizadas como “classe 1 val” indicam as amostras do conjunto de validação que não estavam contaminadas por *Salmonella* spp., enquanto que aquelas simbolizadas por “classe 2 val” representam amostras contaminadas pelo microrganismo. Assim, pode-se notar que todas as amostras foram discriminadas corretamente: nenhuma amostra que estava contaminada foi classificada como não contaminada, e vice-versa. Tanto para as amostras de leite não contaminadas quanto para as amostras contaminadas o modelo apresentou uma separação nítida e, para o modelo construído.



**Figura 3** – Desempenho em discriminação do modelo PLS-DA para amostras de leite desnatado (A) não contaminadas e (B) contaminadas com *Salmonella* spp. Classe 1 (◆): amostras não contaminadas; Classe 2 (■): amostras contaminadas; Classe 1 val (◇): amostras não contaminadas previstas pelo modelo; Classe 2 val (□): amostras contaminadas previstas pelo modelo.

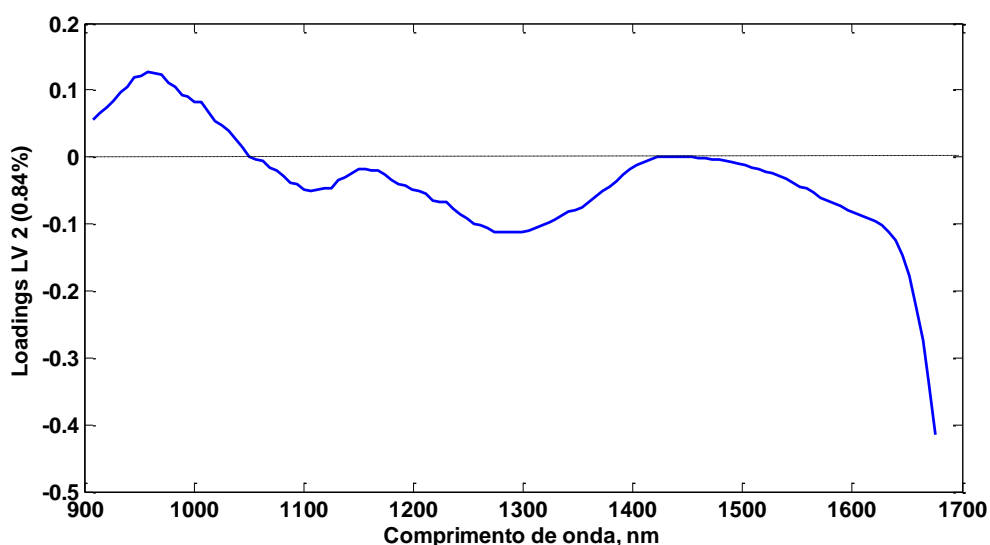
Afim de se descobrir quais regiões espectrais foram responsáveis por diferenciar as amostras contaminadas (classe 2) das não contaminadas (classe 1), avaliou-se o gráfico dos *scores*. Observou-se que a maioria das amostras contaminadas foi discriminada das amostras não contaminadas na segunda variável latente, como mostrado na Figura 4. Em seguida, verificou-se quais variáveis (*loadings*) se relacionam com as amostras separadas por *scores* positivos e negativos. Assim, foi possível notar que todas as amostras contaminadas apresentaram *scores* positivos, enquanto a maioria das amostras não contaminadas apresenta valores de *scores* negativos.



**Figura 4** – Scores das amostras de leite desnatado contaminadas e não contaminadas com *Salmonella* spp. Classe 1 (♦): amostras não contaminadas; Classe 2 (■): amostras contaminadas; Classe 1 val (◇): amostras não contaminadas previstas pelo modelo; Classe 2 val (□): amostras contaminadas previstas pelo modelo.

