

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
MESTRADO EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

THAYNÁ KAWANA DE MARCHI DOS SANTOS

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ALTERNATIVO E DE SUPORTE À
DECISÃO NA AVALIAÇÃO DE *SALMONELLA* SPP. EM FARINHAS DE CARNES E
OSSOS BOVINOS UTILIZANDO ESPECTROSCOPIA NIR E CARTA DE
CONTROLE MULTIVARIADA BASEADA NA PCA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

CAMPO MOURÃO

2023

THAYNÁ KAWANA DE MARCHI DOS SANTOS

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ALTERNATIVO E DE SUPORTE À
DECISÃO NA AVALIAÇÃO DE *SALMONELLA* SPP. EM FARINHAS DE CARNES E
OSSOS BOVINOS UTILIZANDO ESPECTROSCOPIA NIR E CARTA DE
CONTROLE MULTIVARIADA BASEADA NA PCA**

**Alternative and decision support method through NIR spectroscopy and multivariate
control charts based on PCA in the evaluation of *Salmonella* spp. in bovine meat and
bone meal**

Dissertação apresentada como requisito para
obtenção do título de Mestre em Tecnologia de
Alimentos, do Programa de Pós-Graduação em
Tecnologia de Alimentos, da Universidade
Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus
Campo Mourão.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Patrícia Valderrama.

Coorientador: Prof. Dr. Odinei Hess Gonçalves.

CAMPO MOURÃO

2023



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

Esta licença permite que outros remixem, adaptem e criem a partir do trabalho para fins não comerciais, desde que atribuam o devido crédito e que licenciem as novas criações sob termos idênticos. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



THAYNA KAWANA DE MARCHI DOS SANTOS

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ALTERNATIVO E DE SUPORTE À DECISÃO NA AVALIAÇÃO DE SALMONELLA SPP EM FARINHAS DE CARNES E OSSOS BOVINOS UTILIZANDO ESPECTROSCÓPIA NIR E CARTA DE CONTROLE MULTIVARIADA BASEADA NA PCA

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestra Em Tecnologia De Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Tecnologia De Alimentos.

Data de aprovação: 11 de Maio de 2023

Dra. Aline Coqueiro, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dra. Juliana Luna Bilheiro Peixoto, Doutorado - Centro Universitário Ingá

Luciana Furlaneto Maia, - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 11/05/2023.

DEDICATÓRIA

*Dedico esse trabalho em especial à minha mãe **Leila Cristina da Silva**, à minha irmã **Ellenn Cristie de Marchi** e ao meu esposo **Luiz Jorge dos Santos Junior**, por todo o apoio e incentivo.*

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à Deus, que me presenteia todos os dias com a energia da vida, que me dá forças e coragem para atingir os meus objetivos.

Agradeço à toda minha família, sobretudo meus pais Leila e Paulo, por sempre acreditarem em mim, mesmo quando eu já duvidava de mim mesma durante essa caminhada, à minha irmã Ellenn por me incentivar nas horas difíceis e por estar presente. Ao meu esposo pelo companheirismo de todas as horas e ânimo nos meus dias.

À vocês, minha família, sou eternamente grata por tudo que sou, por tudo que consegui conquistar e pela felicidade que tenho.

Minha gratidão especial à Prof. Dra. Patrícia Valderrama, minha orientadora e, sobretudo, uma querida e grande amiga, pela pessoa e profissional. Obrigada por sua dedicação e principalmente, por sempre ter acreditado e depositado sua confiança em mim ao longo de todos esses anos de trabalho. Sem sua orientação, apoio e confiança neste trabalho, nada disso seria possível.

Aos amigos que conheci ao longo desses anos, pelo apoio e companheirismo.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos (PPGTA) e aos professores da banca, por aceitarem o convite para contribuir com a pesquisa.

Ao Sr Florindo e Tiago por me dar à oportunidade de fazer parte na empresa e me disponibilizar tempo hábil para as atividades do programa de pós-graduação, além das análises e recursos necessários para este estudo.

Às colegas de trabalho Dayane, Adriana, Simone e Rafaela que durante todo o período me ajudaram nas rotinas do laboratório e me incentivaram na execução do projeto.

À UTFPR, por fornecer o programa para a realização deste trabalho.

Agradeço à todos que de alguma forma me ajudaram com palavras de incentivo e motivação em uma etapa tão importante da minha vida.

RESUMO

A farinha de carne e ossos (FCO) bovina é o principal subproduto do abate dos frigoríficos. FCO é resultante da cocção dos resíduos sendo reaproveitado na fabricação de rações para aves, suínos, cães, gatos e peixes por apresentar vantagens nutricionais e econômicas nas formulações. Entretanto, a segurança dos alimentos e a inocuidade dos microrganismos patogênicos, como a *Salmonella* spp., deve ser garantida. Considerando que as indústrias produtoras de FCO já empregam normalmente a espectroscopia na região do infravermelho próximo (NIR) para controle de qualidade de outros parâmetros, a avaliação de *Salmonella* spp., poderia ser incorporada nas rotinas laboratoriais por NIR. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de um método de suporte à decisão e orientadas por dados de espectroscopia NIR e cartas de controle multivariadas baseadas na análise de componentes principais (PCA) na avaliação da *Salmonella* spp. em FCO. Um total de 350 amostras de FCO não contaminadas foram empregadas na etapa de treinamento e estabelecimento da carta de controle. Amostras não contaminadas de FCO foram utilizadas em uma etapa de validação externa (55 amostras), enquanto 413 amostras contaminadas por *Salmonella* spp. foram preditas pela carta controle. Os resultados alcançados mostram que o modelo de cartas de controle multivariadas baseadas na PCA foi eficiente para a distinção de amostras de farinha de carne e ossos bovina ausente ou presente para a *Salmonella* spp. Dessa forma, a espectroscopia NIR associada com a ferramenta quimiométrica de carta de controle baseado no PCA pode ser um método alternativo e de suporte à decisão industrial podendo servir como uma ferramenta de triagem inicial e reduzindo o número de análises através do método convencional.

Palavras-chave: farinha de carne e ossos; quimiometria; PCA; NIR; *Salmonella* spp.

