

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS – UFMG**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS – ICEx**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**Karen Monique Nunes**

**APLICAÇÃO DE TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS VIBRACIONAIS E  
IMAGENS HIPERESPECTRAIS NA DETECÇÃO DE FRAUDES EM CARNES  
BOVINAS *IN NATURA***

Belo Horizonte

2019

UFMG / ICEx / DQ. 1.372

T. 628

**Karen Monique Nunes**

**APLICAÇÃO DE TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS VIBRACIONAIS E  
IMAGENS HIPERESPECTRAIS NA DETECÇÃO DE FRAUDES EM CARNES  
BOVINAS *IN NATURA***

**Versão Final**

Tese apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências – Química.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Martins de Sena

Coorientadora: Prf<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mariana Ramos de Almeida

Belo Horizonte

2019

Ficha Catalográfica

N92a Nunes, Karen Monique  
2019 Aplicação de técnicas espectroscópicas vibracionais  
T e imagens hiperespectrais na detecção de fraudes em  
carnes bovinas in natura[manuscrito] /Karen Monique  
Nunes. 2019.  
[xix], 132 f. : il.

Orientador: Marcelo Martins de Sena.  
Coorientadora: Mariana Ramos de Almeida

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas  
Gerais - Departamento de Química.  
Inclui bibliografia.

1. Química analítica - Teses 2. Química legal -  
Teses 3. Espectroscopia - Teses 4. Espectroscopia de  
infravermelho - Teses 5. Raman, Espectroscopia de -  
Teses 6. Quimiometria- Teses I. Sena, Marcelo Martins  
da - Orientador II. Almeida, Mariana Ramos -  
Coorientadora. III. Título

CDU 043

**"Aplicação de Técnicas Espectroscópicas Vibracionais e Imagens  
Hiperspectrais na Detecção de Fraudes em Carnes Bovinas in Natura"**

**Karen Monique Nunes**

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:



Prof. Marcelo Martins de Sena - Orientador  
UFMG



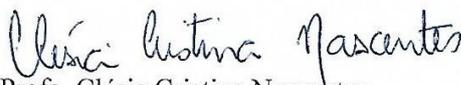
Prof. Mariana Ramos de Almeida - Coorientadora  
UFMG



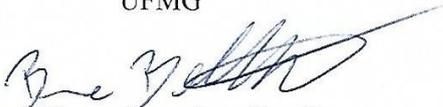
Prof. Jez Willian Batista Braga  
UnB



Rafael Scorsatto Ortiz  
Polícia Federal no Estado do Rio Grande



Prof. Clésia Cristina Nascentes  
UFMG



Prof. Bruno Gonçalves Botelho  
UFMG

Belo Horizonte, 25 de setembro de 2019.

*“Uma mente que se abre a uma nova ideia,  
jamais voltará ao seu tamanho original”.*

*Albert Einstein*

## AGRADECIMENTOS

Esta Tese é fruto de muito trabalho e grandes colaborações, portanto, agradeço...

Primeiramente a Deus por me dar forças para enfrentar e vencer todos os obstáculos do percurso.

À minha mãe, meu exemplo de mulher forte, guerreira e batalhadora que dedicou todos os seus dias para que eu pudesse ter uma boa educação e me transformar em uma mulher forte, independente, honesta, responsável e ética.

À minha família pelo convívio diário, por entender minha ausência e me apoiar emocionalmente durante o percurso.

Aos meus amigos que compreenderam minhas limitações sempre apoiando e incentivando em todas as etapas. Em especial às minhas amigas Gesliene Costa, Dayane Oliveira, Bruna Brum e Paula Lima que sempre escutaram pacientemente minhas angústias e meus medos, compartilhando meus fracassos e minhas conquistas e nunca deixando que eu me abalasse diante das dificuldades encontradas.

Às minhas amigas Juliana Terra, Jane Mara, Kele Dantas e, especialmente à Edinéia Xavier por estarem sempre presentes e disponíveis a me escutar.

À minha amiga Carla Gomes pela companhia, torcida e apoio durante todo o caminho. Agradeço à Angélica Martins por me acolher, pela colaboração durante as análises em Brasília e por disponibilizar parte do seu tempo para discutir quimiometria.

Ao Márcio Talhavini pela colaboração, preocupação, carinho e amizade.

Às minhas irmãs acadêmicas Ana Gabriella Miguita, Nathália Paiva, Luísa Pereira e Louise Mendes que dia após dia estiveram presentes com ombro amigo, conselhos e discussões.

Aos meus amigos da UFMG que compreendem a dificuldade da vida acadêmica e, por diversas vezes, abriram mão do seu tempo corrido para uma conversa amiga: Fabiana Moura, Fernanda Ferreira e Welerson Lima.

Aos meus amigos do laboratório 214, o melhor laboratório de DQ, pela companhia nos últimos 6 anos, por tornarem os dias mais leves e o percurso mais suave.

Aos meus amigos do Grupo de Química Analítica e Quimiometria aplicada a Técnicas Espectroscópicas, especialmente ao Leandro Soares pelo conhecimento e auxílio compartilhados.

Ao Prof. Dr. Marcelo Martins de Sena por me receber e me orientar, tornando possível o desenvolvimento e a conclusão deste trabalho, sempre preocupado com meu crescimento profissional e minha maturidade em relação à vida acadêmica.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mariana Ramos de Almeida pela orientação, disposição, amizade e por ser o ponto de equilíbrio durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao DPF/ SETEC pela parceria e por acreditarem neste trabalho, especialmente ao Marcus Vinícius pelo empenho e disponibilidade como profissional e, também, como amigo. Aos meus amigos Maurício Sousa, Kraemer Góes, Gyovany Gomes, Aline Marques e Cristiane Andrade pelo companheirismo e cumplicidade de sempre.

A CAPES, especialmente ao Programa Pró-Forense (Edital 25/2014), pelo custeamento pessoal da pesquisa. Agradeço, também, à Fapemig (auxílios a congressos) e ao INCT Bio pelo financiamento de parte dos insumos utilizados.

Agradeço a UFMG, minha casa desde a graduação, pela oportunidade de cursar um dos melhores cursos de pós-graduação do país. Em especial agradeço ao Departamento de Química e ao chefe Prof. Dr. Ruben Dario pelo apoio e compreensão.

Agradeço aos meus mestres desde a graduação por me mostrarem qual tipo de profissional eu quero ser: Lucienir Pains, Rochel Lago e Clésia Nascentes.

Aos meus amigos e colegas de trabalho do Laboratório de Ensino de Química Geral, pelo apoio, carinho e compreensão, em especial Isabela Toledo por me apoiar, incentivar e ter sempre uma palavra de carinho todos os dias.

A todos que participaram direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho.

## RESUMO

Grandes escândalos de fraudes em carnes têm aumentado a preocupação com a segurança alimentar. A adição de soluções de sais e de outros adulterantes, como carragena (polissacarídeo linear sulfatado obtido de algas marinhas vermelhas) e maltodextrina (polissacarídeo de rápida absorção) aumentam a capacidade de retenção de água na peça de carne, propiciando uma fraude econômica. Esta tese teve como principal objetivo a detecção e identificação de adulterações em amostras de carne bovina *in natura* empregando a análise por espectroscopia de absorção no infravermelho médio (FTIR), espectroscopia Raman e espectroscopia Raman de Imagem. Os dados de FTIR e espectroscopia Raman foram tratados usando métodos quimiométricos de classificação supervisionada (análise discriminante por mínimos quadrados parciais, PLS-DA). Foram analisadas amostras de lagarto bovino (*M. semitendinosus*). Na primeira aplicação (FT-Raman), o modelo global de previsão de amostras adulteradas de carne foi considerado um modelo ruim para a detecção sistemática da fraude em estudo com taxa de confiabilidade (TCONF) de 67%. Entretanto, a análise da purga apresentou-se satisfatória (TCONF de 80%). Intervalos de confiança foram estimados para os valores de previsão individuais utilizando o algoritmo *bootstrap*. Na segunda aplicação (FTIR), os melhores resultados foram obtidos para o modelo global de detecção de fraudes com TCONF acima de 91%. A otimização do modelo, produzindo uma versão *soft* PLS-DA, foi realizada pela detecção de *outliers* obtendo-se TCONF igual a 93% e previsão correta de 100% das amostras fraudadas com um adulterante não modelado inicialmente, maltodextrina. A detecção de *outliers* foi feita através do cálculo de limites de confiança para o valor de  $y$ /classe previsto e pela análise do gráfico  $T^2$  de Hotelling por Resíduos Q. Métodos empregando a espectroscopia Raman de imagem e o método de resolução de curvas mostraram-se eficientes para a detecção de fraudes em carnes bovinas *in natura* (terceira aplicação). Modelos de previsão individual, previsão por classe (sais e polissacarídeos) e um modelo global foram obtidos com resultados promissores.

*Palavras-chave:* Análise forense; Adulteração de carnes; PLS-DA; ATR-FTIR; FT-Raman; Imagens hiperespectrais

## ABSTRACT

Large and recent meat fraud scandals have raised concerns about food security in Brazil. The addition of salts solutions and others adulterants, such as carrageenan (a linear sulphated polysaccharide extracted from red edible seaweeds) and maltodextrin (rapidly absorbing polysaccharide) increase the meat's water-holding capacity, leading to economic fraud. The Thesis had as main objective the detection and identification of adulterations in samples of bovine meat *in natura* using mid-infrared absorption spectroscopy (FTIR) and Raman spectroscopy. Data were processed using supervised classification chemometric methods (partial least squares discriminant analysis, PLS-DA). In the first application (FT-Raman), the global model for prediction adulterated meat samples was considered a poor model for the systematic detection of fraud in study with reliability rate (RLR) equal 67%. However, the purge analysis was satisfactory (RLR = 80%). Confidence intervals were estimated for individual prediction values using the bootstrap algorithm. In the second application (FTIR), the best results were obtained for the global fraud detection model with RLR above 91%. The model optimization, producing a soft version PLS-DA, was performed by outliers detection with RLR equal to 93% and correct prediction of 100% of the fraudulent samples with an unmodulated adulterant, maltodextrin. Outliers detection was performed by calculating confidence limits for y/class predicted values and by analyzing of the Hotelling's  $T^2$  plot versus Q residues. Methods employing Raman image spectroscopy and curve resolution method were shown proved to be efficient for detecting fraud in meat *in natura* (third application). Individual prediction models, class prediction (salts and polysaccharides) and a global model were obtained with promising results.

Keywords: Forensic analysis; Meat adulteration; PLS-DA; ATR-FTIR; FT-Raman; Hyperspectral analysis.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação esquemática (a) complexo heme da mioglobina (b) hemoglobina <sup>2</sup> .....	9
Figura 2 - Representação esquemática dos estados de oxidação do íon ferro central no grupo heme da mioglobina (adaptado) <sup>2</sup> .....	9
Figura 3 - Espalhamento de Luz: (a) espalhamento inelástico (região Stokes); (b) espalhamento elástico (Rayleigh); (c) espalhamento inelástico (região anti-Stokes); (d) representação esquemática das formas de espalhamentos da radiação (imagens adaptadas) <sup>52; 53</sup> .....	17
Figura 4 - Informação em um hipercubo de uma imagem hiperespectral com um conjunto tridimensional $I(x, y, \lambda)$ . (Imagem adaptada) <sup>54</sup> .....	18
Figura 5 - Comparação entre os modos de aquisição de imagem por mapeamento utilizando a espectroscopia Raman: (a) Mapeamento pontual e (b) Mapeamento linear (ou em linha). (Imagem adaptada) <sup>57</sup> .....	19
Figura 6 - Representação da organização da matriz X a partir de dados espectroscópicos <sup>64</sup> . .....	23
Figura 7 - Diferenças entre modelos (a) discriminantes de duas classes; (b) modelagem de uma classe (one class); (c) modelagem multiclasse (multiclass). (Imagens adaptadas) <sup>63</sup> .....	24
Figura 8 - Representação do modelo (a) PLS1-DA (b) PLS2-DA <sup>64</sup> .....	28
Figura 9 - Modelo de resolução multivariada de uma matriz D. Em que l é o número de amostras com F componentes medidos em J comprimentos de onda (adaptado) <sup>91</sup> .....	36
Figura 10 - Planejamento experimental de corte da peça de lagarto bovino e injeção das soluções adulterantes em cada fração de amostra. ....	41
Figura 11 - Líquido exsudado da carne (Purga). ....	42

Figura 12 - (a) Espectrômetro FT-Raman. (b) Análise da amostra de purga em tubo Duran com espelho na parte posterior da amostra para intensificar o sinal. ....	43
Figura 13 - Espectros Raman dos padrões de tripolifosfato de sódio (azul) e carragena (vermelho) em estado sólido. ....	44
Figura 14 - Espectros Raman para amostras não adulteradas (preto) e amostras adulteradas ao nível de 5% m/v com NaCl (azul), TPFS (roxo) e Carragena (vermelho). ....	45
Figura 15- Espectros Raman para as 64 amostras de purga. Os retângulos correspondem às regiões utilizadas para a construção dos diferentes modelos de classificação testados: P1 – 3589 $\text{cm}^{-1}$ a 326 $\text{cm}^{-1}$ ; P2 – 3589 $\text{cm}^{-1}$ a 712 $\text{cm}^{-1}$ ; P3 – 3589 $\text{cm}^{-1}$ a 2736 $\text{cm}^{-1}$ e 1868 $\text{cm}^{-1}$ a 712 $\text{cm}^{-1}$ . ....	47
Figura 16 - Modelos PLS-DA construídos com espectros Raman – Região P3: (a) modelo Two class, (b) adulteração com NaCl, (c) adulteração com TPFS, (d) adulteração com Carragena. Setas indicam amostras FN e elipses indicam amostras FP. ....	51
Figura 17 - Coeficientes de regressão para modelos PLS-DA construídos com espectros Raman – Região P3: (a) modelo Two class, (b) adulteração com NaCl, (c) adulteração com TPFS, (d) adulteração com Carragena. ....	53
Figura 18 - VIP scores para modelos PLS-DA construídos com espectros Raman – Região P3: (a) modelo Two class, (b) adulteração com NaCl, (c) adulteração com TPFS, (d) adulteração com Carragena. ....	54
Figura 19 - Espectros Raman para as 165 amostras utilizadas para a construção do modelo de classificação PLS-DA. ....	55
Figura 20 - VIP scores para o modelo PLS-DA. Linha tracejada horizontal indica o threshold de 1.0. ....	56

Figura 21- Valores previstos de Y para o modelo PLS-DA. Linha pontilhada horizontal indica o limite de classificação. A linha tracejada vertical divide as amostras de treinamento e teste.....	57
Figura 22 - Estimativa de incerteza por reamostragem por bootstrap. Em destaque as barras de erro para as previsões das amostras. ....	59
Figura 23 - Espectros Raman para as 64 amostras de carne. Os retângulos vermelhos correspondem às regiões utilizadas para a construção dos modelos de classificação. ...	61
Figura 24 - Modelo PLS-DA para previsão de todas as amostras adulteradas construído com os espectros Raman.....	64
Figura 25- Coeficiente de Regressão para a previsão das amostras adulteradas.....	66
Figura 26 -VIP scores para as variáveis de Raman para a previsão das amostras adulteradas.....	66
Figura 27 (a) Espectrofotômetro de infravermelho médio FTIR Frontier com acessório de reflectância total atenuada (ATR). (b) Pequeno volume de amostra adicionada até a cobertura total da abertura do cristal. ....	72
Figura 28 - Espectros FTIR para as 174 amostras de purga. Espectros em pretos (amostras adulteradas) e espectros em vermelho (amostras não adulteradas). Retângulos vermelhos indicam a região espectral utilizada na construção dos modelos de classificação. ....	75
Figura 29 - Modelos PLS-DA para as adulterações individuais: (a) Cloreto de sódio (NaCl); (b) Tripolifosfato de sódio (TPFS); (c) Carragena (Carrag). ....	77
Figura 30 - Vetores de regressão para os modelos de classificação individual: (a) Cloreto de sódio (NaCl); (b) Tripolifosfato de sódio (TPFS); (c) Carragena (Carrag). Regiões destacadas: (I) modo amida II – 1500 $\text{cm}^{-1}$ a 1600 $\text{cm}^{-1}$ , (II) modo amida I - 1600 $\text{cm}^{-1}$ a 1700 $\text{cm}^{-1}$ , (III) estiramento de OH em água - 3000 $\text{cm}^{-1}$ -3400 $\text{cm}^{-1}$ e (IV) agregados de folhas $\beta$ de proteínas em 1235 $\text{cm}^{-1}$ .....	79