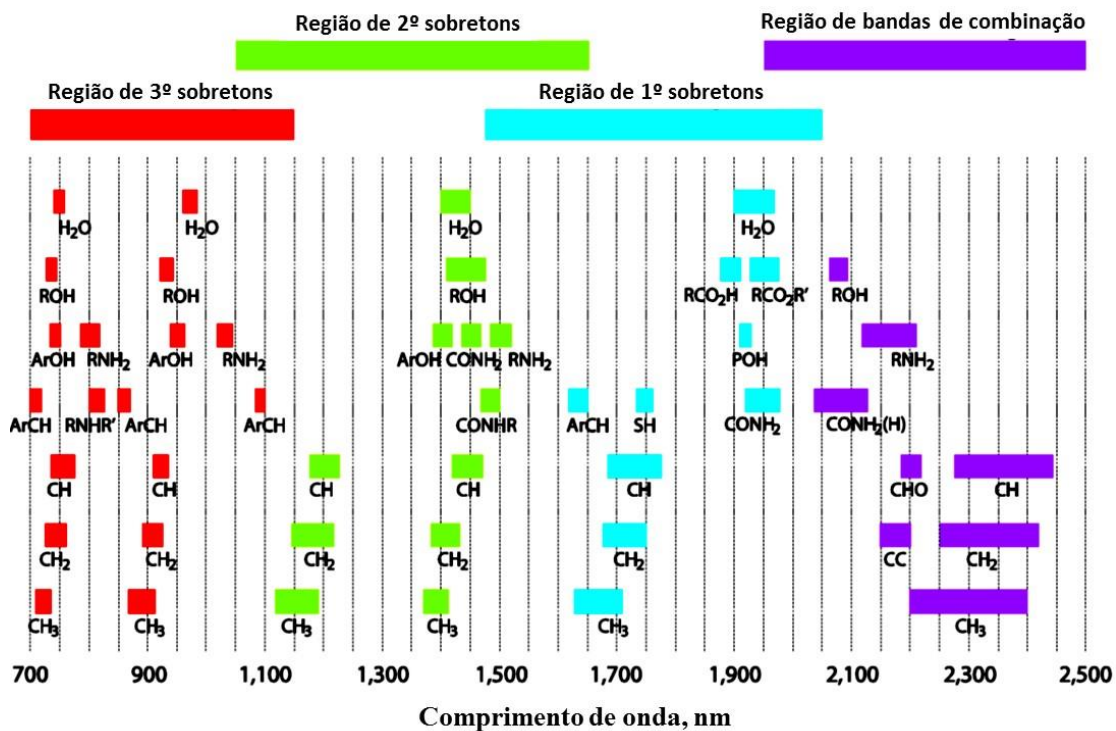
Para interpretar estes resultados é necessário observar-se quais são as variáveis (*loadings*) relacionadas com tal separação, o que pode ser visto no gráfico apresentado na Figura 5. Desta forma, sugere-se que os espectros das amostras de leite desnatado contaminadas são mais influenciados pela região espectral que vai de 900 a 1000 nm, enquanto as amostras não contaminadas se apresentam mais influenciadas principalmente pela região que vai de 1200 a 1400 nm. No entanto, como esta região do espectro não se refere a vibrações específicas, não é possível afirmar qual transformação

química o microrganismo causou no leite. No entanto, a região próxima a 1000 nm é uma região de 3° sobretons vibracionais de amins primarias, cujos sobretons secundários aparecem apenas em 1500 nm. A região de 1500 nm aparentemente não influencia significativamente as amostras com scores negativos (não contaminadas), o que sugere que a presença dos microrganismos esteja vinculada a região próxima a 1000 nm. A figura 6, adaptada do manual da Metrohm, que se fundamenta nas discussões de Stuart (STUART, 2004) sobre as vibrações na região NIR, apresenta as vibrações características na região do infravermelho próximo.



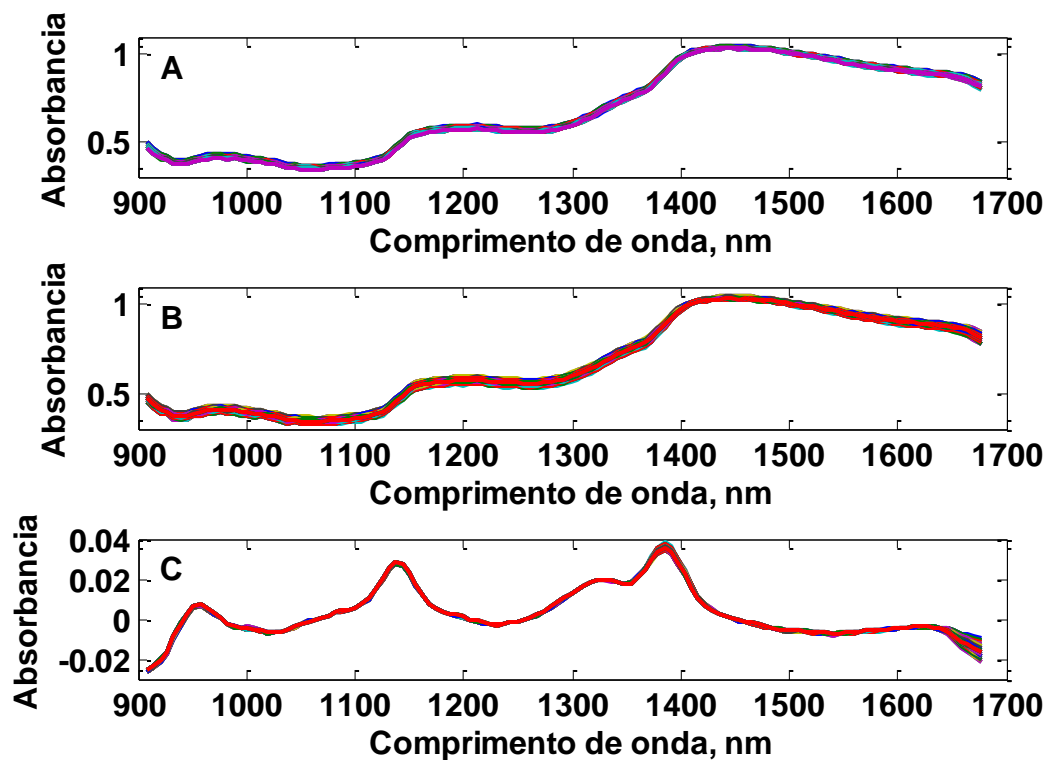
**Figura 5** – Gráfico dos *loadings* da segunda Variável Latente contra as variáveis.