ABSTRACT

Bovine meat and bone meal (MBM) is the main slaughtering by-product in slaughterhouses. MBM is the result of cooking residues and is reused in the manufacture of feed for poultry, pigs, dogs, cats, and fish, as it presents nutritional and economic advantages in the formulations. However, the safety of food and the harmlessness of pathogenic microorganisms, such as *Salmonella* spp., must be guaranteed. Considering that the MBM industries already normally employ spectroscopy in the near-infrared region (NIR) for quality control of other parameters, the evaluation of *Salmonella* spp. could be incorporated into laboratory routines by NIR. Thus, the objective of this work was the development of a decision support method guided by NIR spectroscopy data and multivariate control charts based on principal component analysis (PCA) in the evaluation of *Salmonella* spp. in MBM. A total of 350 uncontaminated MBM samples were used in the training step and control chart establishment. Uncontaminated samples of MBM were used in an external validation step (55 samples), while 413 samples contaminated by *Salmonella* were predicted by the control chart. The achieved results show that the multivariate control charts based on the PCA were efficient for the distinction of bovine meat and bone meal samples absent or present for *Salmonella* spp. Thus, NIR spectroscopy associated with the PCA-based control chart chemometric tool can be an alternative and a decision support method that can serve as an initial screening tool and reduce the number of analyses through the conventional method.

Keywords: meat and bone meal; chemometrics; PCA; NIR; *Salmonella* spp.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fluxograma de produção de farinha de carne e ossos bovinos.....13
- Figura 2.** Esquema ilustrando o funcionamento da carta de controle baseada na PCA.....16
- Figura 3.** Espectros NIR. (A) Espectros brutos. (B) Espectros após MSC. (—) Amostras contaminadas. (—) Amostras não-contaminadas.....19
- Figura 4.** Avaliação de *outliers* (A) Amostras não contaminadas. (B) Amostras contaminadas. (●) Amostras contaminadas. (●) Amostras não-contaminadas.....20
- Figura 5.** Carta de controle baseada na PCA. (●) amostras não-contaminadas no treinamento. (○) amostras não-contaminadas na validação. (●) amostras contaminadas.....21

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 OBJETIVOS	12
2.1 Objetivo Geral	12
2.2 Objetivos Específicos	12
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
3.1 Farinha de carne e ossos bovinos	13
3.2 <i>Salmonella</i>	14
3.3 Cartas de controle multivariada baseadas na PCA.....	16
4 METODOLOGIA.....	18
4.1 Amostras.....	18
4.2 Métodos	18
4.2.1 Preparo das amostras.....	18
4.2.2 Coleta dos espectros.....	18
4.2.2 Análise de referência para detecção de <i>Salmonella</i> spp.....	19
4.2.3 Software.....	19
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
6 CONCLUSÃO.....	24
REFERÊNCIAS	25

1 INTRODUÇÃO

A qualidade e exigências dos produtos comercializados para a alimentação animal vem crescendo a cada dia, a farinha de carne e ossos bovina (FCO) é um ingrediente para a fabricação de rações apresentando vantagens nutricionais, sendo economicamente viáveis e eficientes na formulação de rações para animais (NUNES *et al.*, 2005; BRASIL, 2008; OLIVEIRA e BORGES; 2018).

De acordo com a Associação Brasileira de Reciclagem Animal (ABRA, 2022) a FCO é considerada o principal subproduto dos frigoríficos, sendo reaproveitado na fabricação da ração. SOUZA (2017) refere-se ao alto valor nutritivo, fonte de proteína de alta qualidade e digestibilidade, resultante da cocção dos resíduos do abate de bovinos, constituídos por ossos, cárneos, aparas de carnes, gorduras e vísceras, que sofrem uma série de transformações física e química em processos que envolvem aquecimento, desidratação, separação e moagem (BARROS e LICCO, 2007).

O uso de farinhas e gorduras de origens animais e de qualidade, não afeta a segurança de animais e seres humanos, contribuindo significativamente para a sustentabilidade. No entanto, devem ser atendidos os padrões de qualidade preconizados por órgãos reguladores (BELLAVAR, 2018). No Brasil, esses padrões de qualidade são estabelecidos pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) e, dentre as considerações, as análises microbiológicas devem ser realizadas com periodicidade para garantir a ausência de *Salmonella* spp. no produto acabado (BRASIL, 2007).

Atualmente as análises de *Salmonella* spp. apresentam limitações como o elevado tempo de análise, diversos equipamentos (calibrados anualmente por empresas credenciadas), reagentes de alto custo e o descarte correto dos resíduos químicos nocivos ao meio ambiente. As análises por *swab* podem ter limitações, como pouca superfície de contato e a demanda no tempo de execução, estimado entre 22-30 horas. Esse tipo de avaliação é realizado atualmente na indústria pelo kit de análises RapidChek® SELECT™ *Salmonella*, da Romer Labs® (ROMER LABS, 2022). Este método é aprovado pela *Association of Official Agricultural Chemists* (AOAC INTERNATIONAL), coleção que abrange métodos químicos e microbiológicos e padrões de consenso disponíveis, sob número de certificação 080601 (ROMER LABS, 2023; AOAC, 2023).

Na consolidação kit RapidChek SELECT na avaliação de *Salmonella* foram testadas 113 cepas de *Salmonella* representando 18 sorogrupos e 50 cepas de bactérias não *Salmonella*

comumente encontradas em alimentos. O método detectou 111 das cepas de *Salmonella* e nenhuma das bactérias não *Salmonella*, resultando em uma sensibilidade de 98% e especificidade de 100%, sendo considerado altamente robusto e estável sob controle (4 a 25°C) e estabilidade acelerada (37 a 45°C) (MULDOON *et al.*, 2018).

Considerando que nas indústrias de produção de matéria prima para alimentação animal muitas análises já são realizadas através da espectroscopia na região do infravermelho próximo (NIR), a determinação da presença de *Salmonella* spp. poderia ser incorporada às análises de rotina industrial.

A espectroscopia NIR já foi empregada na avaliação de *Salmonella* spp. em Leite (PEREIRA, 2016) com o objetivo de construir modelos qualitativos capazes de discriminar amostras de leites contaminados ou não contaminados. Essa técnica também foi aplicada para comparar a qualidade dos alimentos em relação a análises bromatológicas (DA SILVA, 2022), podendo ser utilizado também para o controle microbiológico de alimentos, detectar adulteração de alimentos e controlar o processo de produção de mel, óleo de palma, carne de peru, farelo de soja, fermentação de glicose e outros (CARAMÊS *et al.*, 2019).

Nesse sentido, a espectroscopia NIR tem se mostrado uma alternativa aos métodos convencionais de análise, principalmente por permitir uma análise ampla de constituintes dos alimentos, conservar as amostras, possuir maior agilidade e conferir alta precisão. Além disso, não utiliza reagentes químicos e, portanto, destaca-se o baixo poder de poluição ambiental (DEEPA *et al.*, 2016). Dessa forma, é encorajador considerar a NIR para a avaliação de *Salmonella* spp. em amostras de farinha de carne e ossos bovina, visto os resultados reportados na literatura e as vantagens já apresentadas.