Figura 31 - VIP scores para os modelos PLS1-DA multiclasse. Em destaque as bandas características (a) 1650 $\text{cm}^{-1}$ – amida I, (b) 1540 $\text{cm}^{-1}$ – amida II, (c) 1700 $\text{cm}^{-1}$ – amida I, (d) 1080 $\text{cm}^{-1}$ – estiramentos de Co e COH, (e) 3600 $\text{cm}^{-1}$ , (f) 3180 $\text{cm}^{-1}$ – estiramento N-H de amida e estiramento OH de água, (g) 1220 $\text{cm}^{-1}$ , (h) 2930 $\text{cm}^{-1}$ – estiramento CH, (i) 1160 $\text{cm}^{-1}$ e (j) 1040 $\text{cm}^{-1}$ .....	81
Figura 32 - Modelo PLS-DA para previsão de amostras adulteradas versus amostras não adulteradas. ....	82
Figura 33 - Vetor de regressão para o modelo PLS-DA para previsão de amostras adulteradas – modelo global. Em destaque as bandas em torno de (a) 1675 $\text{cm}^{-1}$ – folhas- $\beta$ de proteínas, (b) 1700 $\text{cm}^{-1}$ a 1600 $\text{cm}^{-1}$ – amida I, (c) 1600 $\text{cm}^{-1}$ a 1250 $\text{cm}^{-1}$ – amida II e (d) 2370 $\text{cm}^{-1}$ a 3080 $\text{cm}^{-1}$ – estiramento OH de água. ....	84
Figura 34 - VIP scores para o modelo PLS-DA binário para previsão de amostras adulteradas – modelo Two Class. Em destaque as bandas em torno de (a) 1650 $\text{cm}^{-1}$ – amida I, (b) 1550 $\text{cm}^{-1}$ – amida II, (c) 1080 $\text{cm}^{-1}$ – estiramento CO e estiramento COH, (d) 1700 $\text{cm}^{-1}$ – folhas $-\beta$ de proteínas, (e) 1390 $\text{cm}^{-1}$ e (f) 2900 $\text{cm}^{-1}$ - estiramento CH. ....	84
Figura 35 - Modelo PLS-DA para detecção das amostras de maltodextrina como outliers – Modelo Soft PLS-DA. Os limites superior e inferior para a classificação das amostras outliers estão destacadas em preto.....	86
Figura 36 - Gráfico de $T^2$ de Hotelling versus Resíduos Q para previsão de amostras de maltodextrina como outliers – Modelo Soft PLS-DA. ....	87
Figura 37 - (a) Espectrômetro Raman de imagem e (b) disposição da amostra na plataforma do microscópio .....	92
Figura 38 - Espectros médios da amostras de carne analisadas por espectroscopia Raman de imagem. ....	93

Figura 39 - Fluxograma das etapas de análise por MCR-ALS na interface gráfica Hypertools. ....	95
Figura 40 – À esquerda: espectro completo para a identificação de adulteração com (A) NaCl, (B) TPFS, (C) Carragena e (D) Maltodextrina. À direita: Região espectral selecionada para a construção do modelo quimiométrico – (A) 1200 cm <sup>-1</sup> a 1400 cm <sup>-1</sup> , (B) 1200 cm <sup>-1</sup> a 1400 cm <sup>-1</sup> , (C) 800 cm <sup>-1</sup> a 1100 cm <sup>-1</sup> e (D) 800 cm <sup>-1</sup> a 1000 cm <sup>-1</sup> . ....	97
Figura 41 - À esquerda, distribuição espectral das amostras adulteradas com NaCl, TPFS, Carragena e Maltodextrina - 1 <sup>a</sup> linha: amostras não adulteradas; 2 <sup>a</sup> linha: amostras adulteradas a 2%, 5% e 10%, respectivamente. À direita: espectro estimado pelo MCR. ....	98
Figura 42 – À esquerda: espectro completo para a identificação de adulteração com NaCl e TPFS. À direita: Região espectral selecionada para a construção do modelo quimiométrico –1200 cm <sup>-1</sup> a 1400 cm <sup>-1</sup> .....	101
Figura 43 - Distribuição espectral. 1 <sup>o</sup> linha: amostras não adulteradas; 2 <sup>a</sup> linha: amostras adulteradas com NaCl; 3 <sup>a</sup> linha: amostras adulteradas com TPFS. Nível de adulteração: 2%, 5% e 10% de ganho de massa, respectivamente. ....	102
Figura 44 - Região espectral referente à componente 1. ....	103
Figura 45 - À esquerda: espectro completo para a identificação de adulteração com Carragena e Maltodextrina. À direita: Região espectral selecionada para a construção do modelo quimiométrico – 800 cm <sup>-1</sup> a 1100 cm <sup>-1</sup> .....	104
Figura 46 - Distribuição espectral. 1 <sup>o</sup> linha: amostras não adulteradas; 2 <sup>a</sup> linha: amostras adulteradas com Carragena; 3 <sup>a</sup> linha: amostras adulteradas com Maltodextrina. Nível de adulteração: 2%, 5% e 10% de ganho de massa, respectivamente.....	105
Figura 47 - Região espectral referente à componente 1. ....	106

Figura 48 - À esquerda: espectro completo para a identificação de adulteração com NaCl, TPFS, Carragena e Maltodextrina – Modelo Global. À direita: Região espectral selecionada para a construção do modelo quimiométrico – 950 cm <sup>-1</sup> a 1050 cm <sup>-1</sup> .....	107
Figura 49 - Distribuição espectral. 1º linha: amostras não adulteradas; amostras adulteradas -2ª linha: NaCl; 3ª linha: TPFS; 4ª linha: Carragena; 5ª linha: Maltodextrina. Nível de adulteração: 2%, 5% e 10% de ganho de massa, respectivamente. ....	108
Figura 50 - Região espectral referente à componente 5. ....	109

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição da carne bovina crua, corte lagarto <sup>26</sup> .....	5
Tabela 2 - Comparação dos modelos de classificação construídos para as amostras de purga. ....	48
Tabela 3 - Figuras de mérito estimadas para o modelo PLS-DA. ....	58
Tabela 4 - Figuras de mérito do modelo de classificação individuais construído com os espectros Raman – Amostras de carne. ....	62
Tabela 5 - Figuras de mérito do modelo PLS-DA para previsão de todas as amostras de carne adulteradas construído com os espectros Raman. ....	65
Tabela 6 - Comparação dos 4 modelos de classificação construídos para as amostras carne construídos a partir dos Espectros Raman. ....	67
Tabela 7 - Distribuição das amostras de purga nos conjuntos treinamento e teste. ....	73
Tabela 8 - Figuras de mérito dos modelos de classificação construído com os espectros FTIR. ....	76
Tabela 9 - Figuras de mérito dos modelos de classificação construído com os espectros FTIR - Modelo Global.....	83
Tabela 10- Comparação dos modelos globais obtidas pela análise por espectroscopia Raman de imagem. ....	111

## LISTA DE ABREVIATURAS

ATR	Reflectância total atenuada ( <i>Attenuated Total Reflectance</i> )
AOTF	Filtros ópticos acústicos ( <i>Acoustic optical tunable filter</i> )
CPs	Componentes principais
CRA	Capacidade de retenção de água
CVCE	Erro de classificação de validação cruzada ( <i>cross-validation classification error</i> )
DFD	Coloração mais escura, consistência firme e seca ( <i>Dark-firm-dry</i> )
EMA	Adulteração com motivação econômica ( <i>Economically-motivated adulteration</i> )
FAST	Matrizes de fibra de translação espectral ( <i>fiber array spectral translation</i> )
FDA	Agência para o controle de alimentos e medicamentos dos EUA ( <i>Food and drug administration</i> )
FN	Falsos Negativos
FP	Falsos Positivos
FTIR	Infravermelho com transformada de Fourier ( <i>Fourier Transform Infrared</i> )
HCA	Análise hierárquica de agrupamentos ( <i>Hierarchical Cluster Analysis</i> )
IARC	Agência Internacional para pesquisa em câncer ( <i>International Agency for Research on Cancer</i> )
KNN	Método do K-ésimo vizinho mais próximo ( <i>K<sup>th</sup> Nearest Neighbour</i> )
KS	Kennard-Stone
LCTF	Filtro de cristal líquido ( <i>liquid crystal tunable filter</i> )
LDA	Análise discriminante linear ( <i>Linear Discriminant Analysis</i> )
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MCR	Resolução multivariada de curvas ( <i>Multivariate Curve Resolution</i> )
MIR	Infravermelho médio ( <i>Mid Infrared</i> )
NIPALS	Algoritmo iterativo não-linear de mínimos quadrados parciais ( <i>Non-linear iterative partial least squares</i> )
NIR	Infravermelho próximo ( <i>Near Infrared</i> )
PCA	Análise de componentes principais ( <i>Principal Component Analysis</i> )
PCR	Reação em cadeia da polimerase ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
pH	Potencial hidrogeniônico
PLS	Mínimos quadrados parciais ( <i>Partial Least Squares</i> )

PLS-DA	Análise discriminante por mínimos quadrados parciais ( <i>Partial Least Squares Discriminant Analysis</i> )
PSE	Pálido, flácido e exsudativo ( <i>Pale-soft-exudative</i> )
RIISPOA	Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal
RLR	Taxa de confiabilidade ( <i>Reliability rate</i> )
RMN	Ressonância magnética nuclear
RMSECV	Raiz quadrada do erro médio quadrático de validação cruzada ( <i>root mean square error of cross-validation</i> )
SDA	Secretaria de defesa agropecuária
SEN	Taxa de sensibilidade
SIMCA	Modelagem independente e flexível por analogia de classe ( <i>Soft Independent Modelling of Class Analogy</i> )
SPE	Taxa de especificidade
TACO	Tabela Brasileira de Composição de Alimentos
TCONF	Taxa de confiabilidade
TFN	Taxa de falso negativo
TFP	Taxa de falso positivo
USDA	Departamento de agricultura dos Estados Unidos da América ( <i>United States Department of Agriculture</i> )
UV-Vis	Ultravioleta-visível
VIP	Importância das Variáveis na Projeção dos escores ( <i>Variable Importance in scores Projection</i> )
VLs	Variáveis latentes
VN	Número total de amostras negativas
VP	Número total de amostras positivas
WHO	Organização Mundial de Saúde ( <i>World Health Organization</i> )

# SUMÁRIO

<b>RESUMO</b>	<b>VI</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>VII</b>
<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES</b>	<b>VIII</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b>	<b>XIV</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>XV</b>
<b>SUMÁRIO</b>	<b>XVII</b>
<b>CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>2</b>
<b>CAPÍTULO 2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>6</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>7</b>
<b>2.1 FRAUDES EM ALIMENTOS</b>	<b>7</b>
<b>2.2 CARNE BOVINA</b>	<b>8</b>
<b>2.3 CONTROLE DE QUALIDADE DA CARNE BOVINA</b>	<b>12</b>
<b>2.4 ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL</b>	<b>15</b>
2.4.1 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO	15
2.4.2 ESPECTROSCOPIA DE ESPALHAMENTO RAMAN	16
2.4.3 ANÁLISE HIPERESPECTRAL DE IMAGENS	18
<b>2.5 QUIMIOMETRIA</b>	<b>20</b>
2.5.1 RECONHECIMENTO DE PADRÕES	20
2.5.1.1 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA)	22
2.5.1.2 MÉTODOS DE CLASSIFICAÇÃO SUPERVISIONADOS	24
2.5.1.2.1 MODELAGEM FLEXÍVEL E INDEPENDENTE POR ANALOGIA DE CLASSES (SIMCA)	26
2.5.1.2.2 ANÁLISE DISCRIMINANTE POR MÍNIMOS QUADRADOS PARCIAIS (PLS-DA)	28
2.5.1.2.3 FIGURAS DE MÉRITO QUALITATIVAS	30
2.5.2 ALGORITMO DE KENNARD-STONE (KS)	31
2.5.3 VIP SCORES	31
2.5.4 DETECÇÃO DE <i>OUTLIERS</i>	32
2.5.5 MÉTODO DE REAMOSTRAGEM <i>BOOTSTRAP</i>	34
2.5.6 MÉTODO DE RESOLUÇÃO MULTIVARIADA DE CURVAS (MCR – <i>MULTIVARIATE CURVE RESOLUTION</i> )	36

<b><u>CAPÍTULO 3: ESPECTROSCOPIA RAMAN E ANÁLISE DISCRIMINANTE</u></b>	
<b><u>APLICADAS À DETECÇÃO DE FRAUDES EM CARNE BOVINA <i>IN NATURA</i> PELA</u></b>	
<b><u>ADICÇÃO DE SAIS E CARRAGENA</u></b>	<b><u>39</u></b>
<b>3.1 OBJETIVOS</b>	<b>40</b>
<b>3.2 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>40</b>
3.2.1 MATERIAIS E REAGENTES	40
3.2.2 EQUIPAMENTOS E INSTRUMENTOS UTILIZADOS	40
3.2.3 PREPARO DE AMOSTRAS	41
3.2.4 AQUISIÇÃO DE ESPECTROS	43
<b>3.3 PROCESSAMENTO DE DADOS</b>	<b>43</b>
<b>3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>44</b>
3.4.1 AMOSTRAS DE LÍQUIDO EXSUDADO (PURGA)	44
3.4.1.1 Ensaios preliminares	46
3.4.1.2 Modelos binário para identificação de amostras adulteradas – Modelo <i>Two Class</i>	55
3.4.1.2.1 Estimativa de incerteza por reamostragem por <i>bootstrap</i>	59
3.4.1.2.2 Tentativa de construção de modelos por modelagem de classes	60
3.4.2 AMOSTRAS DE CARNE	61
3.4.2.1 Modelos de classificação multiclasse para identificação de amostras adulteradas com adição de solução de adulterantes	62
3.4.2.2 Modelos de classificação binário para identificação de amostras adulteradas – Modelo <i>Two class</i>	64
3.4.2.3 Comparação dos modelos de classificação multiclasse e binário– Carne	67
<b>3.5 CONCLUSÕES PARCIAIS</b>	<b>69</b>
<b><u>CAPÍTULO 4: MODELO DISCRIMINANTE FLEXÍVEL (<i>SOFT PLS-DA</i>) PARA</u></b>	
<b><u>DETECTAR FRAUDES EM CARNE BOVINA <i>IN NATURA</i> COM BASE EM</u></b>	
<b><u>ESPECTROS DE INFRAVERMELHO MÉDIO DE SUAS PURGAS</u></b>	<b><u>70</u></b>
<b>4.1 OBJETIVOS</b>	<b>71</b>
<b>4.2 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>71</b>
4.2.1 MATERIAIS E REAGENTES	71
4.2.2 EQUIPAMENTOS E INSTRUMENTOS UTILIZADOS	71
4.2.3 PREPARO DE AMOSTRAS	71
4.2.4 AQUISIÇÃO DE ESPECTROS	72
<b>4.3 PROCESSAMENTO DE DADOS</b>	<b>72</b>
<b>4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>72</b>
4.4.1 MODELO SIMCA	75

4.4.2	MODELOS DE CLASSIFICAÇÃO MULTICLASSE PARA IDENTIFICAÇÃO DE AMOSTRAS ADULTERADAS COM ADIÇÃO DE SOLUÇÃO DE ADULTERANTES	76
4.4.3	MODELO BINÁRIO DE CLASSIFICAÇÃO PARA IDENTIFICAÇÃO DE AMOSTRAS ADULTERADAS <i>VERSUS</i> AMOSTRAS NÃO ADULTERADAS (MODELO <i>TWO CLASS</i> )	82
4.4.4	MODELO PLS-DA FLEXÍVEL COM EMPREGO DE DETECÇÃO DE OUTLIERS ( <i>SOFT PLS-DA</i> )	85
<b>4.5</b>	<b>CONCLUSÕES PARCIAIS</b>	<b>88</b>
<b><u>CAPÍTULO 5: EMPREGO DE ESPECTROSCOPIA RAMAN DE IMAGEM E MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS PARA A DETECÇÃO DE FRAUDES EM CARNES BOVINA <i>IN NATURA</i></u></b>		<b>89</b>
<b>5.1</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>90</b>
<b>5.2</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>90</b>
5.2.1	MATERIAIS E REAGENTES	90
5.2.2	INSTRUMENTAÇÃO	90
5.2.3	PREPARO DE AMOSTRAS	90
5.2.4	AQUISIÇÃO DOS ESPECTROS	91
<b>5.3</b>	<b>PROCESSAMENTO DE DADOS</b>	<b>92</b>
<b>5.4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>93</b>
5.4.1	MODELOS INDIVIDUAIS PARA AMOSTRAS ADULTERADAS	96
5.4.2	MODELOS PARA DETERMINAÇÃO DE AMOSTRAS ADULTERADAS COM SOLUÇÕES SALINAS (NaCl e TPFS)	101
5.4.3	MODELOS PARA DETERMINAÇÃO DE AMOSTRAS ADULTERADAS COM SOLUÇÕES DE POLISSACARÍDEOS (CARRAGENA E MALTODEXTRINA)	104
5.4.4	MODELOS PARA DETERMINAÇÃO DE AMOSTRAS ADULTERADAS COM INGREDIENTES NÃO CÁRNEOS (MODELO GLOBAL)	107
<b>5.5</b>	<b>COMPARAÇÃO ENTRE OS MODELOS</b>	<b>110</b>
<b>5.6</b>	<b>CONCLUSÕES PARCIAIS</b>	<b>111</b>
<b><u>CAPÍTULO 6: CONCLUSÃO</u></b>		<b>112</b>
<b>6.1</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>113</b>
<b><u>CAPÍTULO 7: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u></b>		<b>115</b>
<b>7.1</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>116</b>
<b>8</b>	<b>MATERIAL SUPLEMENTAR</b>	<b>124</b>

# **CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO**

# 1. INTRODUÇÃO

A alimentação é um processo essencial para a manutenção da vida, devendo atender às necessidades orgânicas dos indivíduos em termos qualitativos e quantitativos<sup>1</sup>. Neste contexto, a carne é definida como qualquer tecido de origem animal que seja consumido como alimento (incluindo nesta definição qualquer produto preparado a partir desses tecidos). Além disso, é um dos alimentos com alto teor nutritivo capaz de saciar a fome e ser agradável ao paladar humano<sup>2</sup>.