Além do leite desnatado, também foram avaliadas amostras de leite integral. O procedimento adotado foi exatamente o mesmo utilizado para as amostras de leite desnatado. No entanto, por apresentarem espectros mais ruidosos que os encontrados para o leite desnatado, foi necessário um pré-processamento adicional, utilizando-se uma derivada com janela de 7 pontos. Assim, a Figura 7 traz o gráfico com os espectros das amostras de leite integral, contaminadas e não contaminadas, (A) sem pré-processamento, (B) após suavização por filtro Savitzky-Golay e (C) após derivada com janela de 7 pontos, forma da qual os espectros foram utilizados para a construção do modelo.

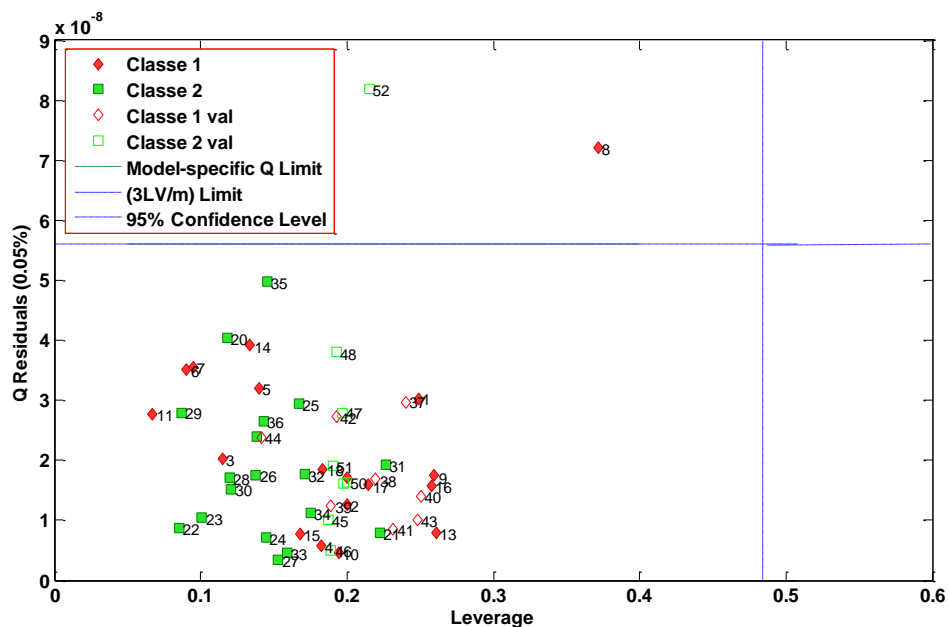


**Figura 6** – Principais bandas e posições relativas dos picos de absorções proeminentes do infravermelho próximo. (Figura adaptada de “METROHM: NIR Spectroscopy - A guide to near-infrared spectroscopic analysis of industrial manufacturing processes”).

Da mesma forma que para o leite desnatado, as amostras anômalas dos conjuntos de calibração e validação foram analisadas de acordo com o *Leverage* e os *Resíduos Q* (*Q Residuals*). Conforme ilustrado na Figura 8, não foram identificadas amostras anômalas nos conjuntos de calibração e validação já que nenhuma amostra apresentou altos valores de *Leverage* e *Q Residuals*, simultaneamente.



**Figura 7** – Espectros das amostras de leite integral (A) sem pré-processamento (B) após suavização por Savitzky-Golay e (C) após derivada com janela de 7 pontos.



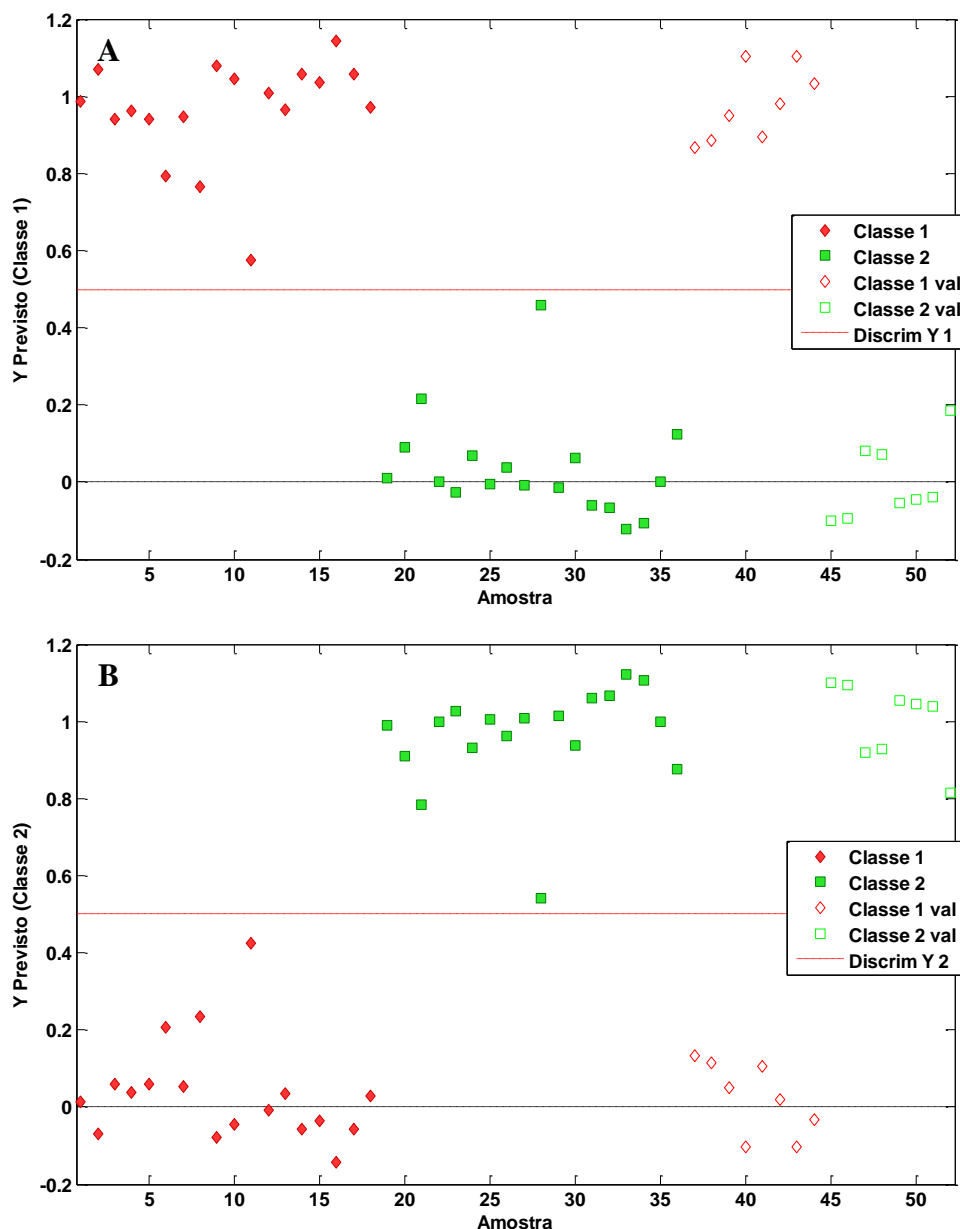
**Figura 8** – Avaliação da presença de amostras anômalas no leite integral.