O emprego da espectroscopia NIR vem, normalmente, associado à quimiometria que são conjuntos de métodos matemáticos e estatísticos, aplicados com o intuito de se obter informações a partir de um conjunto de dados complexos (FERREIRA, 2015). A análise de componentes principais (PCA), é uma ferramenta não supervisionada e que podem ser utilizadas para extração de informações em matrizes alimentares (BARROS NETO *et al.*, 2006; MARÇO, 2009). Além disso, ao considerar uma estimativa de erros é possível conferir à PCA um critério de supervisão (VALDERRAMA *et al.*, 2022).

Dessa forma, oferecer uma metodologia alternativa para determinação da presença de *Salmonella* spp. em amostras de farinha de carne e ossos bovina, pode ser interessante do ponto de vista industrial no desenvolvimento de um método alternativo e de suporte à decisão

orientada por dados de espectros NIR em conjunto com cartas de controle multivariadas baseadas na PCA.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver um método analítico alternativo e de suporte à decisão para presença de *Salmonella* spp. em farinhas de carnes e ossos bovinos, baseada na espectroscopia NIR com o auxílio da ferramenta quimiométrica de cartas de controle multivariadas baseada na PCA.

2.2 Objetivos Específicos

- Obter espectros NIR das amostras de farinhas de carnes e ossos bovinas.
- Analisar amostras para *Salmonella* spp. utilizando método de referência.
- Desenvolver e validar modelos baseados em carta de controle multivariada baseada na PCA.
- Realizar a previsão utilizando amostras de farinhas de carnes e ossos bovinas contaminadas com *Salmonella* spp.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Farinha de carne e ossos bovinos

As farinhas de origem animal são produtos produzidos através do processamento de material animal que não serve para o consumo humano e que seria descartado (PIVATTO et al. 2020).

Existem algumas variedades de farinha de origem animal, tais como farinha de carnes e ossos (FCO), farinha de vísceras (FV), farinha de penas (FP), farinha de sangue (FS) e farinha de peixe (FP). Sua originalidade torna-se dependentemente do tipo de matéria-prima (subproduto) utilizada para o seu processamento (BELLAYER, 2005).

A FCO é resultante do abate de bovinos, cujos subprodutos (ossos e tecidos) são coletados de estabelecimentos frigoríficos, e submetidos a cocção. Esse processamento ocorre em fábricas especializadas (PIVATTO et al. 2020), seguindo as normas de produção estabelecidas pelo MAPA (BRASIL, 2008), em que não se admite – e são consideradas adulterações – a adição de pelos, cascos, chifres, sangue e outras matérias primas estranhas, inclusive de microrganismos patogênicos.

As matérias primas devam ser processadas dentro de 24 horas após o abate dos animais (SILVA, 2009). O processo de produção consiste basicamente na retirada dos excessos de água dos resíduos não comestíveis e, se necessário, devido ao tamanho das peças, picar, triturar e levá-los aos digestores para cocção.

A cocção é uma etapa obrigatória na produção de FCO pois é proibido que os resíduos sejam destinados a alimentação animal sem passarem pelo tratamento térmico, com a função de eliminar microrganismos patogênicos (CARDOZO 2011).

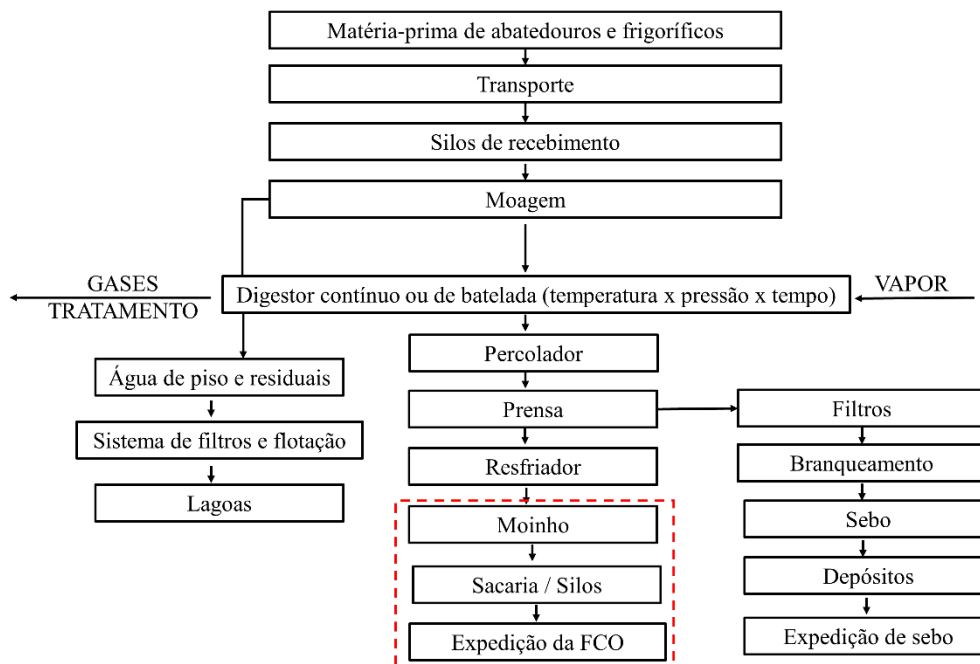
O aquecimento para FCO segue o estabelecido pela IN 34, na qual a temperatura não pode ser inferior a 133°C, durante pelo menos 20 minutos, sem interrupção, a uma pressão absoluta não inferior a 3 bar, produzida por vapor saturado (BRASIL, 2008).

Em seguida, a gordura é drenada, prensada ou centrifugada e o resíduo sólido moído na forma de farinha, com especificações de granulometria variáveis (CARDOZO 2011). A granulometria é baseada através da porcentagem de retenção em peneiras apresentando diferentes medidas de malhas. A granulometria mais utilizada é de 5% de retenção em peneira com malha de 2mm (BELLAYER, 2002).

Vale destacar, que a empresa que forneceu as amostras para este trabalho realiza somente a parte do processo destacada pela linha pontilhada em vermelho no fluxograma para

a produção da FCO (Figura 1). Além disso, através do fluxograma observa-se que existem várias etapas em que o risco de contaminação ou proliferação microbiana é eminente, podendo interferir na qualidade do produto final. Dentre os principais microorganismos patogênicos nas FCO destacam-se o gênero *Salmonella*.

Figura 1. Fluxograma de produção de farinha de carne e ossos bovinos.



Fonte: Adaptado de Bellaver (2002) e Cardozo (2011).