Segundo a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC – *International Agency for Research on Cancer*), instituição vinculada à Organização mundial de Saúde (WHO – *World Health Organization*), a carne vermelha refere-se a todos os tipos de carne de músculos de mamíferos<sup>3</sup>. Esta definição é coincidente com a subdivisão de carnes em quatro subcategorias proposta por Aberle *et al* (2001), em que a chamada **carne vermelha** é a primeira e a maior subcategoria, composta por carnes bovinas, suínas, de cordeiro, vitela, cavalo, bode, coelho, búfalo, camelo, entre outros. A segunda subcategoria é denominada **carne branca** e é constituída por aves domésticas como frango, peru, pato, galinha e ganso. A terceira subcategoria é composta por organismos aquáticos como peixes, mexilhões, lagostas, camarões, ostras, caranguejos, denominados **frutos do mar**. Por último, a quarta categoria é conhecida como **carnes de caça**, composta por carnes de animais não domésticos como javali, capivara, paca e faisão<sup>2</sup>.

Fisiologicamente, a carne é constituída majoritariamente por músculos. Entretanto, ela também é constituída por diversos outros tecidos como os tecidos adiposo, conjuntivo, sanguíneo, epitelial e nervoso. Por se tratar de um alimento proveniente de tecidos com funções biológicas específicas, diversas características influenciam em sua relevância como alimento como, por exemplo, a presença de grande quantidade de tecido conectivo que torna a carne mais dura e menos palatável<sup>2</sup>.

A produção mundial de carne vem crescendo a uma taxa de 0,64% ao ano. Devido à abundância de recursos naturais, disponibilidade de pastagens e alta produtividade, o Brasil apresenta grande crescimento na produção de carnes, especialmente a carne bovina. Juntamente com os Estados Unidos, que representaram 19,50% da produção mundial total em 2018, o Brasil apresenta-se como um dos maiores produtores de carne do mundo (15,75% no mesmo ano)<sup>4</sup>. Em relação à exportação, o Brasil foi responsável por 19,89% de toda a carne exportada em 2018, o equivalente a 1,64 milhão de toneladas (US\$ 6,57 bilhões). Isso corresponde a um crescimento de 7,9% em relação ao ano anterior<sup>5</sup>.

Dados da Organização de Cooperação e de Desenvolvimento Econômico (OECD - *Organisation for Economic Co-operation and Development*) apontam que o Brasil se manterá até 2025 como um dos maiores produtores de carne mundial, assim como China, União Europeia e Estados Unidos<sup>6</sup>. Entre os estados brasileiros, Minas Gerais é o quinto maior produtor de carne bovina, atrás apenas de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, São Paulo e Goiás<sup>7</sup>.

Devido ao grande valor agregado à produção de itens alimentícios, à crescente complexidade de cadeias de abastecimento de alimentos e à possibilidade de ações fraudulentas nas etapas de produção e comercialização, a ocorrência de fraudes alimentares, especialmente em carnes, tem preocupado autoridades de diversos países. Estima-se que a fraude alimentar em nível global gere uma perda de US\$ 49 bilhões ao ano<sup>8</sup>.

Diversos casos de adulterações em carnes ganharam grande repercussão nos últimos anos. Na Inglaterra, a adição de água, sais fosfatados e dextroses à carne de frango foi noticiada no jornal *Daily Mail Online* em 2013<sup>9</sup>. Entretanto, este mesmo tipo de fraude já havia sido relatada em 2007 pelo jornal *The Times*<sup>10</sup>. Em 2013, um grande escândalo envolvendo a venda de carne de cavalo em substituição à carne bovina foi noticiado na Europa<sup>11</sup> e estimulou diversas pesquisas sobre utilização da carne de cavalo como adulterante<sup>12; 13; 14; 15</sup>. No Brasil, em 2012, ocorreu a operação da Polícia Federal denominada “Vaca Atolada”, por meio da qual foi constatado que frigoríficos da região metropolitana de Belo Horizonte – MG adulteravam carnes bovinas *in natura* com a injeção de soluções de substâncias capazes de aumentar a retenção de água pelas peças de carne e conferir maior lucro aos vendedores<sup>16; 17</sup>. Este mesmo tipo de fraude foi verificada na “Operação Fugu” deflagrada em 2017 em Santa Catarina, em que empresas suspeitas de adulterar pescados importados acrescentavam soluções com sais de sódio para aumentar, de forma irregular, o peso dos produtos<sup>18</sup>. Por fim, neste mesmo ano, foi deflagrada, também, a operação “Carne Fraca”, com foco na investigação de irregularidades como o aproveitamento de carcaças animais para produção de gêneros alimentícios, utilização de aditivos não permitidos pela legislação, pagamento de propinas a fiscais federais agropecuários e agentes de inspeção em razão da comercialização de certificados sanitários, dentre outros<sup>19</sup>.

O aumento no número de relatos de fraudes demonstra a importância de se desenvolver métodos de análise simples e rápidos para a identificação de adulterações. Neste contexto, este trabalho pretende focar no tipo de fraude por adição de produtos não cárneos à peça de carne, uma vez que esta fraude caracterizou a já mencionada “Operação Vaca Atolada”. Desta forma,

este trabalho é uma continuação da Dissertação de Mestrado “Utilização de espectroscopia no infravermelho médio, fusão de dados e métodos quimiométricos de classificação na análise de fraudes em carnes bovinas *in natura*”, na qual foram caracterizadas adulterações em amostras reais de carnes apreendidas nessa operação, por meio de parâmetros físico-químicos (teores de sódio, fosfato, cloreto, cinzas, proteínas), espectros de absorção na região do infravermelho médio (MIR, *mid infrared*) e métodos quimiométricos. Os principais adulterantes encontrados foram sais, como cloretos, fosfatos, tripolifosfato de sódio, sal refinado iodado, pirofosfato ácido de sódio, além de maltodextrina, um carboidrato complexo proveniente de amido, colágeno, uma proteína estrutural, naturalmente presente na carne, e carragena, polissacarídeo fosfatado obtido de algas vermelhas comestíveis<sup>17; 20</sup>.

A adulteração por adição de soluções salinas e demais produtos gelatinizantes visa o aumento da capacidade de retenção de água pela peça de carne (CRA)<sup>21</sup>, propiciando uma fraude econômica por ganho no peso – fraude conhecida como adulteração com motivação econômica (EMA - *Economically-motivated adulteration*)<sup>22</sup>. O aumento da CRA está ligado a mudanças na conformação das proteínas, provocadas pela adição destas substâncias<sup>23</sup>. Assim como alguns sais, a carragena também tem a capacidade de aumentar a CRA de carnes<sup>24</sup>. Entretanto, poucos estudos na literatura relacionam a adição de sais ou carragena a fraudes em carnes.

Nesta tese de doutorado foram utilizadas peças de lagarto bovino *in natura* adquiridas em um frigorífico local. Este corte bovino foi escolhido por ser amplamente consumido no Brasil, por possuir custo relativamente acessível à maioria da população e por ser um dos cortes bovinos utilizados na fraude investigada pela Operação Vaca Atolada da Polícia Federal, na região metropolitana de Belo Horizonte, em 2012<sup>16; 17</sup>. Avaliando-se a composição do corte “lagarto cru” da carne bovina, apresentada na Tabela 1, é possível verificar que ele apresenta teores significativos de minerais, proteínas, ácidos graxos e vitaminas do complexo B. Essas características permitem considerar este corte bovino como um alimento com alta densidade nutricional<sup>25</sup>.

Tabela 1 - Composição da carne bovina crua, corte lagarto<sup>26</sup>.

<b>Descrição</b>	<b>Valor</b>	<b>Descrição</b>	<b>Valor</b>
<b>Umidade%</b>	71	<b>Magnésio (mg)</b>	20
<b>Energia (kJ)</b>	564	<b>Fósforo (mg)</b>	185
<b>Proteína (g)</b>	20,5	<b>Ferro (mg)</b>	1,3
<b>Lipídeos (g)</b>	5,2	<b>Sódio (mg)</b>	54
<b>Carboidrato (g)</b>	0	<b>Potássio (mg)</b>	362
<b>Cinzas (g)</b>	1,1	<b>Cobre (mg)</b>	0,05
<b>Cálcio (mg)</b>	3	<b>Zinco (mg)</b>	2,4

Valores para 100g de carne analisada. \*

FONTE: UNICAMP (2011). TACO –Tabela Brasileira de Composição de Alimentos - 4ª ed.

As amostras deste estudo foram adulteradas de forma controlada em laboratório, permitindo a identificação global de adulteração ou detecção de adulterações individuais com soluções de cloreto de sódio, tripolifosfato de sódio e carragena. Desta forma, a relevância deste trabalho de doutorado baseia-se na utilização da espectroscopia de absorção na região do infravermelho médio (FTIR), da espectroscopia Raman e da espectroscopia Raman de imagem associadas a métodos quimiométricos para a construção de modelos multivariados que sirvam como método de análise de triagem (*screening*) para identificação e caracterização das fraudes em carnes bovinas *in natura* como alternativa aos métodos físico-químicos de análise de autenticidade de carne. Amostras consideradas adulteradas por um método *screening* são submetidas a análises complementares para a confirmação ou não da adulteração, diminuindo, assim, os custos de análise e aumentando a rapidez na detecção da fraude.

## **CAPÍTULO 2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 FRAUDES EM ALIMENTOS

As fraudes em alimentos podem ser divididas em quatro grandes grupos. A **fraude por alteração** ocorre quando o vendedor conhece a condição imprópria do produto devido a alterações provocadas por agentes químico, físicos, microbianos, enzimáticos ou por corrupção (negligência, desleixo ou descumprimento de normas regulamentadoras), e ainda assim efetua a sua comercialização<sup>1</sup>.

**Fraudes por adulteração** são caracterizadas pela adição intencional de produtos de qualidade inferior, subtração ou substituição de constituintes dos alimentos, adição de substâncias não permitidas pela legislação ou, quando permitidas, em quantidades superiores ao estabelecido, visando o aumento de lucros<sup>1</sup>.

A **fraude por falsificação** é a modalidade em que o consumidor adquire um produto inferior julgando-o superior, devido à aparência igual ao do produto original, mas características de qualidade, peso, apresentação, procedência e propaganda distintas. Um exemplo clássico é a venda de cortes de carne de segunda como se fossem cortes de primeira<sup>1</sup>.

**Fraudes por sofisticação** é uma variante da fraude por falsificação na qual ocorre, por exemplo, o aproveitamento de rótulos, garrafas e outras embalagens para a comercialização do produto falsificado ou ocorre a propaganda acerca de atributos que o produto não possui, como por exemplo, “integral”, “ideal”, “dietético”, “nutritivo”, entre outros<sup>1</sup>.

Especificamente para a carne, Ballin (2010) subdivide a fraude em quatro categorias. A primeira categoria está associada a **fraudes por origem** da carne: sexo do animal abatido, tipos de cortes, tipo de alimentação e idade de abate, carne orgânica e carne tradicional, e origem geográfica<sup>27</sup>.

O tipo mais comum de fraude alimentar descrito em cerca de 95% das publicações na literatura<sup>28</sup> é a **fraude por substituição** de tecidos, raças ou espécies. Geralmente, a identificação deste tipo de fraude é realizada a partir de análise de DNA, como por reação em cadeia de polimerase (PCR - do inglês *Polymerase Chain Reaction*),<sup>29; 30</sup> técnica analítica laboriosa e demorada. Devido a isso, técnicas analíticas rápidas e simples têm sido aplicadas como alternativa para a detecção de fraudes envolvendo a substituição de diferentes espécies de carne, como vaca, porco, cordeiro, cavalo, peru, frango e peixe, usando espectroscopias Raman<sup>12</sup>, no infravermelho próximo (NIR)<sup>31; 32</sup> e no infravermelho médio (MIR)<sup>33</sup>. Estratégias analíticas e quimiométricas mais sofisticadas também têm sido empregadas na análise da qualidade da carne e testes de autenticidade, incluindo imageamento hiperespectral NIR

(HSI)<sup>34</sup>, espectroscopia Raman com compensação espacial (SORS - *Spatially off-set Raman*)<sup>35</sup> e fusão de dados de diferentes técnicas analíticas<sup>36</sup>.

A **fraude por processamento** é o terceiro tipo mais comum em carne. Esta é caracterizada pelo tipo de processamento ao qual a carne foi submetida: se a peça foi submetida a irradiação como forma de aumentar o tempo de conservação da peça, se a carne é fresca, carne descongelada ou processada (triturada)<sup>27</sup>.

Por fim, a categoria responsável por apenas 5% das publicações (dados de 1980-2010)<sup>28</sup> é a **fraude por adição de produtos não cárneos**, na qual, por exemplo, aditivos como água, sais e substâncias gelificantes podem ser adicionados à carne com o intuito de aumentar a retenção de água e, conseqüentemente, os lucros advindos de sua venda<sup>27</sup>. Exemplos de estudos relacionados à adição de ingredientes não-cárneos envolvem a combinação de espectroscopia MIR e classificação supervisionada para detectar e quantificar a proteína de soja texturizada usada como adulterante em carne moída<sup>37</sup> e detecção de sais e compostos polissacarídicos em amostras reais apreendidas originadas de redes criminosas desmanteladas pela Polícia Federal Brasileira<sup>17</sup>. Outros artigos científicos publicados na literatura sobre estudo de fraudes em carnes estão listados na Tabela 1S (Material Suplementar).

## 2.2 CARNE BOVINA

A transformação da musculatura bovina em carne propriamente dita, se dá após o abate por meio de processos físicos e bioquímicos específicos. De modo geral, a conversão de músculo em carne é um processo progressivo de degradação que, caso não seja interrompido, promove a sua decomposição total<sup>2</sup>.

Os dois principais aspectos relacionados à tecnologia de obtenção de carne fresca com alta qualidade são as características de conservação e palatabilidade, sendo esta última baseada em três principais itens: sabor, cor e maciez<sup>38</sup>.

A coloração da carne é produzida pelas proteínas hemoglobina, responsável pela pigmentação do sangue, e mioglobina, disponível em cerca de 80% a 90% do total de pigmentos do tecido muscular (Figura 1)<sup>2</sup>.

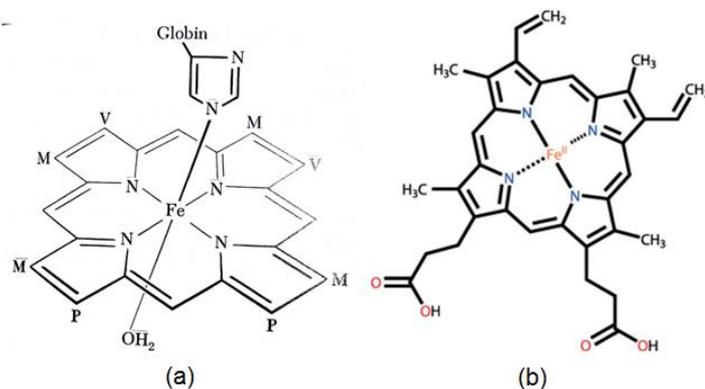


Figura 1 - Representação esquemática (a) complexo heme da mioglobina (b) hemoglobina<sup>2</sup>.

A mioglobina é constituída por uma porção de proteína globular (globina) e uma porção não proteica denominada grupo heme. A coloração da carne é obtida de acordo com o estado de oxidação do ferro no grupo heme. Quando o ferro encontra-se no estado férrico (oxidado), não ocorrem ligações entre ele e outras moléculas, como o oxigênio molecular. Desta forma, a carne apresenta coloração avermelhada. Por outro lado, quando o ferro encontra-se no estado ferroso (estado reduzido), a mioglobina pode se combinar com moléculas de água ou oxigênio adquirindo coloração marrom (Figura 2)<sup>2</sup>.