O modelo PLS-DA para as amostras de leite integral apresentou valores muito próximos daqueles obtidos para as amostras de leite desnatado. No entanto, no caso do leite integral o modelo foi construído utilizando-se 6 variáveis latentes (logo, 2 a mais que para o modelo de discriminação para leites desnatados). Provavelmente, as duas variáveis latentes a mais necessárias para a construção deste modelo estão relacionadas com o fato de o leite integral apresentar ainda mais constituintes que o leite desnatado, necessitando, portanto, de 2 variáveis latentes a mais para se explicar uma quantidade de variância semelhante àquela observada para o leite desnatado. A precisão do modelo foi avaliada a partir dos valores de RMSECV (0,207), RMSEP (0,093) e  $R^2$  (0,926) sendo os valores idênticos tanto para os leites não contaminados (classe 1) quanto para os contaminados (classe 2). A sensibilidade para ambas as classes, não contaminada e contaminada, foi igual a 1, indicando que o modelo foi capaz de classificar corretamente todas as amostras para as duas classes. Assim como no caso das amostras de leite desnatado, nenhuma amostra do conjunto de validação de leite integral de amostras não contaminadas foi prevista como sendo pertencente às contaminadas, e vice-versa. Esse resultado conduziu a especificidade para 1, tanto para a classe 1 (amostras de leite não contaminadas) quanto para a classe 2 (amostras de leite contaminadas).

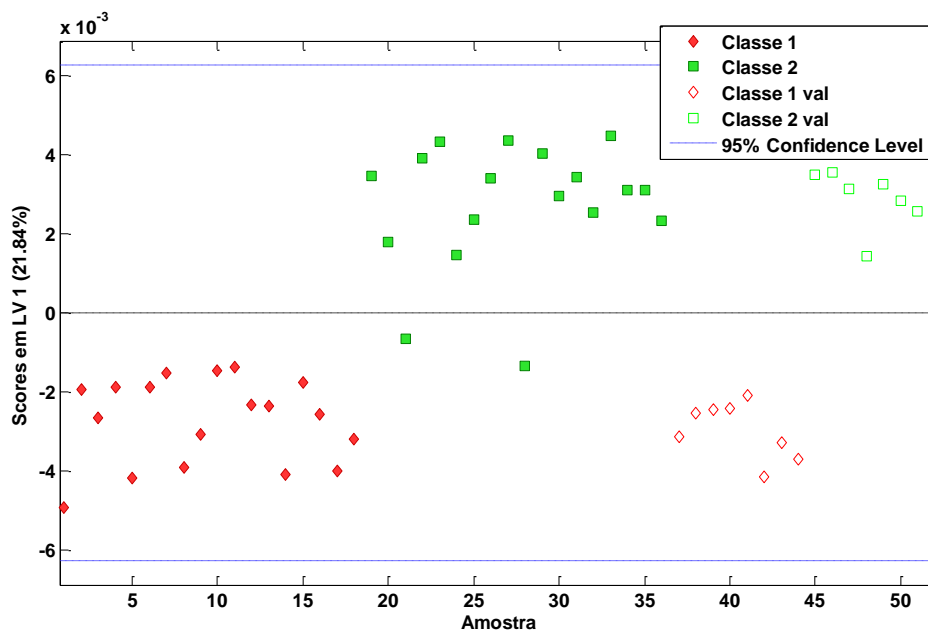
A Figura 9 (A) apresenta a discriminação para as amostras não contaminadas enquanto a Figura 9 (B) traz a discriminação para amostras contaminadas. Portanto, da mesma forma que observado para o leite desnatado, pode-se notar que todas as amostras foram discriminadas corretamente, já que nenhuma amostra da classe 1 foi prevista como pertencente à classe 2, e vice-versa.