3.2 *Salmonella*

O gênero *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae* e são classificados como bacilos gram-negativos anaeróbios facultativos, não formadores de endósporos e a maioria se move por meio de flagelos peritríquios. As colônias são oxidase-negativas e fermentadoras de glicose, com formação de ácido e gás. As *Salmonella* spp. se multiplicam em temperaturas entre 7 °C e 49,5 °C, podendo sobreviver em alimentos sob refrigeração e congelamento, sendo 35°C a 37 °C a temperatura ótima para o seu desenvolvimento. (LOUREIRO *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2018; SHEN *et al.*, 2020)

A presença de bactérias patogênicas capazes de causar doenças transmitidas por alimentos continua sendo uma preocupação significativa de saúde pública para os consumidores

em todo o mundo, com consequências econômicas para os produtores e para a indústria (FURTADO *et al.*, 2022).

No Brasil, segundo dados do Boletim Epidemiológico 32, da Secretaria de Vigilância em Saúde (2020), de 2007 a 2015 o país apresenta uma média de 13.717 caso de surto por ano. Desses, 2.243 (34,37%) surtos, no período analisado, o agente etiológico foi identificado, sendo causados principalmente por *Salmonella* (25,17%), *Escherichia coli* (23,42%) e *Staphylococcus* (18,61%). Entre os surtos causados por *Salmonella*, 67,5% são devidos a *Salmonella enteritidis* e 7,5% por *Salmonella typhi*. Entretanto, verifica-se uma evolução decrescente no número de surtos causados por *Salmonella*, o qual respondia em 2007 por 47,18% dos surtos notificados e por 15,81% em 2015 (SAÚDE, 2020).

A salmonelose bovina acomete principalmente bezerros entre 2 e 6 semanas de idade, com morbidade e mortalidade relativamente altas. Sua veiculação está associada à ingestão de água e alimentos, dificultando as ações de profilaxia e controle. Os bovinos infectados podem eliminar a bactéria através das fezes e outras secreções, como o leite, tornando-se importantes fontes de contaminação de alimentos e propagação da infecção aos rebanhos e ao homem (RADOSTITS *et al.* 2007; PAIXÃO *et al.* 2016)

A farinha de carne e ossos bovina pode se apresentar contaminada por *Salmonella* spp., e a umidade é considerada um dos fatores mais importantes para a multiplicação microbiana. Entretanto, a ação térmica à qual os subprodutos animais são submetidos na produção de farinhas elimina grande parte desta contaminação bacteriana, entre outros microrganismos patogênicos (LABOISSIÈRE, 2008). Por outro lado, nas fases de pós-produção, como embalagem, armazenamento, estocagem e distribuição, pode ocorrer a recontaminação das FCO pelos mesmos microrganismos (PIVATTO *et al.* 2020).

Para evitar esses episódios, empregam-se as Boas Práticas de Fabricação (BPF), além de todo o controle do processo conforme a IN nº34/2008 do MAPA (BRASIL, 2008). O principal objetivo das BPF consiste em propor procedimentos e ações que visam prevenir ou reduzir a contaminação no produto final, incluindo higienização e desinfecção de instalações e equipamentos e higienização dos manipuladores (BRASIL, 2008; PIVATTO *et al.* 2020).

Por outro lado, ambientes úmidos e quentes de comedouros e silos de armazenagem podem favorecer a proliferação de *Salmonella* spp. nos produtos acabados produzidos a partir da FCO. Dessa forma, para que o risco de contaminação seja controlado é adicionado na formulação da FCO antioxidantes, aditivos acidificantes e conservantes indicado contra a contaminação bacteriana, principalmente a *Salmonella* spp. (BELLAYER, 2002).

3.3 Cartas de controle multivariada baseadas na PCA

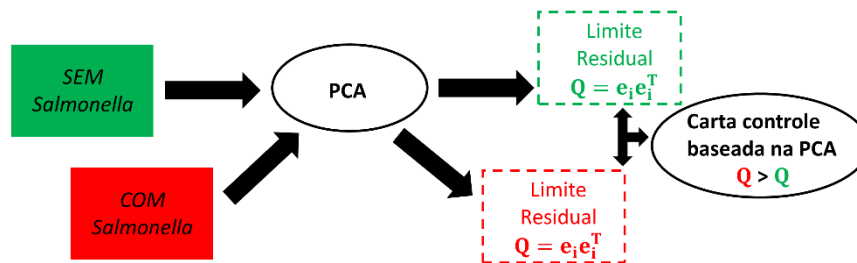
A PCA é uma ferramenta de reconhecimento de padrões não supervisionada capaz de transformar uma tabela de dados experimentais em gráficos informativos acerca da similaridade entre as amostras e as respectivas variáveis responsáveis por isso (BEEBE, PELL, SEASHOLTZ, 1998). Para desenvolver a análise de componentes principais a primeira etapa é a formação de uma matriz \mathbf{X} ($I \times J$, em que I se refere ao número de amostras e J corresponde a variáveis), que em seguida se faz a decomposição dessa matriz em duas matrizes, uma de *scores* \mathbf{T} e uma matriz de *loadings* \mathbf{P} , e \mathbf{E} que corresponde a uma matriz de erros, conforme a Equação 1 (FERREIRA, 2015).

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP}^T + \mathbf{E} \quad \text{Equação (1)}$$

O conjunto de *scores* e *loadings* é denominado de Componentes Principais (CPs). Os *scores* expressam a relação entre as amostras na nova base vetorial, enquanto os *loadings* mostram a relação entre as variáveis (FERREIRA, 2015).

A análise por PCA permite a obtenção de parâmetros que podem ser utilizados para construção de cartas de controle. O valor residual Q (Q Residuals) mede a falta de ajuste em um modelo pré-estabelecido, caso em que é indicativo de quanto a amostra está sendo explicada pelo modelo criado. Nesse sentido, as cartas de controle são baseadas em um conjunto de treinamento que consiste apenas em amostras autênticas (nesse caso as negativas para *Salmonella* spp.), que definirá os limites normais dos resíduos. Por outro lado, as amostras anômalas ou adulteradas (positiva para *Salmonella* spp.) podem ser detectadas por meio de valores residuais mais elevados quando comparadas às amostras autênticas (CARAMÊS *et al.*, 2019), ou seja, as amostras positivas para *Salmonella* spp. provavelmente terão valor residual maior que as amostras negativas para *Salmonella* spp. Um esquema para ilustrar o funcionamento da carta de controle multivariada baseada na PCA é apresentado na Figura 2.

Figura 2. Esquema ilustrando o funcionamento da carta de controle baseada na PCA.



Fonte: Autoria própria.

Para determinar o valor de ‘Q Residuals’ é medido a diferença entre uma amostra e sua projeção nos ‘k’ componentes principais retidos no modelo. A Equação 2 mostra como este parâmetro é estimado para a *i*-ésima amostra em **X** (x_i) como a soma dos quadrados de cada amostra (linha) da matriz residual **E** (VALDERRAMA *et al.*, 2022):

$$Q_{i=} e_i e_i^T = x_i(I - P_k P_k^T)x_i^T \quad \text{Equação (2)}$$

em que: e_i é a *i*-ésima linha de **E**, **I** é uma matriz identidade, P_k é a matriz de *loadings* nas ‘k’ componentes principais retidas no modelo PCA.