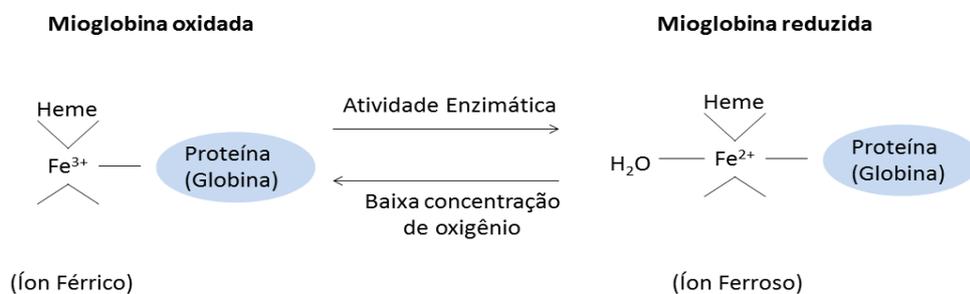


Figura 2 - Representação esquemática dos estados de oxidação do íon ferro central no grupo heme da mioglobina (adaptado)<sup>2</sup>.

Outro fator importante na qualidade deste alimento é a maciez da carne. Mercados exportadores de carne bovina, como Estados Unidos, União Europeia e Austrália, há décadas apresentam grande preocupação com a qualidade da carne produzida. Entretanto, ainda faltam incentivos à maioria dos produtores brasileiros de gado de corte para obtenção de carnes com maior qualidade, pois a comercialização de bovinos e carcaças baseia-se fundamentalmente no valor pago pelo peso da carcaça quente ou “peso no gancho”. Desta forma, características qualitativas como cor, maciez e suculência somadas às características quantitativas de

rendimento de cortes traseiros (carnes consideradas nobres) e acabamento (maior cobertura de gordura) não são consideradas pelos mecanismos de comercialização de bovinos e carcaças no mercado agropecuário brasileiro<sup>39</sup>.

No Brasil, a preocupação com a qualidade da carne bovina iniciou-se com a exportação de carne fresca para países com alto grau de exigência de características qualitativas e quantitativas<sup>39</sup>. Desta forma, em diversos estados brasileiros foram desenvolvidos programas de incentivo à produção de novilhos precoces, com objetivo de criação e abate de bovinos entre 24-30 meses de vida, em contraposição ao abate tradicional de bovinos com idade média de 30-36 meses. Esta prática permite o aumento da taxa de desfrute (aumento da produtividade do rebanho) e o aumento da oferta de carne bovina com maior qualidade<sup>39</sup>.

Vários métodos podem ser usados para aferir o processo de amaciamento da carne durante a maturação natural do músculo, como o índice de fragmentação miofibrilar, eletromicrografia e força de cisalhamento<sup>40</sup>. Quantitativamente, a maciez aceitável de uma carne pode ser definida como a força de cisalhamento inferior a 4,5 kgf. Entretanto, existem diversos fatores associados ao processo de obtenção de uma carne macia<sup>39</sup>.

Entre os fatores *antemortem* destacam-se genótipo ou raça, sexo do animal, idade, aplicação de promotores de crescimento, alimentação e manejo pré-abate. Dentre estes fatores, a maciez da carne é altamente correlacionada à raça<sup>39</sup>.

A produção de gado de corte no Brasil utiliza basicamente a raça zebu, pura ou mestiça, por ser a raça que melhor se adapta ao clima tropical. Entretanto, historicamente ela é identificada por fornecer uma carne dura devido à criação livre em pasto, abate em idade mais velha, menor nível de marmorização (gordura intramuscular) e grande número de ligações cruzadas termoestáveis de colágeno dos músculos<sup>39</sup>. A degradação do colágeno, especialmente as ligações cruzadas intermoleculares, aumenta a maciez da carne, entretanto, isto acontece em pequena extensão<sup>2</sup>.

Entre os fatores *post mortem*, um dos importantes para obtenção de uma carne mais macia é a adição de água ao músculo antes do completo estabelecimento do *rigor mortis* (enrijecimento do músculo). O acréscimo de maciez devido à injeção de água se dá devido a fatores físicos e químicos. Fisicamente, quando injetada sob pressão, a água é distribuída uniformemente pelo tecido muscular promovendo o aumento do espaço entre as fibras musculares e causando a ruptura dos feixes de fibras, enquanto ativa quimicamente enzimas hidrolíticas naturais presentes na carne que atuam rapidamente e aumentam significativamente a umidade. Quando alcançado o completo *rigor mortis*, a adição de cerca de 1% a 3% de água

potencializa o aumento da maciez da carne em torno de 20%, uma vez que as moléculas de água não se encontram sob a forma de água de hidratação, mas preenchendo os espaços intersticiais da carne<sup>38</sup>. No Brasil é permitida a adição, nos limites fixados, de água ou de gelo aos produtos cárneos processados com o objetivo de facilitar a trituração e a homogeneização da massa cárnea. Entretanto, em carne fresca não processada não há previsão legal<sup>41</sup>. Desta forma, a adição de água visando aumento da massa e consequente ganho econômico é considerada como uma ação fraudulenta<sup>27</sup>.

O método padrão para determinar a água adicionada à carne se baseia no estudo da razão entre os conteúdos de água e proteína<sup>42</sup>. Se água exógena for adicionada à carne, a razão água/proteína se torna muito alta e serve como um claro indicador da fraude. No entanto, proteínas de outras fontes e sais, como fosfatos, também podem ser adicionados a produtos cárneos para aumentar a retenção de água, levando a razão água/proteína a valores próximos à sua proporção natural na carne. Neste caso, é necessária a detecção de proteínas e/ou sais exógenos para identificar a fraude<sup>27</sup>.

As propriedades físicas da carne, como textura, cor e suculência, dependem diretamente da capacidade de retenção de água (CRA). A utilização de embalagens a vácuo potencializa a exsudação de líquido da carne, chamado de purga. Essa perda acentuada de umidade pode causar notável deterioração da peça de carne e, conseqüentemente, perda da capacidade de retenção de água<sup>2</sup>.

Outro efeito considerável sobre a capacidade de retenção de água é a troca nas cadeias proteicas de íons divalentes por íons monovalentes, como o sódio. Este processo ocorre pela difusão de íons nas áreas em que a membrana estrutural das proteínas do músculo sofreram degradação enzimática. Esta troca de íons promove o aumento da camada de retenção de água, pois cada cátion divalente substituído libera um grupo reativo da proteína para ligar-se à água<sup>2</sup>.

Diversos outros aditivos podem ser adicionados à carne para a promoção de maciez extra ao músculo, como gelatinizantes e sais<sup>38</sup>. Karmas (1975) cita que é conhecido desde a publicação da patente de Allen, em 1938, que soluções aquosas de fosfatos e cloreto de sódio podem ser utilizadas para o aumento da maciez de carnes, devido ao aumento da hidratação das peças. Estas soluções podem ser aplicadas sob a forma de revestimento (banho de imersão) ou injetadas. A utilização simultânea destes dois métodos acarreta em um sinergismo quando são empregadas soluções de fosfato com concentração variando de 1% a 4% m/v e de cloreto de sódio de 2,5% a 7% m/v<sup>38</sup>. No Brasil, qualquer substância adicionada à carne *in natura* é considerada como uma fraude.

Outros fatores que afetam a qualidade da carne bovina estão relacionados à produção de ácido lático pelo músculo bovino. Quando os animais são submetidos a fontes de estresse antes do abate, como variações extremas de temperatura, umidade, luz e som, estes liberam hormônios na corrente sanguínea e o músculo se prepara para contrações necessárias. Nestas condições, a formação de ácido lático é favorecida pelo hormônio epinefrina. Caso ocorra um acúmulo excessivo de ácido lático no músculo, desenvolve-se um processo acidótico que favorece o endurecimento da carne após o abate<sup>2</sup>.

Após 18 a 24 horas de resfriamento, músculos de animais submetidos a estresse apresentam-se pálidos, flácidos e exsudativos, conhecido como uma carne PSE (*pale-soft-exudative*). Isto acontece devido à rápida degradação do glicogênio, o que reduz o valor de pH de 6,8 a 5,8 após a primeira hora de abate. Carnes PSE apresentam aumento da perda de líquido por cozimento, redução da suculência e redução do rendimento quando processadas. As carnes conhecidas como DFD (*dark-firm-dry*) apresentam-se com coloração mais escura, consistência firme e seca e são consideradas carnes de menor qualidade<sup>2</sup>.

Conforme explicitado acima, a qualidade da carne depende de diversos parâmetros, tais como as características qualitativas cor e textura e as características sensoriais como sabor, maciez e cheiro após preparo<sup>2</sup>. Entretanto, uma das principais características que permitem a identificação de fraudes em carne por adição de produtos não cárneos e que apresenta potencial nesta detecção é a capacidade de retenção de água. Para tanto, faz-se necessário a utilização de mecanismos de fiscalização e regulamentação do controle de qualidade da carne bovina consumida.

## 2.3 CONTROLE DE QUALIDADE DA CARNE BOVINA

O Controle de qualidade da carne consumida no Brasil é realizado pelo Ministério da Agricultura por meio de laboratórios de inspeção sanitária. O documento que regulamenta a inspeção é denominado Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), lançado pela primeira vez em 1952 e revisado em 29 de março de 2017<sup>41</sup>. A verificação da qualidade de carnes e produtos cárneos é realizada mediante análises de parâmetros microbiológicos e físico-químicos, conforme artigo 274:

Art. 274. Os produtos de origem animal devem atender aos **parâmetros e aos limites microbiológicos, físico-químicos**, de resíduos de produtos de uso veterinário, contaminantes e outros estabelecidos neste Decreto, no RTIQ (**Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade**) e ou em normas complementares (MAPA, 2017, grifo nosso)<sup>41</sup>.

Para fins de definição, o RIISPOA traz em seu artigo 276 o significado atribuído ao termo “carnes” e em seu artigo 283 a definição de “produtos cárneos”:

Art. 276. Para os fins deste Decreto, **carnes** são as massas musculares e os demais tecidos que as acompanham, incluída ou não a base óssea correspondente, procedentes das diferentes espécies animais, julgadas aptas para o consumo pela inspeção veterinária oficial (MAPA, 2017, grifo nosso)<sup>41</sup>.

Art. 283. Para os fins deste Decreto, **produtos cárneos** são aqueles obtidos de carnes, de miúdos e de partes comestíveis das diferentes espécies animais, com as propriedades originais das matérias-primas modificadas por meio de tratamento físico, químico ou biológico, ou ainda pela combinação destes métodos em processos que podem envolver a adição de ingredientes, aditivos ou coadjuvantes de tecnologia. (MAPA, 2017, grifo nosso)<sup>41</sup>.

A adição de produtos a fim de facilitar o manuseio e preparo de produtos cárneos é permitida mediante legislação complementar ao RIISPOA (artigo 316 apresentado abaixo):

Art. 316. É permitida a adição, nos limites fixados, de água ou de gelo aos produtos cárneos com o objetivo de facilitar a trituração e a homogeneização da massa, ou para outras finalidades tecnológicas, quando prevista neste Decreto e em normas complementares, ou mediante aprovação do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (MAPA, 2017)<sup>41</sup>.

Entretanto, para carne fresca “*in natura*”, definida como a carne que foi minimamente processada após abate, como corte para varejo, moagem ou congelamento<sup>2</sup>, não é permitida a utilização de aditivos de nenhuma natureza, conforme Portaria nº 1004/1998 da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde<sup>43</sup>. Assim, a adição de quaisquer aditivos é caracterizada como fraude ou adulteração.

Segundo o Código Penal Brasileiro, a falsificação, corrupção, adulteração ou alteração de substância ou produtos alimentícios é crime punível com pena de reclusão e multa:

Art. 272 - Corromper, adulterar, falsificar ou alterar substância ou produto alimentício destinado a consumo, tornando-o nociva à saúde ou reduzindo-lhe o valor nutritivo:

Pena - reclusão, de 4 (quatro) a 8 (oito) anos, e multa. (BRASIL, Código Penal, 1940)<sup>44</sup>

O controle de qualidade da carne bovina consumida no Brasil é regulado pela Instrução Normativa nº 20/1999 SDA/MAPA e baseia-se em métodos analíticos clássicos para a

determinação de propriedades físico-químicas e microbiológicas da carne, como teor de fósforo, nitratos, nitritos, nitrogênio, pH, resíduo mineral fixo, entre outros<sup>45</sup>. Alternativamente, diversas técnicas instrumentais, como espectroscopia<sup>17</sup> e cromatografia<sup>46</sup>, têm sido propostas para a identificação de componentes presentes na carne, quantificação e controle de qualidade.

Técnicas cromatográficas possuem alta sensibilidade, entretanto, apresentam como características um longo tempo de análise e utilização de grandes quantidades de insumos. Alternativamente, técnicas espectroscópicas vibracionais apresentam inúmeras vantagens, tais como mínimo (ou nenhum) tratamento da amostra, análises mais limpas, sem gasto de reagentes ou geração de resíduos, maior rapidez e menor custo.

Nos últimos anos, tem havido uma mudança nos sistemas de controle de qualidade de alimentos visando a detecção de fraude alimentar<sup>8</sup>. Deste modo, há uma tendência de utilização de métodos de análise não alvo (*non-targeted analysis*) – análise de regiões de impressão digital (*fingerprint*) – em detrimento aos métodos de análise alvo (*targeted analysis*) – contém ou não contém o adulterante. Isso está relacionado ao constante crescimento no uso de técnicas espectroscópicas. Aliados ao uso de métodos quimiométricos, métodos baseados em espectroscopia molecular são promissores no desenvolvimento de modelos de identificação de padrões ou de classificação. Entretanto, a utilização de métodos *non-targeted* apresenta novos desafios para as comunidades de pesquisa em química analítica e ciência de alimentos, como a falta de diretrizes para o desenvolvimento e validação de métodos não direcionados (*non-targeted*) e dificuldades na obtenção de amostras autênticas com rastreabilidade total para a construção de modelos quimiométricos.

## 2.4 ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL

Técnicas espectroscópicas vibracionais baseiam-se em interações da radiação eletromagnética com moléculas ou átomos, provocando vibrações conforme a amplitude das ligações covalente existentes<sup>47</sup>. Neste trabalho, serão utilizadas as técnicas de espectroscopia de absorção no infravermelho médio e espectroscopia de espalhamento Raman.

Fisicamente, a espectroscopia no infravermelho e a espectroscopia Raman são distintas. A absorção no infravermelho ocorre quando a frequência da radiação, multiplicada pela constante de Planck, tem o mesmo valor da diferença de energia entre dois estados vibracionais. Na espectroscopia Raman, após a interação entre a radiação e a molécula, ocorre o espalhamento da radiação com ligeira modificação da frequência. Esta modificação caracteriza a diferença energética entre dois níveis vibracionais. Embora existam semelhanças entre as espectroscopias Raman e no infravermelho, a diferença nos sinais dos grupos ativos nestas duas técnicas as tornam complementares<sup>48</sup>.

### 2.4.1 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO

O espectro de absorção no IV é obtido pela absorção de diferentes frequências de radiação por uma amostra exposta no caminho do raio infravermelho, determinando a região de impressão digital da amostra analisada (*fingerprint*). Esta região de *fingerprint* contém informações relevantes sobre características químicas, físicas ou do processo, que permitem a determinação de sua origem<sup>49</sup>.

Devido ao arranjo característico de átomos e ligações presentes na molécula, a absorção da radiação no infravermelho ocorre em frequências específicas para cada grupo funcional<sup>47</sup>. Entretanto, esta radiação não possui energia suficiente para provocar transições eletrônicas<sup>48</sup>.

A região do espectro eletromagnético compreendida entre 2.500 nm e 50.000 nm ( $4.000\text{ cm}^{-1}$  e  $200\text{ cm}^{-1}$ ) é denominada infravermelho médio e é amplamente utilizada na elucidação de compostos orgânicos. A região do infravermelho próximo, situada entre 780 nm e 2.500 nm ( $12.800\text{ cm}^{-1}$  e  $4.000\text{ cm}^{-1}$ ), também pode ser utilizada para a identificação e caracterização de compostos orgânicos, embora apresente informação muito menos seletiva<sup>48; 50</sup>. A análise mais comum dos espectros de infravermelho médio baseia-se na análise das bandas atribuídas a grupos funcionais mais prováveis, especialmente na região de impressão digital (*fingerprint*), compreendida entre  $1200\text{ cm}^{-1}$  e  $600\text{ cm}^{-1}$ <sup>48</sup>.

A reflectância total atenuada (ATR - *Attenuated Total Reflection*, em inglês) é a técnica de reflexão mais utilizada no infravermelho médio, apresentando grande versatilidade na

análise de amostras sólidas e líquidas. Ela é empregada para análise de amostras de difícil manuseio, como as amostras de solubilidade limitada e sólidos pulverizados (pós).

Nas últimas duas décadas, a espectroscopia MIR tem sido expandida para diferentes matrizes alimentares devido à incorporação de diferentes métodos de preparação de amostras a instrumentos FTIR, como por exemplo, a reflexão total atenuada de salto único (SB-ATR - *single bounce* ATR, em inglês) e transmissão com comprimento do feixe variável e definido<sup>49</sup>.