A classificação de uma das amostras de cada classe se apresentou muito próxima ao limite de separação entre as classes. Este fato sugere que as amostras devem, por algum motivo, apresentar muita semelhança. Ao checar as amostras originais, foi possível notar que estas eram amostras pertencentes a mesma marca, e apresentavam como característica diferencial o enriquecimento com minerais e vitaminas. Logo, nota-se que a diferenciação entre as classes foi determinada pela influência da presença de *Salmonella* spp., o que é o principal objetivo deste estudo.



**Figura 9** – Desempenho em discriminação do modelo PLS-DA para amostras de leite integral (A) não contaminadas e (B) contaminadas com *Salmonella* spp. Classe 1 (◆): amostras não contaminadas; Classe 2 (■): amostras contaminadas; Classe 1 val (◇): amostras não contaminadas previstas pelo modelo; Classe 2 val (□): amostras contaminadas previstas pelo modelo.

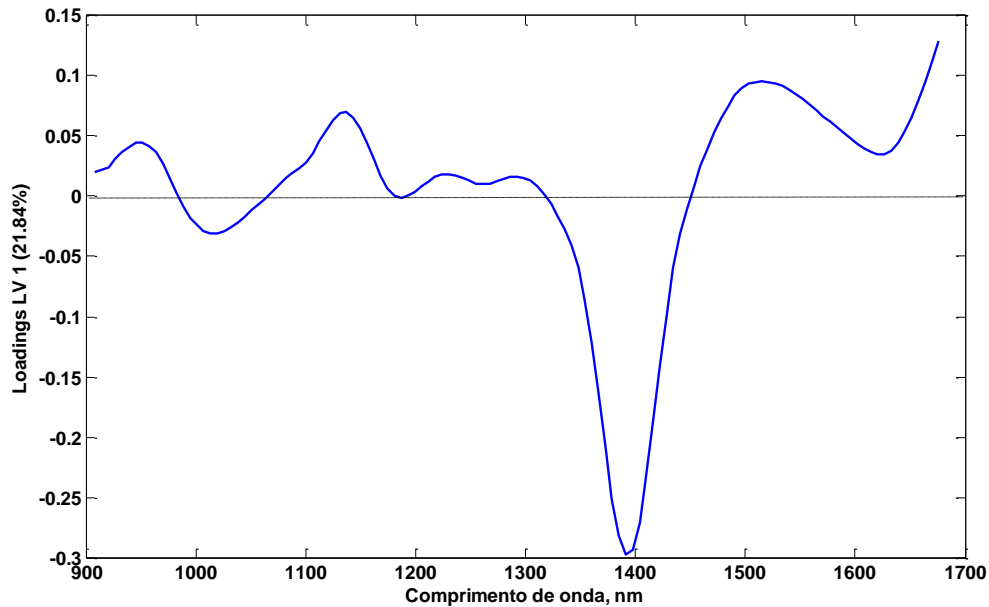
A avaliação das variáveis que influenciaram na discriminação entre as amostras mostrou que a primeira variável latente separa a maioria das amostras de leite integral contaminadas das não contaminadas, como pode ser visto na Figura 10.



**Figura 10** – Scores das amostras de leite integral contaminadas e não contaminadas com contaminadas com *Salmonella* spp. Classe 1 (◆): amostras não contaminadas; Classe 2 (■): amostras contaminadas; Classe 1 val (◇): amostras não contaminadas previstas pelo modelo; Classe 2 val (□): amostras contaminadas previstas pelo modelo.

Para interpretação das regiões espectrais responsáveis pela diferenciação das amostras, observou-se o gráfico dos *loadings*, como mostrado na Figura 11. Assim, avaliando-se a Figura 10, nota-se que as amostras que apresentam valores positivos de *scores* são referentes as amostras de leite contaminados (classe 2). Portanto, pode-se afirmar que as amostras de leite integral contaminadas sofrem maior influência das variáveis que estão entre 900 – 950 nm, próximas a 1100 nm e a 1500 nm. Como visto na figura 6, que traz informações sobre as principais bandas e posições relativas dos picos de absorções proeminentes do infravermelho próximo, sugere-se que as amostras da classe 2 (contaminadas com *Salmonella* spp.) apresentem vibrações nas regiões de sobretons terciários de Ar – OH (930 nm), H<sub>2</sub>O (940 nm) e R – OH (950 nm), sobretons secundários de carbono saturado (1130 nm), além de influências evidentes das regiões de grupamentos de nitrogênio, ligados a aminoácidos e proteínas (região situada próxima a 1500 nm). Por outro lado, as amostras de leite não contaminadas apresentam influência de uma banda próxima a 1400 nm, atribuída principalmente a vibrações de Ar

– OH (1390 nm), H<sub>2</sub>O (aproximadamente 1380 nm) e R – OH (1400 nm), além de bandas de vibração de Carbono – Hidrogênio para carbonos insaturados.