Aplicações de cartas de controle multivariada baseada no valor de ‘Q Residuals’ da PCA são reportados por Valderrama *et al.*, (2021) que utilizaram a cromatografia líquida de alta eficiência e carta de controle baseada na PCA para distinguir amostras de suco de uva orgânico e não orgânico. O modelo, construído com três PCs, representou 96,61% da variância explicada no conjunto de dados relativo às amostras orgânicas, e os resultados mostraram discriminação eficiente entre amostras orgânicas e não orgânicas com 99% de confiança.

Por outro lado, empregando a espectroscopia NIR, Lobato *et al.* (2018) aplicaram carta de controle baseada na PCA para detectar presença de adulteração em polpa de açaí liofilizada. Os adulterantes da polpa de açaí foram suco de uva, polpa de beterraba, maltodextrina, amido de mandioca e amido de milho.

Caramês, Alamar e Pallone (2019), utilizaram espectroscopias NIR e na região do infravermelho médio (MIR) associadas à carta de controle baseada nos resíduos Q da PCA para detectar e distinguir polpa de açaí autêntica da adulterada, os autores utilizaram 3 PCs e conseguiram uma separação eficiente entre as amostras autênticas e adulteradas.

Oliveira (2021), empregou espectroscopia na região do ultravioleta e visível associada a cartas de controle multivariada por PCA para avaliar autenticidade de alecrim orgânico. O modelo com 2 CPs explicou 96,40% da variância das amostras orgânicas e foi eficiente na distinção de amostras de alecrim não-orgânicos.

Até o momento, não foram encontrados trabalhos utilizando a espectroscopia NIR em conjunto com carta de controle multivariada por PCA para a avaliação de *Salmonella* spp.

4 METODOLOGIA

4.1 Amostras

Foram utilizadas 784 amostras de farinhas de carne e ossos bovina fornecidas por uma empresa que produz farinha de carne e ossos bovina localizada no estado do Paraná. As amostras foram coletadas durante os anos de 2020 a 2022.

4.2 Métodos

4.2.1 Preparo das amostras

As amostras que chegavam à indústria passavam pelo processo de moagem e no laboratório eram homogeneizadas e reduzidas em moinho de lâminas (Grinder Machine GM4500S1), do tipo articulado, tensão 110 V, com potência de 5.000 W e capacidade de 4,5 kg. As amostras foram moídas até a obtenção de no máximo 5% da amostra na peneira de abertura de 1 mm.

4.2.2 Coleta dos espectros

Os espectros NIR foram adquiridos, a partir das amostras sólidas e com a granulometria padronizada, em equipamento *FOSS Nirs Systems Pharma*, Modelo *Smart Probe Analyzer 5.000*.

4.2.2 Análise de referência para detecção de *Salmonella* spp.

Para detecção de *Salmonella* spp. nas amostras de farinha de carne e ossos bovino utilizou-se o kit RapidChek® SELECT™ *Salmonella* Food System (Romer Labs), sendo composto por materiais como Rapidchek SELECT meio primário, Rapidchek SELECT meio secundário e Rapidchek suplemento.

Primeiramente prepara-se o meio primário pela adição de 4,5 g do meio primário Rapidchek SELECT em 225 mL de água destilada.

Em saco estéril preparou-se a amostra enriquecida, composta por 25 g da FCO, o conteúdo preparado de meio primário, e 2,5 mL de suplemento Rapidchek SELECT. A amostra ficou em estufa a 42° C pelo tempo de 16 a 22 horas.

O meio secundário foi preparado, em micro tubo de ensaio, adicionando-se 0,074 g do meio secundário Rapidchek SELECT em 1 mL de água destilada. Adicionou-se 0,1 mL do sobrenadante da amostra enriquecida ao micro tubo de ensaio contendo o meio secundário e incubou-se por 6 a 8 horas a 42° C.

Decorrido o tempo necessário, a fita detectora de *Salmonella* spp. foi inserida no micro tubo de ensaio e aguardou-se o tempo de 10 minutos para a conclusão (uma linha significando negatividade de *Salmonella* spp. e duas linhas positivo para *Salmonella* spp).

4.2.3 Software

Os espectros NIR foram processados com o auxílio do *software* MATLAB R2007B e ferramentas do pacote computacional *PLS-Toolbox* 5.2.

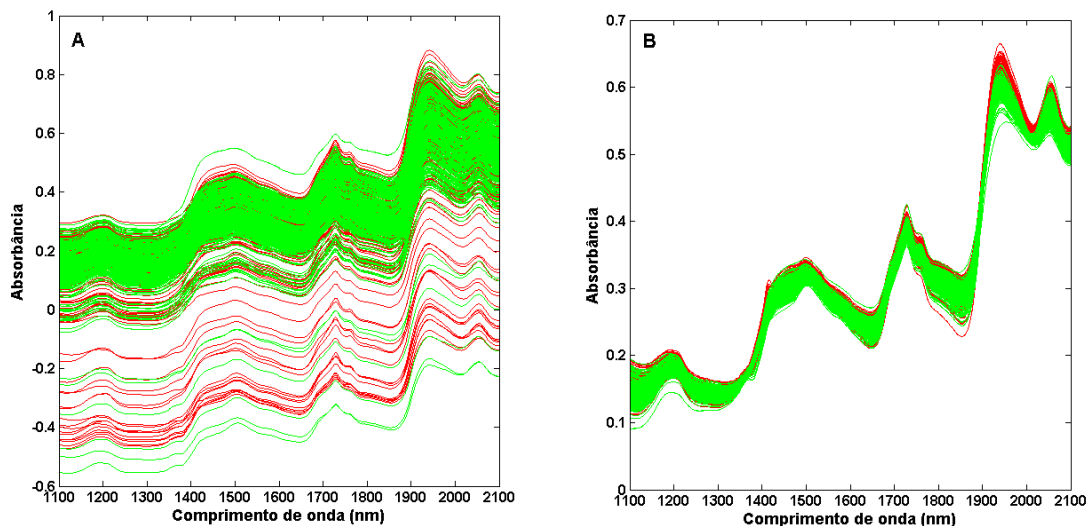
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras foram avaliadas pelo método de referência para a comprovação com relação à contaminação por *Salmonella* spp. Um total de 423 estavam com contaminação positiva por *Salmonella* spp. e 361 amostras apresentavam contaminação negativa por *Salmonella* spp. Todas as amostras avaliadas tiveram o espectro NIR adquirido.