#### **2.4.2 ESPECTROSCOPIA DE ESPALHAMENTO RAMAN**

A espectroscopia Raman é baseada no fenômeno de espalhamento inelástico da radiação. No espalhamento inelástico da radiação, ocorre a interação entre a radiação eletromagnética monocromática e a matéria através do campo elétrico existente, levando a um estado virtual de energia. O estado virtual pode ser considerado como uma distorção de curta duração da nuvem eletrônica, causada pelo campo elétrico oscilante da radiação<sup>51</sup>. A energia neste estado virtual pode ser relaxada de duas formas: a molécula pode retornar ao estado original, conhecido com espalhamento elástico ou espalhamento Rayleigh, ou a molécula pode retornar a um estado energético diferente devido à mudança no seu estado vibracional, que caracteriza o espalhamento inelástico da radiação ou espalhamento Raman<sup>52; 53</sup>. A diferença entre a energia incidida e espalhada inelasticamente corresponde à diferença de energia entre dois níveis vibracionais. Dessa forma, a espectroscopia Raman fornece informação vibracional, assim como a espectroscopia na região do infravermelho<sup>48</sup>.

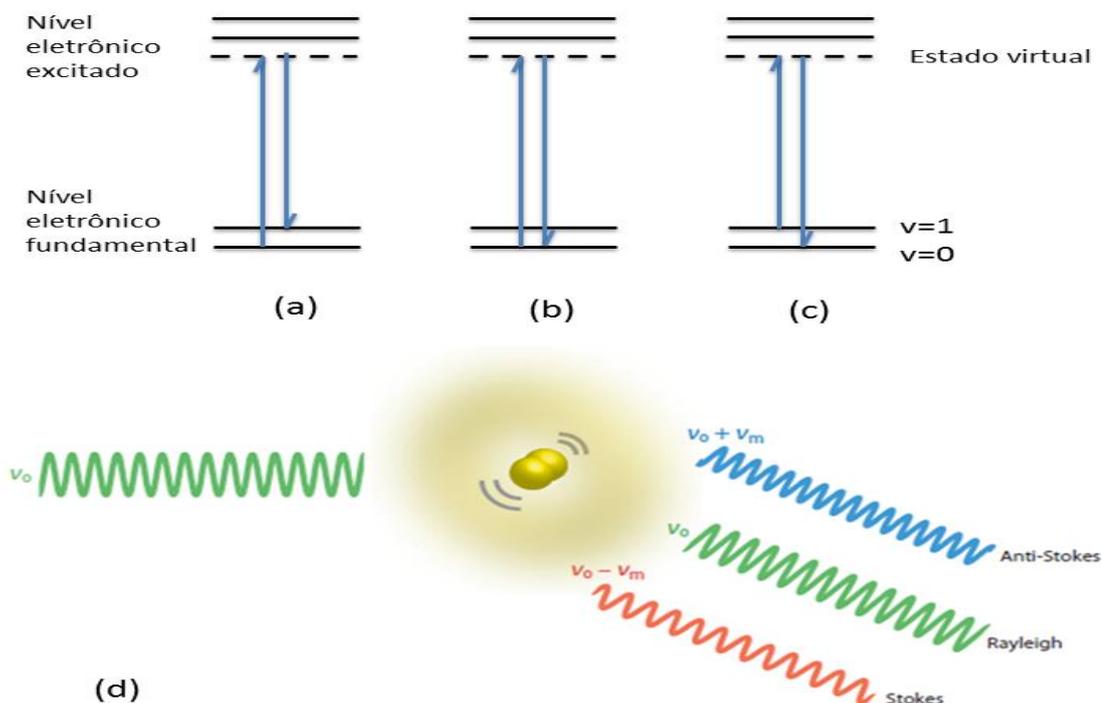


Figura 3 - Espalhamento de Luz: (a) espalhamento inelástico (região Stokes); (b) espalhamento elástico (Rayleigh); (c) espalhamento inelástico (região anti-Stokes); (d) representação esquemática das formas de espalhamentos da radiação (imagens adaptadas)<sup>52, 53</sup>.

O espalhamento inelástico pode ocorrer de duas formas. Na primeira forma, o fóton espalhado possui energia inferior ao fóton incidente (Figura 3 - a). Neste caso, tem-se o espectro Raman na região chamada Stokes. Na segunda forma de espalhamento inelástico, o fóton espalhado possui energia superior ao fóton incidente. Esta região é conhecida como região anti-Stokes (Figura 3 - c). Nesta região, a intensidade de uma banda é diretamente proporcional à população do nível vibracional correspondente, que por sua vez é inversamente proporcional à energia necessária para popular este nível<sup>52</sup>.

A aplicação de transformada de Fourier (FT-Raman), o desenvolvimento de microcomputadores e lasers na região do infravermelho permitiram a difusão da utilização da técnica de espectroscopia Raman para análises químicas, principalmente em amostras biológicas.

### 2.4.3 ANÁLISE HIPERESPECTRAL DE IMAGENS

Nos últimos anos, a técnica de análise hiperespectral de imagens (HSI) tem demonstrado grande potencial na análise de autenticidade de alimentos. Esta técnica gera simultaneamente informações espectrais e espaciais das amostras analisadas a partir da combinação de tratamento computacional com dados de análise por espectroscopia ótica tradicional<sup>54</sup>.

Em uma análise espectroscópica tradicional, o resultado obtido é apresentado na forma de um único espectro  $I(\lambda)$ , obtido em um único ponto da amostra. Um sistema de imagem fornece informações em duas dimensões,  $I(x, y)$ . Em uma análise hiperespectral, um arranjo tridimensional é obtido,  $I(x, y, \lambda)$ , em que cada pixel  $(x, y)$  apresenta o resultado de um espectro individual  $I(\lambda)$  ou, em outras palavras, cada comprimento de onda individual  $(\lambda)$  apresenta uma imagem espacial separada  $I(x, y)$ <sup>54; 55</sup>. Um arranjo tridimensional é apresentado na Figura 4:

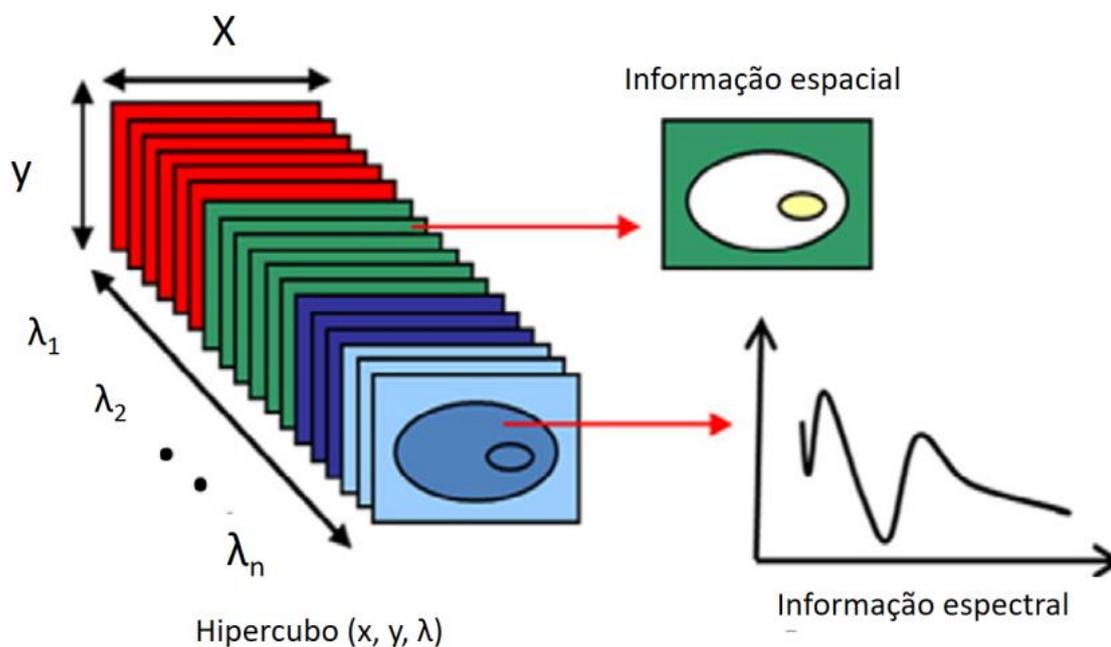


Figura 4 - Informação em um hiper-cubo de uma imagem hiperespectral com um conjunto tridimensional  $I(x, y, \lambda)$ . (Imagem adaptada)<sup>54</sup>

De um modo geral, cada pixel na imagem obtida possui um perfil espectral de acordo com a posição espacial correspondente. Este fator permite a visualização da distribuição de características de alterações na qualidade dos alimentos<sup>56</sup>.

A espectroscopia Raman de imagem pode ser obtida em dois modos: imagem (*imaging*) ou mapeamento (*mapping*). No modo *imaging*, uma determinada superfície da amostra é iluminada e uma imagem global da amostra é adquirida (similar a uma fotografia da superfície

da amostra). No modo *mapping*, a amostra é posicionada nos eixos x e y a partir da movimentação de uma plataforma móvel.

No modo *mapping* dois tipos de mapeamento podem ser obtidos: mapeamento pontual ou mapeamento em linha. No mapeamento pontual (*point-mapping*), um espectro é obtido em uma localização espacial xy da superfície selecionada da amostra (Figura 5 – (a)). Este ponto é denominado pixel. Após a aquisição dos espectros para a área selecionada da amostra, esses são agrupados em um arranjo tridimensional, em que x e y são as coordenadas do ponto de aquisição do espectro e z possui a informação acerca do número de onda do espectro obtido. Como vantagens, esta técnica apresenta alta resolução espectral, cobertura espectral total e confocalidade. Entretanto, as imagens apresentam baixa definição, a aquisição é lenta e o laser pode induzir danos na amostra<sup>57</sup>.

Outra forma de aquisição de dados é o mapeamento em linha (*line-mapping*). Neste tipo de análise, uma linha definida na superfície da amostra é analisada de cada vez (Figura 5 – (b)). Como vantagens, esta técnica apresenta confocalidade, alta resolução espectral e cobertura de ampla faixa espectral. Em contrapartida, é menos eficiente que o mapeamento pontual, é moderadamente lenta e apresenta imagens com definição moderada<sup>57</sup>.

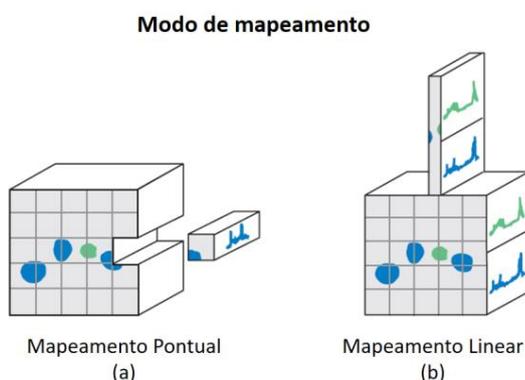


Figura 5 - Comparação entre os modos de aquisição de imagem por mapeamento utilizando a espectroscopia Raman: (a) Mapeamento pontual e (b) Mapeamento linear (ou em linha). (Imagem adaptada)<sup>57</sup>

Os dois modos de aquisição de espectroscopia Raman de imagem (mapeamento e imagem) geram imagens químicas das amostras analisadas. Entretanto, para extração da informação e interpretação dos dados químicos obtidos, é necessária a utilização de métodos quimiométricos de análise.

## 2.5 QUIMIOMETRIA

Quimiometria é definida como a “disciplina química que utiliza métodos matemáticos e estatísticos, entre outros, empregando uma lógica formal para: 1) definir ou selecionar condições ótimas para procedimentos de análise e experimentos; e 2) obter o máximo de informação química relevante a partir da análise de dados químicos”<sup>58; 59</sup>. Genericamente, pode-se dividir a quimiometria em três áreas principais: planejamento e otimização de experimentos, reconhecimento de padrões e calibração multivariada. Os métodos de reconhecimento de padrões podem ser utilizados para análise exploratória de dados, classificação de amostras e resolução de curvas<sup>60</sup>.

Diversas técnicas analíticas apresentam dados passíveis de tratamento quimiométrico, como técnicas cromatográficas acopladas a espectrômetros de massas, e métodos espectroscópicos de análises. Dentre estes, destacam-se as técnicas de espectroscopia molecular, tais como espectroscopia de absorção molecular na região do ultravioleta/visível - UV/vis, no NIR, e no MIR, espectroscopia Raman e espectrofluorimetria. Estas técnicas produzem sinais analíticos sobrepostos para matrizes complexas e encontram aplicação associada a métodos quimiométricos em diversas áreas, tais como arqueologia, bioanalítica, processos industriais, análise farmacêutica, ciência forense, ciência de alimentos, dentre outras<sup>58</sup>.

### 2.5.1 RECONHECIMENTO DE PADRÕES

A análise tradicional da autenticidade de alimentos é usualmente baseada na análise de marcadores específicos de compostos, conhecida como análise alvo (*targeted analysis*). Este tipo de análise visa identificar características das amostras analisadas, como a presença de uma substância exógena adicionada à carne, por exemplo. Por se tratar da determinação de compostos específicos, este tipo de método é amplamente baseado em análises univariadas. Entretanto, a avaliação de marcadores específicos deve estar relacionada ao parâmetro analítico analisado, às incertezas das medições e estar em conformidade com as normas regulamentadoras, que possuem parâmetros de validação analítica bem definidos<sup>61</sup>.

Em contraposição, as análises não alvo (*non-targeted analysis*) buscam o reconhecimento de padrões no conjunto de dados obtendo-se a chamada matriz de impressão digital (*fingerprint*), ou seja, uma matriz que contém informações sobre a composição geral das amostras. Por se tratar de uma técnica de investigação analítica, a análise não alvo é amplamente utilizada como método de triagem (*screening*)<sup>61</sup>. Entretanto, este tipo de análise gera um grande

volume de dados e exige tratamento estatístico multivariado. As técnicas analíticas mais utilizadas no campo da análise de impressões digitais de amostras de alimentos são as técnicas espectroscópicas, como a ressonância magnética nuclear (RMN), a espectroscopia no infravermelho próximo (NIR), a espectroscopia no infravermelho médio (FTIR) e a espectroscopia Raman.

A aplicação da estratégia *non-targeted* para análise de alimentos em combinação com métodos estatísticos multivariados para identificar e atestar a autenticidade da amostra têm crescido no campo da ciência dos alimentos. Em consonância com o crescimento da aplicação de métodos de reconhecimento de padrões, a Farmacopeia Americana apresentou diretrizes para o desenvolvimento e validação analítica de métodos *non-targeted* para a detecção de fraudes em alimentos a partir de 2017<sup>61; 62</sup>.

De um modo geral, a análise de reconhecimento de padrões pode ser dividido em dois grupos: métodos supervisionados e métodos não supervisionados de análise. Nos métodos supervisionados, informações sobre a classe da amostra analisada é conhecida anteriormente à análise quimiométrica e utilizada para a construção dos modelos. Em contrapartida, os métodos não supervisionados não requerem informações prévias acerca das amostras analisadas, fornecendo resultados a partir do agrupamento natural dos dados analíticos<sup>58</sup>.

A análise exploratória (ou classificação não supervisionada) é utilizada para identificação de padrões dentro de um conjunto de dados, estabelecendo correlações entre os objetos e verificando a existência de amostras anômalas na matriz de dados analíticos. Os métodos de reconhecimento de padrões não supervisionados podem ser utilizados, ainda, para classificação de amostras e resolução de curvas<sup>60</sup>. Os dois métodos mais utilizados para este tipo de tratamento são a análise hierárquica de agrupamentos (HCA – *Hierarchical Cluster Analysis*) e a análise por componentes principais (PCA – *Principal Component Analysis*)<sup>60</sup>.

Métodos de reconhecimento de padrões supervisionados são utilizados quando forem conhecidas as atribuições das classes das amostras. Estes podem ser divididos em dois grupos: métodos de modelagem de classes e métodos de análise discriminante. Os métodos de modelagem de classe consideram cada classe individualmente, sem levar em conta informações relativas às demais classes. Os métodos discriminantes definem um ou mais delimitadores entre duas ou mais classes, dividindo o hiperespaço das variáveis em um número correspondente de regiões<sup>58</sup>. É possível a utilização de um método supervisionado, no qual regras de classificação são fornecidas baseadas em medidas multivariadas, havendo um conjunto de amostras para as quais se sabe *a priori* a quais classes pertencem, chamado conjunto de treinamento<sup>59</sup>.

Os métodos de classificação supervisionada mais utilizados são o método do K-ésimo vizinho mais próximo – KNN (*K<sup>th</sup> Nearest Neighbour*), modelagem independente e flexível por analogia de classes utilizando componentes principais - SIMCA (*Soft Independent Modelling of Class Analogies*), a análise discriminante linear - LDA (*Linear Discriminant Analysis*) e a análise discriminante por mínimos quadrados parciais - PLS-DA (*Partial Least Squares Discriminant Analysis*). Dentre esses métodos, o que vem tendo o maior aumento no número de aplicações encontradas na literatura quimiométrica nos últimos anos é o PLS-DA, devido à sua robustez e versatilidade.