**Figura 11** – Gráfico dos *loadings* da primeira Variável Latente contra as variáveis.

Os resultados sugerem que os modelos obtidos apresentam potencial para serem implementados na indústria, trazendo diferencial tecnológico significativo, principalmente no que diz respeito a velocidade das análises quando comparadas as medidas padrão, as quais costumam demorar dias, enquanto aquelas por NIR podem ser realizadas online ou at-line.

## 6. CONCLUSÕES

A espectroscopia na região do infravermelho associada aos métodos quimiométricos pode ser utilizada para a construção de modelos matemáticos de discriminação entre amostras contaminadas e não contaminadas por *Salmonella* spp.

Dentre as vantagens de se aplicar a metodologia sugerida neste trabalho, a principal está relacionada com a redução significativa do tempo de manuseio para determinar a presença do microrganismo, que deixa de necessitar de dias para se chegar em uma resposta para ser realizada em segundos. Obviamente, a viabilização da aplicação desta metodologia em escala industrial envolveria a etapa de alocação deste modelo matemático em “nuvem computacional”, o que é atualmente uma tendência para todos os métodos de análise.

O método proposto, além da capacidade de realizar medidas rápidas (na ordem de segundos), tem potencial para ser utilizado para monitoramento em tempo real pois não necessita de preparo da amostra, ou seja, da adição de nenhum reagente químico, além de dispensar especialização do operador, promovendo respostas suficientemente adequadas e próximas das ideais para execução no dia a dia.

## **7. PERSPECTIVAS FUTURAS**

Pretende-se determinar o limite de detecção e avaliar amostras de leites com mais microrganismos estruturalmente semelhantes a *Salmonella* spp., como a *Escherichia coli*, afim de se descobrir a capacidade de discriminação entre as amostras. Além disso, será importante analisar a influência dos caldos nutrientes utilizados na contaminação, afim de saber se o modelo está discriminando pela presença do microrganismo ou pela presença do caldo.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCOCER, I.; OLIVEIRA, C. R. M. **Detecção rápida de *Salmonella enteritidis* em alimentos por ensaio imunoenzimático ELISA.** Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2003, v. 23, n. 3, p. 401 – 408.

ALMEIDA, M.R.; CORREA, D.N.; ROCHA, W.F.C.; SCAFI, F.J.O.; POPPI, R.J. **Discrimination between authentic and counterfeit banknotes using Raman spectroscopy and PLS-DA with uncertainty estimation.** Microchemical Journal, 2013, vol. 109, pag. 170-177.

BARKER, M.; RAYENS, W. **Partial least square for discrimination.** Journal of Chemometrics, 2003, vol. 17, pag. 166-173.

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

BASSBASI, M.; DE LUCA, M.; IOELE, G.; OUSSAMA, A.; RAGNO, G. **Prediction of the geographical origin of butters by partial least square discriminant analysis (PLS-DA) applied to infrared spectroscopy (FTIR) data.** Journal of Food Composition and Analysis. 2014.

BERMÚDEZ-AGUIRRE, D.; CORRADINI, M. G. **Inactivation kinetics of *Salmonella* spp. Under thermal and emerging treatments: A review.** Food Research International, 2012, pag. 700-712.

BRERETON, R.G. **Introduction to multivariate calibration in analytical chemistry.** Analyst. 2000, vol.125, pag. 2125-2154.

CEITIL, L. O. **Process analytical technology in active pharmaceutical ingredients production.** Dissertação para a obtenção do Grau de Doutor em Engenharia Química. Lisboa: Universidade Técnica de Lisboa – Instituto Superior Técnico, 2007.

CHATTOPADHYAY, S.; KAUR, A.; JAIN, S.; SINGH, H. **Sensitive detection of food-borne pathogen *Salmonella* by modified PAN fibers-immunoassay.** Biosensors and Bioelectronics, 2013, pag. 274-280.

COLTRO, W.K.T. ; FERREIRA, M.M.C. ; MACEDO, F.A.F.; OLIVEIRA, C.O.; VISENTAINER, J.V.; SOUZA, N.E.; MATSUSHITA, M. **Correlation of animal diet and fatty acid content in young goat meat by gas chromatography and chemometrics.** Meat Science, 2005, vol. 71, pag. 358-363.

CLSI. M07-A10. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved standard.** 10<sup>a</sup>ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, 2015.

EL-SHAROUD, W. M. **Developing a time and effort-effective, highly sensitive TaqMan probe-based real-time polymerase chain reaction protocol for the detection of *Salmonella* in milk, yoghurt, and cheese.** International Dairy Journal, 2015, pag. 62-66.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY - Explains zoonotic diseases: Food-borne zoonotic diseases. **The community summary report on trends and sources of zoonoses and zoonotic agents in the European Union in 2007.** 2009, 978-92-9199-384-0, Corporate Publication, pag. 1-4 Catalogue n°: TM-32-11-873-EM-C.

FANG., T. J. **Bacterial contamination of ready-to-eat foods: Concern for human toxicity.** Reviews in Food and Nutrition Toxicity, 2005, pag. 143-171.

FERNANDES, R.S.; COSTA, F.S.L.; VALDERRAMA, P.; MARÇO, P.H.; LIMA, K.M.G.; **Non-destructive detection of adulterated tablets of glibenclamide using NIR and solid-phase fluorescence spectroscopy and chemometric methods.** Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2012, pag. 85-90.