A Figura 3 mostra os espectros NIR para as amostras de farinha de carne e ossos bovino. Observa-se uma grande variação sistemática nos espectros das amostras o que leva a variações de linha de base. Portanto, os espectros foram pré-processados com o objetivo de remover matematicamente fontes de variações indesejáveis que não serão removidas naturalmente durante a análise dos dados e que podem influenciar os resultados finais.

O pré-processamento utilizado neste caso foi a correção do espalhamento multiplicativo (MSC) que remove variação no espectro causado por espalhamento de luz pelas amostras, corrigindo efeitos de espalhamento de luz em espectroscopia por refletância devido aos diferentes tamanhos e formas das partículas (ISAKSSON E NÆS, 1988).

Figura 3. Espectros NIR. (A) Espectros brutos. (B) Espectros após MSC. (—) Amostras contaminadas. (—) Amostras não-contaminadas.



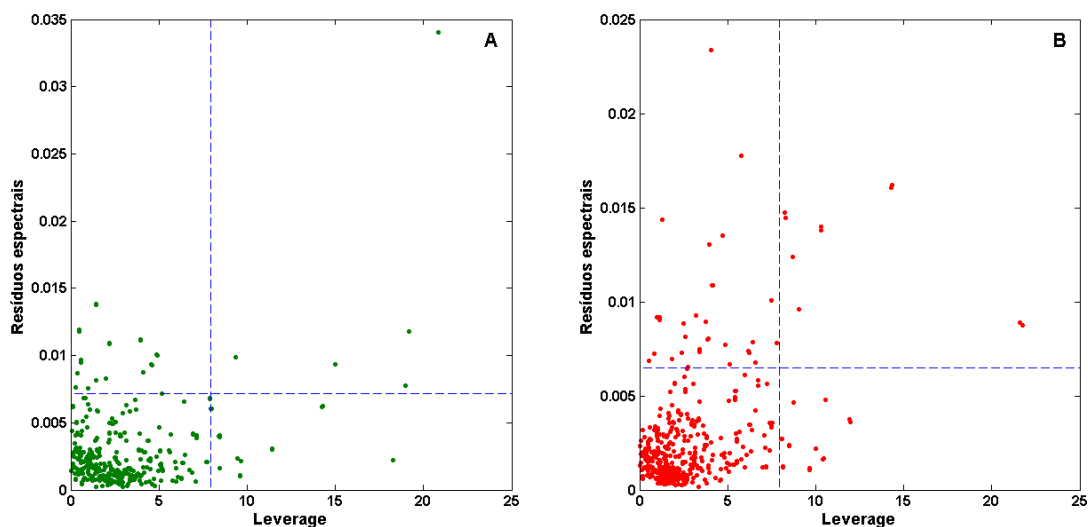
Fonte: Autoria própria.

Os espectros NIR mostram uma evolução similar para as amostras contaminadas e não-contaminadas. Embora a intensidade de reflectância pareça ser, na maioria dos casos, superior para as amostras contaminadas, por apresentar um comportamento bastante similar é difícil inferir sobre a contaminação por *Salmonella* spp. apenas pela inspeção visual do espectro. Dessa forma, a aplicação de uma ferramenta quimiométrica adequada permitirá um suporte à decisão para presença de *Salmonella* spp. em farinhas de carne e ossos bovinos baseada na espectroscopia NIR.

O primeiro passo consistiu em realizar uma avaliação para a presença de amostras anômalas (*outliers*). Os *outliers* são amostras que apresentam um comportamento muito diferente em um conjunto de dados. De acordo com a Figura 4, as amostras que encontram-se no quadrante superior direito são consideradas como *outliers* pois apresentam, simultaneamente, altos valores de resíduo espectral e *leverage*.

O *leverage* representa o quanto uma amostra está distante da média das demais amostras do conjunto de dados e é estimado com base nos scores para o conjunto de dados em relação aos scores de cada amostra em particular. Por outro lado, os resíduos espectrais são calculados a partir do desvio padrão dos espectros em relação ao desvio padrão de cada amostra do conjunto de dados (VALDERRAMA, 2009).

Figura 4. Avaliação de *outliers* (A) Amostras não contaminadas. (B) Amostras contaminadas. (●) Amostras contaminadas. (●) Amostras não-contaminadas.



Fonte: Autoria própria.

A análise dos *outliers* evidenciou 6 amostras não contaminadas como *outliers*, resultando em 355 amostras não contaminadas. Para as amostras contaminadas, um total de 10 amostras foram identificadas como *outliers*, restando 413 amostras contaminadas.

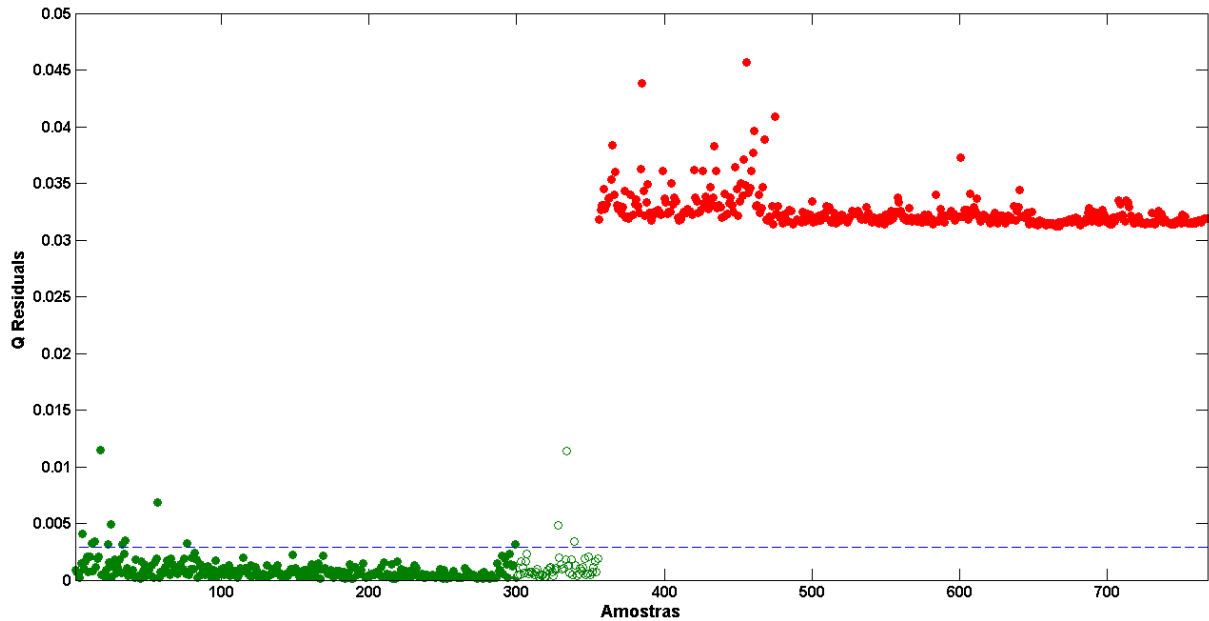
Os *outliers* foram removidos dos conjuntos de dados, e o conjunto de amostras não contaminadas foi separado, através do algoritmo kenston (KENNARD, STONE, 1969), em um conjunto de treinamento (300 amostras) e validação externa (55 amostras).