### 2.5.1.1 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA)

A PCA é um método quimiométrico que permite a redução da dimensionalidade de uma matriz de dados, extraindo o máximo de informação. Devido a determinação de novas variáveis a partir da combinação linear das variáveis originais, este método também facilita a interpretação dos dados. Estas variáveis são chamadas de componentes principais (CPs) e descrevem as tendências relativas subjacentes dos dados analíticos a partir do agrupamento natural dos dados.

A primeira CP é descrita na direção de maior variância da informação multivariada e a segunda CP é descrita no eixo ortogonal à primeira CP que apresente a maior variância residual. A terceira CP explica a maior variância residual e é ortogonal às duas primeiras, e assim por diante<sup>63</sup>.

Considerando um conjunto de dados espectroscópicos, a matriz de dados **X** será organizada de modo que cada linha corresponda a uma amostra e cada coluna corresponda a uma variável, como mostrado na Figura 6.

A transformação matemática de mudança de sistema de coordenadas realizada pela PCA é descrita pela equação 1:

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

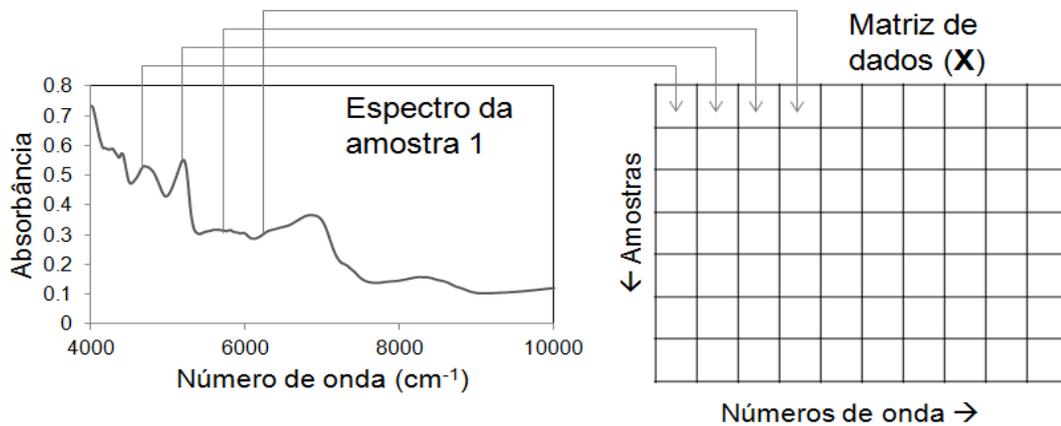


Figura 6 - Representação da organização da matriz  $X$  a partir de dados espectroscópicos<sup>64</sup>.

Em que  $\mathbf{T}$  é a matriz de escores, a qual possui o mesmo número de linhas que a matriz original e o número de colunas igual ao número de CPs;  $\mathbf{P}$  é a matriz de pesos (*loadings*) e tem o número de linhas igual ao de colunas na matriz original;  $\mathbf{E}$  contém os resíduos, ou seja, a variância não descrita pelas CPs incluídas no modelo. A decomposição dos dados descrita na Eq. 1 é feita através de uma operação de autovetores e o número de CPs é igual ao número de vetores linearmente independentes da matriz.

Escores (composição de cada CP em termos das amostras) e pesos (composição em termos de variáveis) formam matrizes ortogonais, ou seja, as CPs que as constituem apresentam independência<sup>63</sup>. A multiplicação do vetor  $t_1$  pelo vetor  $p_1$  obtém-se a matriz  $\mathbf{X}_1$ , que representa os dados reconstruído somente com a primeira CP:

$$\mathbf{X}_1 = \mathbf{t}_1 \mathbf{p}_1^T \quad (2)$$

As demais componentes são calculadas de modo similar. Desta forma, o modelo PCA pode ser representado pela seguinte soma de produtos vetoriais:

$$\mathbf{X}_1 = \mathbf{t}_1 \mathbf{p}_1^T + \mathbf{t}_2 \mathbf{p}_2^T + \dots + \mathbf{t}_A \mathbf{p}_A^T + \mathbf{E} \quad (3)$$

A escolha do número de CPs é uma das etapas mais importantes na PCA. O número de CPs escolhido deve ser igual ao número de fontes de variação linearmente independentes presentes nos dados. De forma geral, a escolha é feita considerando a quantidade de variância modelada e o conhecimento químico<sup>63</sup>.

A PCA também permite identificar a presença de amostras anômalas em um conjunto de dados. Esta detecção é feita por meio da observação de dois parâmetros, os resíduos  $Q$ , que estão relacionados à variância residual não modelada, e os valores de  $T^2$  de Hotelling, que mostram a influência da variância incluída no modelo para cada amostra. Amostras que possuam simultaneamente altos valores de  $Q$  e  $T^2$  são consideradas anômalas (*outliers*).

### 2.5.1.2 MÉTODOS DE CLASSIFICAÇÃO SUPERVISIONADOS

Em métodos discriminantes é definido um limite de decisão entre duas ou mais classes em estudo, o qual determina se os dados amostrais são classificados como pertencentes a uma classe ou a outra classe, conforme observado na Figura 7 (a). Entretanto, para a determinação deste limiar de classificação é necessário que as duas classes sejam bem definidas e representativas. Considerando um caso de fraude em alimentos, por exemplo, em que a classe A representa amostras não adulteradas e a classe B representa amostras adulteradas, é necessário haver um certo número de amostras representativas de cada classe. Especificamente para a classe adulterada, é necessário haver amostras representativas dos tipos de fraude que podem ocorrer quando o modelo for aplicado<sup>63</sup>.

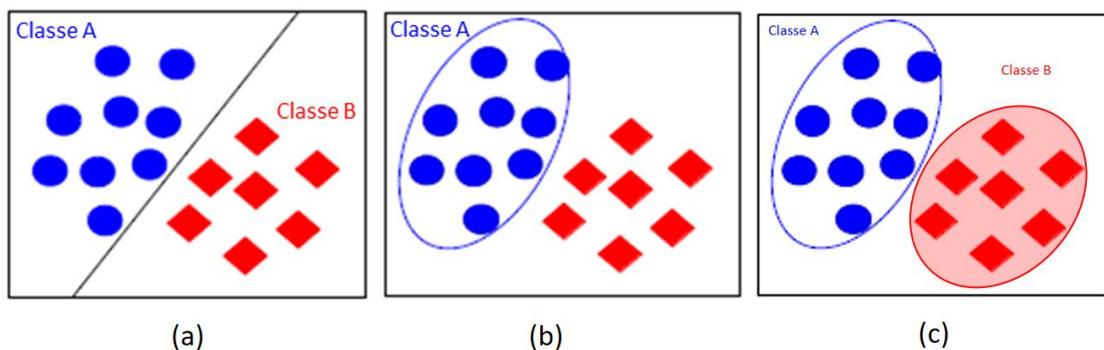


Figura 7 - Diferenças entre modelos (a) discriminantes de duas classes; (b) modelagem de uma classe (one class); (c) modelagem multiclasse (multiclass). (Imagens adaptadas)<sup>63</sup>

O limite de decisão definido identifica regiões distintas no espaço amostral e determina a atribuição das amostras nas classes estudadas. Por se tratar de um delimitador entre duas classes, as áreas não se sobrepõem e, conseqüentemente, as amostras não podem ser atribuídas a duas classes simultaneamente. Para as amostras atribuídas exatamente sobre o limite de classificação, pode-se calcular o intervalo de confiança para esta atribuição a partir do método *bootstrap* (discutido em detalhes na seção 2.5.5)<sup>65</sup>. De maneira similar, não seria possível a classificação de uma amostra como não pertencente a nenhuma das classes pré-definidas. Esta versão binária do modelo PLS-DA é algumas vezes denominada de PLS-DA rígido (*hard PLS-DA*)<sup>66</sup>. Dentre os principais modelos discriminantes descritos na literatura, destacam-se a análise discriminante linear (LDA – *Linear Discriminant Analysis*) e a análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA – *Partial Least Squares Discriminant Analysis*).

Os métodos de modelagem de classe consideram cada classe de forma individual, ou seja, cada classe é modelada separadamente. Este tipo de método é baseado na similaridade entre as amostras de uma mesma classe. Os métodos de modelagem de classe podem ser de classe única ou multiclasse. A modelagem de classe única é baseada no fato de cada grupo de amostras ser analisado como um modelo separado, a fim de verificar a compatibilidade das amostras desconhecidas com a classe de amostras modeladas. Esta classificação é obtida a partir da determinação de um limite em torno das amostras da classe de interesse estudada (Figura 7 - (b)). As informações provenientes das amostras não pertencentes à classe de interesse não são consideradas para a construção do modelo, evitando a aquisição de dados de todas as possíveis fontes de variação dos modelos extraclasse. Desta forma, a amostra é atribuída como pertencente àquela classe, se estiver dentro do limite definido para a classe, ou é atribuída como uma amostra não pertencente à classe, se estiver fora desse limite<sup>65</sup>.

Na modelagem multiclasse (Figura 7 - (c)), diversas classes são modeladas individualmente e o espaço amostral é dividido em várias regiões de acordo com o número de classes. Considerando a modelagem de duas ou mais classes, os espaços definidos para as diferentes classes de amostra podem se sobrepor, fornecendo regiões em que as amostras pertençam a mais de uma classe simultaneamente<sup>65</sup>. De forma complementar, caso uma amostra seja muito diferente das classes em estudo, esta pode ser classificada como não pertencente à nenhuma das classes modeladas. O principal método de modelagem de classe é modelagem independente e flexível por analogia de classes - SIMCA (*Soft Independent Modelling of Class Analogies*).

A predominância de métodos discriminantes, como o PLS-DA, para análise da autenticidade de alimentos é criticada por alguns autores na literatura quimiométrica. Eles argumentam que é inviável a obtenção de amostras representativas de todos os tipos de fraude, tornando a classe adulterada modelada não representativa. Desta forma, os métodos quimiométricos de classificação mais adequados para a identificação de fraudes alimentares seriam os métodos de modelagem de classe, pois exigem a utilização de amostras representativas de apenas uma classe de interesse, nesse caso, das amostras não adulteradas<sup>65</sup>; <sup>66; 67</sup>.

Entretanto, outros autores apontam a utilização do modelo discriminante PLS-DA associado com a detecção de *outliers* como alternativa para a construção de modelos de classificação flexíveis (*soft*, em oposição ao *hard*) para a detecção de fraudes em alimentos<sup>68</sup>. Desta forma, amostras muito diferentes das amostras modeladas, como novos tipos de fraudes,

serão detectadas como *outliers* e não serão atribuídas a nenhuma das classes modeladas. Para cada classe, em função de critérios específicos do método, é verificado se uma amostra é bem ajustada pelo respectivo modelo de classe (aceito) ou não (rejeitado)<sup>69</sup>.

Em função das críticas e do debate mencionado no parágrafo anterior, novos métodos de modelagem de classe baseados no PLS foram propostos para problemas de autenticidade, tais como o PLS-DM (PLS *density modeling*) proposto em 2014 por Oliveri<sup>70</sup> e colaboradores, e o OC-PLS (*one-class PLS*) proposto por Xu e coautores em 2013<sup>71</sup>. Mais recentemente, uma versão denominada *soft PLS-DA* foi proposta, na qual uma amostra pode ser classificada em mais de uma classe ou não pertencente a nenhuma das classes, baseando-se em certos critérios<sup>66</sup>. No entanto, conforme já mencionado, o termo *soft PLS-DA* é mais abrangente do que esta versão específica, e pode falar de *soft discriminant models* em geral, adotando-se condições específicas para a atribuição das amostras em função de cada problema em particular. Desta maneira, tira-se vantagem da flexibilidade intrínseca de modelos de classificação supervisionada.

#### **2.5.1.2.1 MODELAGEM FLEXÍVEL E INDEPENDENTE POR ANALOGIA DE CLASSES (SIMCA)**

O SIMCA foi desenvolvido em 1976 por Svante Wold<sup>72</sup>. É um método baseado na estimativa das distâncias das amostras e foi o primeiro método de classificação introduzido na Quimiometria. Assim, por muitos anos a palavra SIMCA foi considerada como um sinônimo de Quimiometria<sup>58; 65</sup>, dando nome inclusive a um dos primeiros *softwares* quimiométricos.

Baseado no conceito de modelagem flexível de classes (*soft modelling*), o método SIMCA permite a sobreposição de duas ou mais classes sem uma delimitação rígida entre elas. Desta forma, o SIMCA pode ser utilizado como um método de modelagem de uma única classe ou de modelagem multiclasse. Além disso, este método apresenta a característica de modelar as classes de forma independente e separadamente (*independent modelling*). Desta forma, o modelo não é influenciado por amostras que não pertencem à classe de interesse modelada. Esta última característica apresenta grande vantagem em análise quimiométrica, pois a inserção de uma nova amostra no modelo SIMCA não altera as características das classes já modeladas.

O modelo SIMCA é baseado na análise de componentes principais, as quais, por definição, são as direções de máxima variância explicada em um espaço multivariado de dados<sup>65</sup>. Neste método, um modelo de componentes principais é ajustado para cada classe do

conjunto que contém as amostras conhecidas, denominado conjunto treinamento, fornecendo um limite de classificação para cada classe<sup>58</sup>.

Para o desenvolvimento de um método SIMCA, inicialmente deve ser feito o pré-processamento da matriz de dados (autoescalamamento ou centrar na média). Em seguida, o número de CP para cada classe é determinado por validação cruzada. Por fim, é definida a distância entre cada amostra e o espaço multidimensional referente à classe modelada. Para a classificação das amostras em um modelo SIMCA, os escores e os resíduos espectrais são avaliados e intervalos são estimados em determinado nível de confiança. Os limites da classe modelada são determinados a partir de um teste F<sup>65</sup>. Desta forma, amostras que não estejam incluídas na região modelada ou que apresentem resíduos espectrais superiores ao limite estimado são classificadas como amostras não pertencentes à classe de interesse modelada.

Quantitativamente, a distância entre uma amostra ao centro da classe modelada em um método SIMCA é determinada pela equação 4, em que  $d_i$  é a distância da amostra  $i$  à classe modelada, o valor de  $T^2$  de Hotelling é calculado a partir da matriz de escores e refere-se à influência de cada amostra no modelo, e  $Q$  representa os resíduos espectrais.  $T^2_{95\%}$  e  $Q_{95\%}$  representam os valores limites calculados a um nível de 95% de confiança<sup>73</sup>.

$$d_i = \sqrt{\left(\frac{T^2}{T^2_{95\%}}\right)^2 + \left(\frac{Q}{Q_{95\%}}\right)^2} \quad (4)$$

Caso um conjunto de dados possua duas ou mais classes significativas e bem representadas, o método SIMCA pode ser utilizado como um método discriminante. Tradicionalmente, o método SIMCA delimita um espaço independente para cada classe. Entretanto, em uma abordagem discriminante, um limite entre as duas classes é calculado de forma que a distância entre as duas classes seja a mesma. Todavia, este limite apresenta uma forma típica não-linear que pode resultar em uma capacidade de classificação menor que o alcançado por métodos discriminantes clássicos aplicados após a análise exploratória por PCA<sup>65</sup>.

### 2.5.1.2.2 ANÁLISE DISCRIMINANTE POR MÍNIMOS QUADRADOS PARCIAIS (PLS-DA)

Desenvolvido inicialmente como uma ferramenta de calibração multivariada, o método dos mínimos quadrados parciais (PLS – *Partial Least Squares*) tem sido utilizado com propósitos de classificação a partir da modificação do seu algoritmo iterativo não-linear de mínimos quadrados parciais (NIPALS, *non-linear iterative partial least squares*)<sup>74; 75</sup>.

Dois tipos de abordagem são descritos para o PLS-DA. Nas duas abordagens cada classe (variável dependente) é discriminada separadamente em relação às demais, de modo que um vetor binário  $\mathbf{y}$  designe valor 1 para amostras modeladas pertencentes à classe específica e valor 0 para amostras não pertencentes a esta classe. Quando um vetor relativo à cada classe é previsto de cada vez, este método é denominado PLS1-DA<sup>76</sup>, ilustrado na Figura 8 (a), em que o número 1 indica que a matriz de dados independentes ( $\mathbf{X}$ ) é correlacionada com um arranjo unidimensional de cada vez (vetor  $\mathbf{y}$ ). A segunda abordagem refere-se ao método PLS2-DA, em que todas as classes são modeladas conjuntamente<sup>76</sup>, conforme a Figura 8 (b). O número 2 indica que a matriz  $\mathbf{X}$  é correlacionada com um arranjo de dados bidimensional, de ordem 2 (matriz  $\mathbf{Y}$ ).