FERREIRA, M.M.C. **QUIMIOMETRIA – Conceitos, Métodos e Aplicações.** Editora: UNICAMP. Ed. 1<sup>a</sup>, 2015.

GELADI, P.; KOWALSKI, B. R. **Partial Least-Squares Regression - A Tutorial.** Analytica Chimica Acta, 1986, vol.185, pag. 1-17.

GONÇALVES, R.P.; MARÇO, P.H.; VALDERRAMA, P. **Thermal edible oil evaluation by UV-Vis spectroscopy and chemometrics.** Food Chemistry, 2014, pag. 83-86.



JONG, S. **SIMPLS: An alternative approach to partial least squares regression.** Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 1993, vol.18, n.3, pag. 251-263.

KRAMER, H.; LOUI, C.; CLAVIJO, R.I.; RILEY, L.W.; LU, S. **Survival characteristics of *Salmonella entérica serovar Enteritidis* in chicken egg albumen.** Epidemiology and Infection, 2011, pag. 967-976.

KENNARD, R.W.; STONE, L.A. **Computer Aided Design of Experiments, Technometrics,** 1969, vol.11, n.1, pag.137-148.

WING-ON KWAN, B.R. KOWALSKI; **Correlation of objective chemical measurements and subjective sensory evaluations. wines of vitis vinifera variety 'pinot noir' from france and the united states.** Analytica Chimica Acta; 1980, vol. 122: 2, pag. 215-222.

LIMA, L.A.S. **Estudo da potencialidade da espectroscopia de infravermelho próximo na análise de cabelo utilizando ferramentas quimiométricas para diferenciar fumantes de não fumantes.** 50 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, RN, 2013.

LIU, X.; VAN ESPEN, P.; ADAMS, F.; SHOU HE YAN, M. **Vanbelle; Classificatin of chinese tea samples according to origin and quality by principal component techniques.** Analytica Chimica Acta, 1987, vol. 200, pag. 421-430.

MALORNY, B.; LOFSTROM, C.; WAGNER, M.; KRAMER, N.; HOOFFAR, J. **Enumeration of *Salmonella* bactéria in food and feed samples by real-time PCR for quantitative microbial risk assessment.** Applied and Environmental Microbiology, 2008, vol. 74, pag. 1299-1304.

MALTAS, D.C.; KWOK, K.; WANG, P.; TAYLOR, L.S.; BEM-AMOTZ, D. **Rapid classification of pharmaceutical ingredients with Raman spectroscopy using compressive detection strategy with PLS-DA multivariate filters.** Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2013, vol. 80, pag. 63-38.

MARÇO, P. H. **Estudo da influência da radiação e pH no comportamento cinético de antocianinas de plantas do gênero *hibiscos* por métodos quimiométricos.** Tese – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, Campinas-SP, 2009.

MARTINS, A.M.C.V.; ROSSI-JR, O.D.; SALOTTI, B.M.; BÜRGER, K.P.; CORTEZ, A.L.L.; CARDOZO, M.V. **Efeito do processamento UAT (Ultra Alta Temperatura) sobre as características físico-químicas do leite.** Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas- SP, 2008, vol. 28, n. 2.

METROHM. NIR Spectroscopy. **A guide to near-infrared spectroscopic analysis of industrial manufacturing processes.** Herisau, Suíça: Metrohm, 2013.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, ABASTECIMENTO E REFORMA AGRÁRIA; Portaria nº 146, de 07/03/1996.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa nº 51, de 18/09/2002. **Diário Oficial da União**, Brasília. 2002, Seção I, pag. 13-22.

MORAIS, C.S.; LEME, L.M.; VALDERRAMA, P.; MARÇO, P.H.. **Multivariate calibration applied in UV-Vis spectroscopy data to determine total acidity in wines.** Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos. 2015, vol. 6, pag. 70 - 79.

NAES, T.; ISAKSSON, T.; FEARN, T.; DAVIES, T. **Multivariate Calibration and Classification**, NIR Publication: Chischester, 2002.

OTTO, M. **Chemometrics, Statistics and Computer Application in Analytical Chemistry**, Wiley-VCH: Weinheim, 1999.

PAGANOTTI, R.S.N. **Desenvolvimento de métodos analíticos para a análise de própolis utilizando técnicas espectrométricas e análise multivariada.** Tese de Doutorado - UFMG, 2013.

PASTORE, T.C.M.; BRAGA, J.W.B.; CORADIN, V.T.R.; MAGALHÃES, W.L.E.; OKINO, E.Y.A.; CAMARGOS, J.A.A.; MUÑIZ, G.I.B.; BRESSAN, O.A.; DAVRIEUX, F. **Near infrared spectroscopy (NIRS) as a potential tool for**

**monitoring trade of similar Woods: Discrimination of true mahogany, cedar, andiroba, and curupixá.** *Holzforschung*, 2011, vol. 65, pag. 73-80.

PATACA, L.C.M. **Análises de mel e própolis utilizando métodos Quimiométricos de Classificação e Calibração.** Tese de Doutorado - UNICAMP, 2006.