Para implementar a carta de controle multivariada baseada na PCA é necessário construir um modelo PCA, e estimar os resíduos Q, usando apenas amostras não-contaminadas no conjunto de treinamento. Nesse caso, a PCA foi aplicada aos espectros das amostras não contaminadas centrados na média e um total de 5 componentes principais, capturou 97,80% da variância dos dados.

Considerando que a PCA é uma ferramenta exploratória, e que, portanto, não permite fazer previsões futuras, uma forma de agregar essa possibilidade de previsões à PCA é utilizando os resíduos Q para o estabelecimento de cartas de controle multivariada.

A carta de controle obtida (Figura 5) foi eficiente para discriminar as amostras contaminadas das não-contaminadas com 99% de confiança, sendo que apenas 3 amostras não-contaminadas no conjunto de validação externa foram previstas na classe das amostras contaminadas.

Figura 5. Carta de controle baseada na PCA. (●) amostras não-contaminadas no treinamento. (○) amostras não-contaminadas na validação. (●) amostras contaminadas.



Fonte: Autoria própria.

A presença de amostras contaminadas no conjunto de dados experimental é identificada pelos altos valores residuais encontrados para essas amostras. Dessa forma, dados espectrais têm apresentado bons resultados na detecção de informações químicas necessárias para fins de adulteração, contaminação e fraude (LOBATO et al., 2018; CARAMÊS, ALAMAR e PALLONE, 2019; OLIVEIRA, 2021), podendo funcionar como um procedimento inicial de *screening* direcionando somente algumas amostras (mais duvidosas) para a análise por método de referência.

Os resultados obtidos na avaliação de farinha de carnes e ossos através da espectroscopia NIR, aliada à carta de controle multivariada por PCA, abre novas possibilidades no desenvolvimento de métodos alternativos e de suporte à decisão para presença de *Salmonella* spp. na indústria de alimentos, com destaque para vantagens como redução no tempo das análises e de custos com reagentes, bem como a não geração de resíduos tóxicos.

6 CONCLUSÃO

A partir da realização desse estudo foi possível concluir que a espectroscopia NIR associada à carta de controle multivariada baseada na PCA possibilita a distinção de amostras de farinhas de carne e osso bovino, contaminadas e não contaminadas com *Salmonella* spp.

A proposta apresenta vantagens como a rapidez, mínimo preparo de amostra e custo relativamente baixo e é uma alternativa eficiente aos métodos tradicionais na avaliação de *Salmonella* spp.

Os métodos podem ser estendidos para outras matrizes alimentares e aplicado em tomada rápida de decisão na indústria e órgãos certificadores de alimentos.

REFERÊNCIAS

ABRA (Associação Brasileira de Reciclagem Animal). **Farinha de carne e osso de bovinos**. Produtos. Disponível em:

<https://abra.ind.br/farinhas/#:~:text=A%20Farinha%20de%20Carne%20e%20Osso%20de%20Bovino%20%C3%A9%20usada,serem%20mais%20econ%C3%B4micas%20e%20palat%C3%A1veis>. Acesso em: 26 abr. 2022.

AOAC® INTERNACIONAL (Associação dos Químicos Agrícolas Oficiais). **Padrões e métodos científicos**. Rockville, Maryland, 2023. Disponível em:

<https://www.aoac.org/scientific-solutions/>. Acesso em: 15 fev. 2023.

BARROS, F. D.; LICCO, E. A. A reciclagem de resíduos de origem animal: Uma questão ambiental. **Revista Nacional da Carne**, v. 3, p. 166-171, 2007.

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.

BEEBE, K. R.; PELL, R. J.; SEASHOLTZ, M. B.; **Chemometrics: a practical guide**, Wiley: Weinheim, 1998.

BELLAVER, C. A qualidade dos ingredientes e dos itens importantes na produção de rações. **Revista A Lavoura**. p.13-15. 2002.

BELLAVER, C. Resíduos de abatedouros: qualidade e destino. **Congress LPN**. Miami, 25 de Outubro, 2018.

BELLAVER, C. Uso de resíduos de origem animal na alimentação de frangos de corte. **III SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA**. 4, 2002, Chapecó, SC. 22p.

BERCHIERI JUNIOR, A.; MACARI, M. **Doenças das aves**, Ed. 2, FACTA, Campinas – SP, 2000. p. 333-338.

BRASIL. Instrução Normativa nº 4, de 23 de fevereiro de 2007. Aprova o Regulamento Técnico sobre as Condições Higiênico-Sanitárias e de boas práticas de fabricação para estabelecimentos fabricantes de produtos destinados à Alimentação Animal e o Roteiro de Inspeção. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 01 mar. 2007. Seção 1, p. 5. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/alimentacao-animal/arquivos-alimentacao-animal/legislacao/instrucao-normativa-no-4-de-23-de-fevereiro-de-2007.pdf/view> Acesso em: 24 maio 2022

BRASIL. Instrução Normativa nº 34, de 28 de Maio de 2008. Aprovar o Regulamento Técnico da Inspeção Higiênico Sanitária e Tecnológica do Processamento de Resíduos de Animais e o Modelo de Documento de Transporte de Resíduos Animais. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 29 de maio de 2008, 12p. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos->

pecuarios/alimentacao-animal/arquivos-alimentacao-animal/legislacao/instrucao-normativa-no-34-de-28-de-maio-de-2008.pdf/view Acesso em: 26 maio 2022

CARAMÊS, E. T. S.; ALAMAR, P.D.; PALLONE J. A. L. Detection and identification of açai pulp adulteration by NIR and MIR as an alternative technique: Control charts and classification models. **Food Research International**, v. 123, p. 704-711, 2019.

DA SILVA, D. A. Z.; CASTILHA, L. D. **Avaliação qualitativa da farinha de carne e ossos por metodologias laboratoriais em comparação à espectroscopia do infravermelho próximo (NIRS)**. 2022. Trabalho de conclusão de curso de graduação em Zootecnia, Universidade Estadual do Paraná, Maringá, 2022.

DEEPA, C.; HEBBAR, H. U. Effect of high-temperature short-time ‘micronization’ of grains on product quality and cooking characteristics. **Food engineering reviews**, v. 8, n. 2, p. 201-213, 2016.