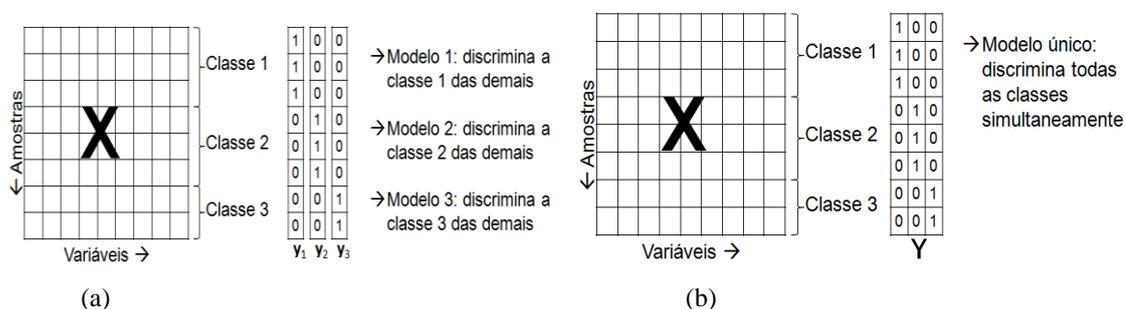


Figura 8 - Representação do modelo (a) PLS1-DA (b) PLS2-DA<sup>64</sup>.

A principal diferença do PLS-DA em relação ao PLS é a utilização de variáveis categóricas (*dummy variables*) no bloco  $\mathbf{Y}$ , as quais definem o pertencimento ou não de uma amostra a uma determinada classe (1 ou 0, respectivamente). O modelo, então, estimará um valor para  $\mathbf{Y}$ . Entretanto, este valor poderá não ser exatamente igual a 0 ou 1. Um limite de decisão (*threshold*) precisa ser definido, podendo arbitrariamente ser fixado (em 0,5, por exemplo) ou, mais frequentemente, estimado pela teoria Bayesiana. Valores de  $y$  acima deste limite de decisão indicam que a amostra pertence à respectiva classe, enquanto valores abaixo dele indicam que a amostra não pertence à classe. Para cada classe, é definido um limite de decisão (*threshold*)<sup>75</sup>.

A probabilidade de uma amostra pertencer a uma classe  $A$ , dado um valor particular de  $y$ , pode ser calculada da seguinte forma, segundo a teoria Bayesiana:

$$P(A|y) = \frac{P(y|A)*P(A)}{[P(y|A)*P(A)+P(y|B)*P(B)]} \quad (5)$$

Em que  $P(A)$  e  $P(B)$  são as probabilidades de observação futura das classes  $A$  e  $B$ . Assumindo a probabilidade Bayesiana de um resultado ser previsto *a priori* como adulterado ( $P(A)$ ) ou não ( $P(B)$ ), ou seja, a possibilidade de observar as classes  $A$  e  $B$  similar à quantidade de amostras no conjunto treinamento original, se usa 0,5, embora seja uma aproximação. Para os casos em que  $P(A)$  se iguala a  $P(B)$ , obtêm-se as seguintes equações:

$$P(A|y) = \frac{P(y|A)}{P(y|A)+P(y|B)} \quad (6)$$

$$P(B|y) = \frac{P(y|B)}{P(y|A)+P(y|B)} \quad (7)$$

Assumindo que uma amostra em teste pertença a uma de duas classes possíveis,  $A$  ou  $B$ , pode-se afirmar que:

$$P(A|y) + P(B|y) = 1 \quad (8)$$

As duas distribuições -  $P(A|y)$  e  $P(B|y)$  – geralmente se cruzam em um único ponto, denominado limite de decisão (*threshold*)<sup>76</sup>.

Assim como no PLS, a escolha do número de variáveis latentes (VLs) é uma das etapas mais importantes para o ajuste do modelo. Essa escolha é feita por meio de validação cruzada. Nesta etapa, uma parte das amostras ou apenas uma amostra do conjunto de treinamento é selecionada e constrói-se o modelo com as restantes. Em seguida, utilizando diferentes números de variáveis latentes (VLs), os erros de previsão para as amostras separadas são estimados. Esse processo é repetido para outras amostras, até que todas tenham ficado de fora e tenham sido testadas. Existem vários tipos de validação cruzada, dependendo de como a amostra, ou o subconjunto de amostras, é selecionada da matriz de dados. Os mais comuns são *leave-one-out*, blocos contínuos, subconjuntos aleatórios e venezianas (*venetian blinds*). Em toda esta tese será usada validação cruzada do tipo venezianas, que divide o conjunto de amostras em intervalos igualmente espaçados.

O critério para a escolha do número de VLs em aplicações de calibração multivariada usando PLS e nas primeiras aplicações de classificação supervisionada usando PLS-DA,

desenvolvidas no início da década passada, era o menor valor da raiz quadrada do erro médio quadrático de validação cruzada (RMSECV, *root mean square error of cross-validation*). No entanto, para modelos de classificação PLS-DA o mais importante é o número de amostras corretamente classificadas e não a magnitude do erro de previsão da variável categórica. Desta forma, o critério atualmente adotado é o menor erro de classificação de validação cruzada (CVCE, *cross-validation classification error*)<sup>77</sup>.

### 2.5.1.2.3 FIGURAS DE MÉRITO QUALITATIVAS

A fim de obter parâmetros de validação dos modelos multivariados construídos, figuras de mérito qualitativas devem ser calculadas. Após a definição do *threshold*, procede-se à detecção do número de falsos positivos – FP (amostras que não pertencem à classe e foram classificadas como pertencentes) e à detecção do número de falsos negativos – FN (amostras que pertencem a classe e foram classificadas como não pertencentes). A taxa de falsos positivos (TFP) é definida como a razão entre FP e a soma de FP e o número total de amostras negativas conhecidas (VN)<sup>76</sup>:

$$TFP = \frac{FP}{FP+VN} \quad (9)$$

De forma análoga, a taxa de falsos negativos (TFN) é definida como a razão entre FN e a soma de FN e o número total de amostras positivas conhecidas (VP)<sup>76</sup>:

$$TFN = \frac{FN}{FN+VP} \quad (10)$$

O cálculo de figuras de mérito específicas, como sensibilidade, especificidade (ou seletividade) e taxa de confiabilidade permite a validação analítica qualitativa do método. A sensibilidade consiste na habilidade de detecção de amostras verdadeiramente positivas. A taxa de sensibilidade (SEN) é calculada como a porcentagem referente à razão entre VP e a soma de VP e FN, conforme equação abaixo<sup>76</sup>.

$$SEN = \frac{VP}{VP+FN} * 100 \quad (11)$$

A especificidade ou seletividade consiste na habilidade de detecção de amostras verdadeiramente negativas<sup>78</sup>. A taxa de especificidade (SPE) é calculada como a porcentagem referente à razão entre TN e a soma de TN e FP, conforme demonstrado abaixo<sup>76</sup>.

$$SPE = \frac{VN}{VN+FP} * 100 \quad (12)$$

A diferença entre o percentual total de resultados e a soma das taxas de falso positivo e falso negativo é conhecida como taxa de confiabilidade (TCONF):

$$TCONF = 100 - (TFP + TFN) \quad (13)$$

As figuras de mérito SEN e SPE estão relacionadas à seletividade do método analítico, enquanto as figuras TFP, TFN e TCONF expressam a veracidade da análise qualitativa<sup>76; 78</sup>. Cabe ressaltar que o significado dos termos sensibilidade e especificidade, quando usados em análise qualitativa, é diferente de seu uso em análise quantitativa.

### **2.5.2 ALGORITMO DE KENNARD-STONE (KS)**

Neste trabalho, a separação das amostras em conjuntos de treinamento e teste foi realizada pelo algoritmo de seleção de Kennard-Stone. Este algoritmo define as duas amostras com a maior (ou com a menor) distância Euclidiana entre si. Em seguida, é selecionada a amostra mais distante das duas amostras inicialmente selecionadas. Este processo é repetido até a seleção da quantidade de amostras previamente definida pelo analista. As amostras selecionadas compõem o conjunto de treinamento. Assim, o algoritmo Kennard-Stone garante a presença de amostras homogeneamente distribuídas no espaço amostral e representativas do modelo no conjunto de treinamento<sup>79</sup>. Em modelos de classificação supervisionada, como o PLS-DA, este algoritmo é aplicado às amostras de cada classe separadamente.

### **2.5.3 VIP scores**

Para a caracterização espectral de modelos PLS e PLS-DA, é comum a utilização da análise dos coeficientes de regressão. Entretanto, estes coeficientes são dependentes da composição das amostras no conjunto de calibração/treinamento, da covariância implícita entre os componentes dessas amostras e da relação sinal/ruído dos dados analíticos. A interpretação espectral não deve, portanto, basear-se somente nesses coeficientes<sup>80</sup>.

Uma ferramenta mais robusta e confiável para a interpretação espectral são os gráficos de importância das variáveis na projeção dos escores (*VIP scores – Variable Importance in Projection*). Os *VIP scores* estimam a importância de cada variável na projeção utilizada pelo modelo PLS ou PLS-DA através dos coeficientes em cada componente, juntamente com a significância de cada componente na regressão em módulo. Já os coeficientes de regressão apresentam as variáveis que mais contribuem às previsões do modelo, sem apresentar, entretanto, a correlação em módulo entre as regiões espectrais mais importantes. Essa contribuição pode ser positiva, relacionada à classe 1, ou negativa, relacionada à classe 0. Desta forma, os *VIP scores* são considerados mais robustos que os coeficientes de regressão para identificar quais variáveis são mais significativas para o modelo preditivo<sup>67; 80</sup>.

Assim, os *VIP scores* podem ser utilizados, também, para a seleção de variáveis mais significativas. O critério mais usado para a seleção da variável  $j$  é os valores dos *VIP scores* serem maiores ou iguais a 1,0. Entretanto, este valor pode ser redefinido dependendo do modelo em particular. A importância da variável de previsão  $j$  com base no modelo com  $h$  VLs pode ser calculada por:

$$VIP_j = \sqrt{\frac{J}{\sum_h SS(b_h t_h)} \sum_h w_{hj}^2 SS(b_h t_h)} \quad (14)$$

Em que  $J$  é o número de variáveis previstas,  $w_{hj}$  é o peso (*weight*) da  $j^{\text{ésima}}$  variável prevista no  $h^{\text{ésimo}}$  fator PLS e  $SS(b_h t_h)$  é a porcentagem de  $\mathbf{Y}$  explicada pela  $h^{\text{ésima}}$  VL<sup>67</sup>.

#### 2.5.4 DETECÇÃO DE OUTLIERS

Nos últimos anos, alguns autores criticaram a grande prevalência de análise discriminante sobre modelagem de classes aplicada a problemas de autenticação de alimentos<sup>65</sup>;<sup>81</sup>. A principal crítica aos métodos discriminantes é a sua incapacidade de classificar novas amostras que não pertençam às classes predefinidas. No entanto, outros autores propuseram alternativas para superar essa limitação combinando o PLS-DA com uma metodologia de detecção de *outliers* em um tipo de modelo discriminante suave/flexível (*soft PLS-DA*)<sup>68</sup>. Nesta proposta, a determinação do pré-processamento e o número de variáveis latentes é baseada nos valores de erro quadrado médio da validação cruzada (RMSECV) obtidos pela validação cruzada utilizando venezianas (*venetian blinds*). Segundo os autores, o erro de classificação da validação cruzada (CVCE) não deve ser utilizado nesses casos porque, se a amostra for corretamente classificada, não penaliza amostras que apresentem erros elevados no valor estimado da classe ( $\hat{y}_i$ ). E um intervalo de confiança para os valores de  $y$  previsto será justamente um dos critérios para detectar *outliers*.

Três parâmetros foram propostos para a detecção de *outliers*. O primeiro parâmetro é baseado na variância residual de cada amostra pela análise dos resíduos espectrais  $Q$ , parâmetro que avalia a falta de ajuste de cada espectro individual no modelo PLS-DA. Em um estudo de fraudes, por exemplo, a presença de adulteração em uma amostra pode ser determinada a partir do valor de resíduo  $Q$  superior a um valor  $Q_{\text{limite}}$  definido com um intervalo de confiança determinado e na distribuição dos  $Q$ s observados para as amostras adulteradas utilizadas no conjunto treinamento<sup>68</sup>.

O segundo parâmetro utilizado para a detecção de amostras anômalas é o  $T^2$  de Hotelling. Este parâmetro mede a distância da amostra ao centro do modelo PLS-DA. Desta

forma, a variância modelada em cada amostra do modelo é usada para a identificação de *outliers*, definido outro valor limite no nível de confiança escolhido<sup>68</sup>.

Esses dois parâmetros são usados para detectar uma "causa especial" que classifica a amostra como uma amostra anômala. Os *outliers* podem ser observados somente no gráfico Q, caso ocorra uma nova variação a qual não é descrita pelo modelo. Podem, também, ser observados apenas no gráfico T<sup>2</sup> se a relação do modelo não for alterada e o processo for perturbado em uma ou mais variáveis modeladas. *Outliers* podem ser determinados, ainda, pela combinação da primeira e da segunda situações descritas acima<sup>82</sup>.

O último parâmetro é baseado nos erros dos valores estimados ( $\mathbf{y}$ ). O uso deste parâmetro é uma proposta relativamente original, encontrada em poucos trabalhos na literatura. Aplicações da versão flexível do PLS-DA foram publicadas por Braga e colaboradores, entre eles a detecção de uísques falsificados usando espectroscopia de absorção UV-Vis<sup>68</sup>, a discriminação de tintas pretas em documentos de escrita usando espectroscopia de refletância visível<sup>83</sup>, e a discriminação de seis espécies de madeira amazônicas semelhantes com um dispositivo portátil NIR<sup>84</sup>. Este parâmetro aplica o teste t de Student sobre os resíduos de previsão para identificar amostras no conjunto de treinamento que apresentam altos erros nos valores de classe, considerando a correção de *bias* (viés) proposta por da Silva e colaboradores (2014)<sup>83</sup>. Nesta abordagem, a influência da amostra é determinada e o erro médio quadrático é estimado usando as amostras de treinamento após a correção do *bias* para cada classe.

Considerando estas características, dois critérios foram estabelecidos para a identificação de amostras anômalas: se o espectro da amostra apresenta alto valor de T<sup>2</sup> de Hotelling e, simultaneamente, alto valor de resíduos Q para o nível de confiança de 95% ou se o espectro da amostra apresenta alto valor de erro estimado para a classe de acordo com o teste de resíduos de Student com correção de *bias* a 99,9% de confiança, conforme definido na Eq. 15.

$$t_{student,i} = \frac{e_i - bias}{RMSEC_{bias} \sqrt{1 - h_i}} \quad (15)$$

Em que  $e_i$  são os erros estimados no valor de classe ( $\hat{y}_i - y_i$ ) para a amostra  $i$ ,  $RMSEC_{bias}$  é o erro quadrático médio estimado usando as amostras de treinamento após a correção do *bias* e  $h_i$  é a influência (*leverage*) estimada de cada amostra no modelo.

Para o segundo critério, o limite superior foi calculado acima da classe adulterada e o limite inferior foi estimado abaixo da classe não adulterada. Estes parâmetros foram calculados a partir da adaptação do teste de resíduo t de Student de acordo com as Eqs. 16 e 17, respectivamente<sup>68</sup>:

$$y_{\text{limitesuperior,adulterada}} = 1 + bias_{\text{adult}} + (t_{99,9,v} RMSEC_{\text{bias}} \sqrt{1 - \bar{h}_c}) \quad (16)$$

$$y_{\text{limiteinferior,n-adult}} = 0 + bias_{\text{n-adult}} - (t_{99,9,v} RMSEC_{\text{bias}} \sqrt{1 - \bar{h}_c}) \quad (17)$$

Em que  $\bar{h}_c$  corresponde à influência (*leverage*) médio do conjunto de treinamento.

De acordo com este critério, as amostras de validação/previsão identificadas como *outliers* serão as amostras que apresentarem valores de classe significativamente superiores aos valores de classe estimados observados nas amostras de treinamento para a classe adulterada ou significativamente inferiores aos valores de classe estimados observados nas amostras de treinamento para a classe não adulterada, levando em conta os níveis de confiança de 99,9%.

### 2.5.5 MÉTODO DE REAMOSTRAGEM *BOOTSTRAP*

O método de reamostragem *bootstrap* é empregado para estimar parâmetros estatísticos, como viés, desvio padrão e intervalo de confiança em situações nas quais técnicas convencionais não se aplicam<sup>85</sup>. Desenvolvido em 1979 por Efron, ele tem sido utilizado para a estimativa de média, taxa de erro em análise discriminante, estimativas de modelos de regressão e validação cruzada<sup>86</sup>.

Em muitas aplicações de processamento de sinais, são objetivos a estimativa de parâmetros desconhecidos em um processo aleatório usando um conjunto de dados e a obtenção de estimativa da distribuição amostral para o cálculo de médias, variâncias e intervalos de confiança. Desta forma, espera-se que o conjunto de dados amostral seja suficientemente grande para tais determinações. Entretanto, na prática, inúmeras vezes é difícil a obtenção de conjuntos de dados com tamanho adequado para as previsões de parâmetros e cálculo dos intervalos. Como alternativa, o *bootstrap* possui grande aplicabilidade em problemas analíticos<sup>85</sup>.