PEDRO, A.M.K.; FERREIRA, M.M.C.; **Simultaneously Calibrating Solids, Sugars and Acidity of Tomato Products Using PLS2 and NIR Spectroscopy.** *Analytica Chimica Acta*, 2007, vol. 595, pag. 221-227.

PEERBHAY, K.Y.; MUTANGA, O.; ISMAIL, R. **Commercial tree species discrimination using airborne AISA eagle hyperspectral imagery and partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) in KwaZulu-Natal, South Africa.** *Journal of Photogrammetry and Remote Sensing*, 2013, vol. 79, pag. 19-28.

PINTO, M.S.; PIRES, A.C.S.; SANT'ANA, H.M.P.; SOARES, N.F.F.; CARVALHO, A.F. **Influence of multilayer packaging and microfiltration process on milk shelf life.** *Food Packaging and Shelf life*, 2014, vol. 1, pag. 151-159.

REGULAMENTO DE INSPEÇÃO INDUSTRIAL E SANITÁRIA DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL. Aprovado pelo decreto nº 30.691, de 29/03/52, alterado pelos decretos nº 1.255, de 25/06/62, nº 1.236, de 02/09/94, nº 1.812, de 08/02/96 e nº 2.244, de 04/06/97. **Diário Oficial da União**, Brasília. 1997.

REZENDE, N.C.M.; ROSSI JÚNIOR, O.D.; NADER FILHO, A.; AMARAL, L.A. **Ocorrência de microrganismos indicadores em leite UHT (“ultra-high temperature”) integral.** *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, 2000, vol. 7, n. 1, pag. 58-60.

SANTOS, D.A.; MARÇO, P.H.; VALDERRAMA, P. **Multi-product calibration: preliminary studies to determine quality parameters in industrialized juices based on ultraviolet spectroscopy.** *Brazilian Journal Of Analytical Chemistry*, 2013, vol. 12, pag. 495-498.

SANTOS, P.M.; PEREIRA-FILHO, E.R.; RODRIGUEZ-SAONA, L.E. **Rapid detection and quantification of milk adulteration using infrared microspectroscopy and chemometrics analysis.** Food Chemistry, 2013, vol. 138, n. 1, pag. 19-24.

SAVITZKY, A.; GOLAY, M.J.E. **Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures.** Analytical Chemistry, 1964, vol. 36, n.8, pp 1627–1639,.

SILVA, V.A.G.; TALHAVINI, M.; PEIXOTO, I.C.F.; ZACCA, J.J.; MALDANER, A.O.; BRAGA, J.W.B.; **Non-destructive identification of different types and brands of blue pen inks in cursive handwriting by visible spectroscopy and PLS-DA for forensic analysis.** Microchemical Journal, 2014, vol. 116, pag. 235-243.

VALDERRAMA, P. **Calibração multivariada de primeira e segunda ordem e figuras de mérito na quantificação de enantiômeros por espectroscopia.** Tese – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química. Campinas, SP, 2009.

VALDERRAMA, P.; BRAGA, J.W.B.; POPPI, R.J. **Validation of multivariate calibration models in the determination of sugar cane quality parameters by near infrared spectroscopy.** Journal of the Brazilian Chemical Society, 2007, vol. 18, n.2, pag. 259- 266.

VALDERRAMA, P.; BRAGA, J.W.B.; POPPI, R.J. **Estado da Arte de figuras de mérito em calibração multivariada.** Química Nova, 2009, vol.32, n.5, pag. 1278-1287.

VALDERRAMA, P.; ROMERO, A.L.; IMAMURA, P.M.; MAGALHAES, I.R.S.; BONATO, P.S.; POPPI, R.J.; **Quantification of chlorpheniramine maleate enantiomers by ultraviolet spectroscopy and chemometric methods.** Analytical & Bioanalytical Chemistry, 2010, vol. 397, n. 1, pag. 181-188.

VALDERRAMA, P.; BRAGA, J.W.B.; POPPI, R. J.; **Variable selection, outlier detection, and figures of merit in a partial least-squares regression multivariate calibration model. A case study for the determination of quality parameters in the alcohol industry by near-infrared spectroscopy.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, pag. 8331-8338.

VIDAL-MARTINS, A.M.C.; ROSSI-JR, O.D.; REZENDE-LAGO, N.C. **Microrganismos heterotróficos mesófilos e bactérias do grupo do *Bacillus cereus* em leite integral submetido a ultra alta temperatura.** Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. Belo Horizonte-MG, 2005, vol. 57, n. 3.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J. T. M.; GEURTS, T. J. **Dairy Science and Technology** (2<sup>nd</sup> ed.). New York: CRC, 2006.

WOLD, S. **Principal Component Analysis: Tutorial.** Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 1987, vol.2, pag. 37-52.

KILLNER, M. **Paralelos entre métodos fenotípicos, imunológicos e genotípicos para detecção rápida de *Salmonella* spp em matrizes alimentares sem contaminação experimental: avaliação em condições reais e simultâneas de uso.** Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 2008.

GERMANO, P.M.L.; GERMANDO, M.I.S. **Higiene e vigilância sanitaria de alimentos.** 2 ed. São Paulo: Varela, 2003, pag. 665.

SOTELO, F.F. **Aplicação da espectroscopia de infravermelho próximo na caracterização de petróleo: simulação de uma unidade de destilação atmosférica.** Tese (Doutorado) – Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2006, pag. 154.