FERREIRA, M.M.C. **Quimiometria: conceitos, métodos e aplicações [online]**. Campinas, SP: Editora da Unicamp, 2015, 493 p. ISBN: 978-85-268-1471-4. Available from DOI: 10.7476/9788526814714.

FURTADO R.; COELHO A.; MORAIS M.; LEITÃO A. L.; SARAIVA M.; CORREIAL C. B.; BATISTA R. Comparison of ISO 6579–1, VIDAS Easy SLM, and SureFast® *Salmonella* ONE Real-time PCR, for *Salmonella* Detection in Different Groups of Foodstuffs. **Food Analytical Methods**, (2022) 15:276–284 Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12161-021-02114-0>.

GOMES, A. M.; LOBATO, F.C.F.; MARTINS, N.R.S.; ASSIS, R.A. Genotipificação de *Clostridium perfringens* isolados de frangos de corte através da PCR múltipla. **Ciência Rural**, Santa Maria, p. 1943 – 1947, v.38, n.7 Oct. 2008.

ISAKSSON, T.; NÆS, T. The Effect of Multiplicative Scatter Correction (MSC) and Linearity Improvement in NIR Spectroscopy. **Applied Spectroscopy**, v. 42, n. 7, p. 1273-1284, 1988.

KENNARD, R. W.; STONE L.A. **Computer aided desing of experiments Technometrics**. 1969, 11, 1, 137-148.

LABOISSIÈRE, M. **Farinhas de resíduos de abatedouros avícolas em diferentes graus de processamento em rações pré-iniciais e iniciais de frangos de corte**. 2008. 88f. Dissertação (Mestrado) – Programa De Pós-Graduação Em Ciência Animal, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2008.

LOBATO, K. B. S.; ALAMAR, P. D.; CARAMES, E. T. S.; PALLONE, J. A. L. Autenticidade da polpa de açai liofilizada por espectroscopia no infravermelho próximo. **Jornal de Engenharia de Alimentos**, v. 224, p. 105-111, 2018.

LOUREIRO, E. C. B. et al. Sorovares de *Salmonella* de origem humana identificados no Estado do Pará, Brasil, no período de 1991 a 2008. Pará: **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, 2010. <http://dx.doi.org/10.5123/S2176-62232010000100014>

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.

MULDOON, M., Li, J., SUTZKO, M., OLLSONYALLEN, A. C., e TEANEY, G., **Avaliação do RapidChek SELECT *Salmonella* para a detecção de *Salmonella* em carne moída crua, frango moído cru, enxágue de frango, ovos líquidos e peru cozido fatiado, certificação AOAC® Performance TestedSM número 080601.** Estados Unidos, Illinois, 2018.

NUNES, R.V.; POZZA, P.C.; NUNES, C.G.V.; CAMPESTRINI, E.; KÜHL, R.; ROCHA, L.D. DA; COSTA, F.G.P. Valores Energéticos de Subprodutos de Origem Animal para Aves. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.4, p.1217- 1224, 2005.

OLIVEIRA, A. R. P.; BORGES, W. S. Avaliação da importância do controle de qualidade na produção de ração animal extrusada: um estudo de caso. **Getec**, v. 7, n. 15, p. 81-88, 2018.

OLIVEIRA, V. M. A. T. **Metodologia para autenticação de alecrim e hortelã orgânicos utilizando espectroscopia UV-Vis associada a quimiometria.** Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos – Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão-Medianeira, 2021.

PAIXÃO, T. A.; PINTO, J. P. A.; SANTOS, R. L. **Enfermidades pelo gênero *Salmonella*.** In: MEGID, J.; RIBEIRO, M. G.; PAES, A. C. Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia. 1. ed. Rio de Janeiro: Roca, 2016. Cap. 45, p. 478-493.

PEREIRA, J. M. **Metodologia alternativa para detecção rápida de *Salmonella* spp. em leite via espectroscopia e quimiometria.** Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2016.

PIVATTO, L.; BORNIAATTI, T.; FASSINA P. **Controle e prevenção de contaminação por salmonella spp. no processo de produção de farinhas de origem animal de uma empresa do rio grande do sul.** Revista Destaques Acadêmicos, Lajeado, v. 12, n. 3, 2020. doi: <http://dx.doi.org/10.22410/issn.2176-3070.v12i3a2020.2700>

RADOSTITS, M. O.; GAY, C. C.; HINCHCLIFF, K. W.; CONSTABLE, P. D. **Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goast.** 10. ed. St. Louis: Elsevier, 2007. p. 896-920.

ROMER LABS. ***Salmonella* Kits de análises.** 30 de maio. 2022

Disponível em: <https://www.romerlabs.com/pt/analitos/patogenos-alimentares/salmonella/>
Acesso em: 30 maio 2022.

ROMER LABS. **Kits de teste de *Salmonella* rápidos e confiáveis.** 17 de abril. 2023

Disponível em: <https://www.romerlabs.com/en/analytes/food-pathogens/salmonella-test-kits/>
Acesso em: 17 abril 2023

SAÚDE M. Boletim Epidemiológico. **Secretaria de Vigilância em Saúde-Ministério da Saúde**, v. 51, 2020.

Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2020/boletim-epidemiologico-svs-32.pdf/view>. Acesso em: 18 abr. 2023.

SHEN, Y.; XU, L.; LI, Y. Biosensors for rapid detection of *Salmonella* in food: A review. **Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety**, v. 20, n. 1, p. 149-197, 2020.

SILVA, E. P. **Avaliação nutricional de farinhas de Visceras de aves e a utilização em rações de frango de corte**. 2009. 135 f. Dissertação (Magister Scientiae em Nutrição de Não Ruminantes) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE, 2009.

SILVA, N. F. D., MAGALHÃES, J. M. C. S., FREIRE, C., & DELERUE-MATOS, C. Electrochemical biosensors for *Salmonella*: State of the art and challenges in food safety assessment. **Biosensors and Bioelectronics**, 99, 667–682, 2018.

SOUZA, L. F. A.; SILVA, M. J. B.; SANTOS, A. B. B. R.; SCATOLIN, G. N.; CAVALHEIRO, T. R.; SOUZA, P. A.; GILIO, J. W. S.; RIBEIRO, M. R. Farinha de carne e ossos e butirato de sódio sobre o desempenho semanal de frangos de corte. **Colloquium Agrariae**, v. 13, n. 1, p. 25-32, 2017.

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, L.; DEMCZUK Jr., B.; VALDERRAMA, P.; CARASEK, E. An Eco-Friendly Proposal by Integrating Chromatographic Fingerprinting and Multivariate Control Chart in a Non-Target Analysis to Evaluate Grape Juices from Different Farming Practices. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 33, n. 4, p. 401-405, 2022.