De uma forma geral, o *bootstrap* é um método estatístico computacional capaz de gerar estimativas de parâmetros analíticos<sup>87</sup>: os dados são reatribuídos aleatoriamente e as estimativas são recalculadas. Este procedimento é realizado centenas ou milhares de vezes e os dados obtidos são tratados no modelo quimiométrico como repetição estatística de experimentos<sup>85</sup>. Ao realizar sucessivas reamostragens, uma boa estimativa dos parâmetros pode ser obtida. Estas estimativas podem ser vistas como aproximações às estimativas verdadeiras de forma que o viés, desvio padrão e intervalo de confiança possam ser calculados<sup>87</sup>.

O método *bootstrap* existe em duas configurações: paramétrica e não paramétrica. Na versão não paramétrica, a reamostragem é realizada pela distribuição empírica por substituição,

enquanto na versão paramétrica, a distribuição é estimada por um modelo paramétrico, como a distribuição normal<sup>87</sup>.

Neste trabalho, o *bootstrap* foi aplicado para o cálculo do intervalo de confiança das amostras no modelo PLS-DA. Com esta finalidade, o *bootstrap* residual foi empregado de acordo com o procedimento apresentado por Almeida et al. (2013)<sup>88</sup>. O primeiro passo foi calcular os resíduos do modelo PLS-DA, de acordo com a equação 18.

$$e = Y - \hat{Y} \quad (18)$$

Os resíduos são corrigidos pelo número de graus de liberdade, nesse caso foi empregado o conceito de pseudo-graus de liberdade proposto por Van der Voet<sup>89</sup> que considera o erro médio quadrático de calibração (MSEC) e de validação cruzada (MSECV), conforme equação 19.

$$gl = N \left( 1 - \sqrt{\frac{MSEC}{MSECV}} \right) \quad (19)$$

Após o cálculo do número de graus de liberdade (gl), os resíduos são corrigidos de acordo com a equação abaixo:

$$e = \frac{Y_{ref} - Y_{PLS}}{\sqrt{\left(1 - \frac{gl}{N}\right)}} \quad (20)$$

A reamostragem é feita a partir de substituições aleatórias e com reposição dos valores dos resíduos corrigidos. Essa reamostragem é feita *b* vezes, no final obtêm-se uma matriz de resíduos **B**. Os resíduos *bootstrap* são adicionados aos valores de  $\hat{y}$  (valores previstos pelo modelo PLS-DA), gerando uma matriz  $Y^*$ .

$$Y^* = Y_{PLS} + F^* \quad (21)$$

Um novo modelo PLS-DA é calculado a partir de  $Y^*$ , gerando novos vetores de coeficiente de regressão ( $\beta^*$ ) e estimativas de  $\hat{Y}^*$ . Uma nova matriz de resíduos é calculada:

$$\hat{F}^* = Y^* - \hat{Y}^* \quad (22)$$

Para a estimativa do intervalo de confiança para cada amostra do modelo PLS-DA, o método do percentil foi empregado. Os valores dos resíduos para cada amostra são ordenados em ordem crescente, e o intervalo de confiança com nível de significância  $\alpha$  é obtido de acordo com a equação 23:

$$\hat{F}_{b\left(\frac{\alpha}{2}\right)}^* \leq y_a \leq \hat{F}_{b\left(1-\frac{\alpha}{2}\right)}^* \quad (23)$$

## 2.5.6 MÉTODO DE RESOLUÇÃO MULTIVARIADA DE CURVAS (MCR – *Multivariate curve resolution*)

O método de resolução multivariada de curvas pertence ao conjunto de técnicas de análise de fatores (*Factor analysis*). O MCR é um método quimiométrico de processamento de sinal analítico cujo objetivos são o isolamento e a resolução de mistura de sinais em análises qualitativas e a quantificação de fontes de variação em um conjunto de dados. A resolução de sinal analítico de misturas ocorre a partir da determinação da contribuição individual das espécies químicas presentes na amostra, ainda que não estejam disponíveis informações acerca da natureza e composição destas espécies<sup>90</sup>.

A aplicação do MCR depende da relação linear entre o sinal analítico e a concentração das espécies na amostra. A espectroscopia vibracional atende tal requisito por obedecer à Lei de Lambert-Beer na qual a absorvância (A) para um sistema é a soma das absorvâncias individuais em um determinado comprimento de onda<sup>90</sup>.

Este método pode ser utilizado em dados de primeira ordem (uma única matriz) ou simultaneamente em matrizes de dados de cada amostra (dados de segunda ordem)<sup>90</sup>. De um modo geral, este método propõe a decomposição da matriz de dados **D** em um produto de duas outras matrizes, **C** e **S<sup>T</sup>**, que contêm, respectivamente, as informações sobre a concentração relativa e absorvância molar de cada espécie, conforme a equação 24:

$$\mathbf{D} = \mathbf{C} \cdot \mathbf{S}^T + \mathbf{E} \quad (24)$$

Ou seja, cada elemento da matriz de dados **D** é resultado do produto interno de um vetor linha da matriz de concentração **C** e um vetor coluna da matriz dos espectros **S<sup>T</sup>** dos constituintes puros (Figura 9). A matriz de resíduos **E** corresponde à parte não modelada dos dados.

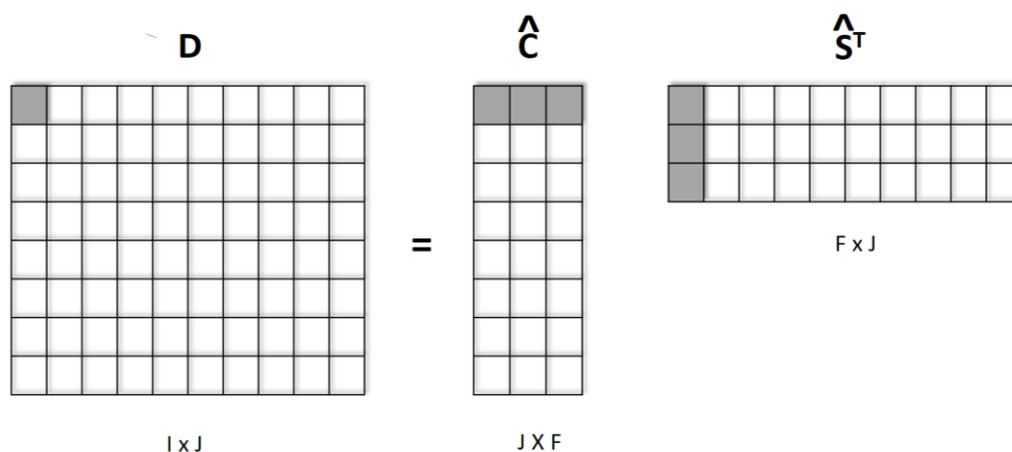


Figura 9 - Modelo de resolução multivariada de uma matriz **D**. Em que **l** é o número de amostras com **F** componentes medidos em **J** comprimentos de onda (adaptado)<sup>91</sup>.

Para a decomposição de uma matriz de dados analíticos é necessário estimar o número de componentes presentes na mistura. A estimativa pode ser realizada a partir do conhecimento prévio acerca do sistema ou pode ser determinada matematicamente pela decomposição de valores singulares – SVD (do inglês, *Singular Value Decomposition*). Com este algoritmo, a matriz de dados **D** é decomposta em outras matrizes<sup>91</sup>, conforme equação 25:

$$\mathbf{D} = \mathbf{U} \mathbf{S}_d \mathbf{V}^T \quad (25)$$

Em que **S<sub>d</sub>** é uma matriz diagonal composta por valores singulares (raiz quadrada dos autovalores de D) em ordem decrescentes e as matrizes **U** e **V** contêm vetores ortogonais e normalizados.

Desta forma, o número de espécies ou o número de linhas ou colunas linearmente independentes pode ser determinado considerando que a contribuição dos componentes químicos de uma amostra apresenta variância superior a outros fatores do sistema, como ruído e linha de base<sup>90; 91</sup>.

As dimensões das matrizes obtidas após a decomposição SVD podem ser reduzidas, de forma que a equação 25 possa ser reescrita da seguinte forma:

$$\mathbf{D} = \mathbf{T} \mathbf{L}^T + \mathbf{E} \quad (26)$$

Em que **T** = (**US**) é a matriz de escores, **L<sup>T</sup>** = **V<sup>T</sup>** é a matriz de pesos e **E** é a matriz de resíduos do modelo.

Os resultados obtidos pela decomposição SVD são únicos para as matrizes de escores e pesos, entretanto, não apresentam necessariamente um significado químico. Este significado pode ser obtido utilizando uma matriz de transformação, **R**, que rotacione os fatores abstratos (escores e pesos) transformando-os em fatores com significado químico, como perfis de concentração e perfis espectrais (Eq. 27).

$$\mathbf{D} = \mathbf{T} (\mathbf{R} \mathbf{R}^{-1}) \mathbf{L}^T + \mathbf{E} = (\mathbf{T} \mathbf{R}) (\mathbf{L} \mathbf{R})^T + \mathbf{E} = \mathbf{C} \mathbf{S}^T + \mathbf{E} \quad (27)$$

Entretanto, qualquer matriz ortonormal (F x F) pode ser aplicada nesta transformação. Além disso, esta decomposição sofre ambiguidade rotacional por possuir infinitas soluções matematicamente possíveis e equivalentes a **C** e **S**<sup>91</sup>.

A fim de reduzir o número de possíveis soluções, restrições provenientes de propriedades químicas ou matemáticas devem ser aplicadas. Estas restrições devem ser impostas na forma de igualdade ou desigualdade matemática<sup>91</sup>.

Neste trabalho, foi utilizada a restrição de não negatividade aos dados concentração, pois somente valores positivos apresentam significado físico. Entretanto, existem outras

restrições que podem ser aplicadas à análise por MCR, entre elas destacam-se unimodalidade (perfis possuem apenas um máximo) e balanço de massa (torna constante a soma das concentrações), entre outras<sup>91</sup>.

Outra forma de reduzir possíveis soluções é a análise simultânea de mais de uma matriz com pelo menos uma ordem em comum, ou seja, matrizes que possuam perfis (de concentração ou espectrais) em comum<sup>91</sup>.

**CAPÍTULO 3: ESPECTROSCOPIA RAMAN E ANÁLISE  
DISCRIMINANTE APLICADAS À DETECÇÃO DE FRAUDES  
EM CARNE BOVINA *IN NATURA* PELA ADIÇÃO DE SAIS E  
CARRAGENA**

### 3.1 OBJETIVOS

O objetivo deste capítulo foi desenvolvimento de um método de triagem, rápido e confiável, utilizando espectroscopia Raman empregando o método quimiométrico de classificação supervisionada PLS-DA para detecção de fraudes em carne bovina *in natura* pela adição de sais (cloreto de sódio e tripolifosfato de sódio) e de carragena.

De forma complementar, é objetivo deste capítulo a validação dos modelos discriminantes desenvolvidos através da estimativa de figuras de mérito (FOM) qualitativas. Para o modelo binário utilizando amostras de purga, é calculado, também, o intervalo de confiança para o valor de cada amostra prevista utilizando a estratégia de reamostragem *bootstrap*<sup>87</sup>.

### 3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.2.1 MATERIAIS E REAGENTES

O cloreto de sódio P.A. utilizado foi adquirido da Química Moderna (Barueri, São Paulo, Brasil), tripolifosfato de sódio P.A. da Synth (Diadema, São Paulo, Brasil) e carragena kappa da GastronomyLab (Brasília, Distrito Federal, Brasil). Como solvente foi utilizada água ultrapura (Millipore – Bedford, MA, EUA) com resistividade 18,2 M $\Omega$ . As soluções adulterantes foram injetadas utilizando seringas descartáveis ponta *luer lock* 60 mL (SR Productos para la Salud, Paraguay) acopladas com agulhas fúcsia 40 mm x 1,20 mm (BD PrecisionGlide, Curitiba, Brasil).

#### 3.2.2 EQUIPAMENTOS E INSTRUMENTOS UTILIZADOS

Os equipamentos utilizados neste capítulo foram:

- 1) Agitador magnético (*VELP Scientifica, Itália*) – utilizado para a homogeneização das soluções adulterantes.
- 2) Balança semi-analítica B600 (*Micronal, Brasil*) – utilizada para pesagem das amostras e dos reagentes.
- 3) Freezer vertical (*Consul, Brasil*).
- 4) Centrífuga para tubos Eppendorf - MAKRO 120 (*Hettich, Brasil*).

Foi utilizado um espectrômetro FT-Raman Vertex 70 (Bruker, Massachusetts, EUA), usando um módulo Raman (RAM II) (Bruker, Massachusetts, EUA), pertencente ao Departamento de Física da UFMG, em Belo Horizonte. A potência do laser utilizada foi de 1 W (1064 nm).

### 3.2.3 PREPARO DE AMOSTRAS

Um total de 16 peças de lagarto bovino (*M.semitendinosus*), embaladas a vácuo e pesando aproximadamente 4,0 kg cada, foram compradas em uma casa de carnes local, de fornecedor confiável. As amostras foram divididas em dois grupos, G1 e G2, que foram adulterados sob condições controladas de volume de injeção, de concentração da solução e de ganho de massa de 10% (G1) e 5% (G2), respectivamente. Foi verificado experimentalmente que acima de 10% de adulteração não há ganho significativo de retenção de solução adulterante pela peça de carne.

Cada peça de carne foi dividida em 11 pedaços de, aproximadamente, 2,5 cm de largura. A massa de cada fração de amostra variou entre 25,74 g (fração de uma das extremidades do corte) e 114,56 g (fração da região central do corte). Sete frações de cada peça foram adulteradas pela adição de soluções aquosas a 5% m/v dos seguintes adulterantes, conforme planejamento experimental apresentado na Figura 10, tendo em vista o potencial aumento da capacidade de retenção de água e, conseqüentemente, aumento da maciez: cloreto de sódio (NaCl), tripolifosfato de sódio (TPFS), carragena (Carrag), NaCl:TPFS (1:1), NaCl:Carrag (1:1), TPFS:Carrag (1:1), NaCl:TPFS:Carrag (1:1:1). As injeções foram realizadas perpendicularmente à superfície da amostra de forma que a agulha estivesse inteiramente inserida nesta. Foram utilizadas seringas descartáveis com capacidade de 60 mL, com ponta *luer lock* e acopladas com agulhas fúcsia 40 mm x 1,20 mm. Os adulterantes foram injetados em diversos pontos do corte com espaçamento de cerca de 1 cm entre os pontos. Em cada ponto de injeção foram inseridos aproximadamente 0,5 mL de solução adulterante.

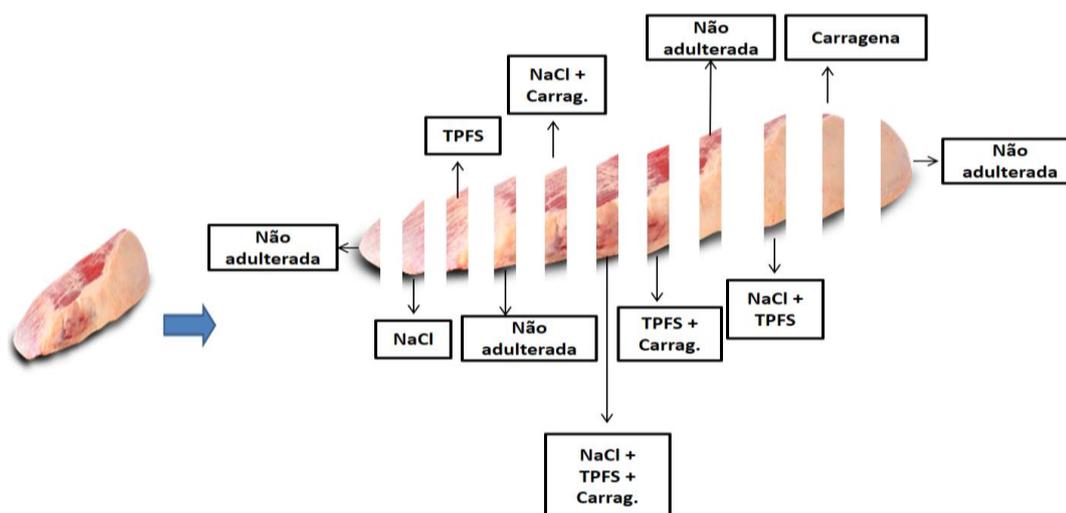


Figura 10 - Planejamento experimental de corte da peça de lagarto bovino e injeção das soluções adulterantes em cada fração de amostra.

Neste trabalho, não foram utilizadas amostras de carne adulteradas somente com água, pois testes preliminares demonstraram que ao serem descongeladas até temperatura ambiente para a análise, as amostras apresentavam significativa perda de líquido injetado, o que inviabilizou a sua utilização para detecção de fraudes com este tipo de adulteração.

Quatro frações de carne de cada peça de lagarto bovino foram selecionadas e identificadas como amostras não adulteradas, sendo: duas frações da extremidade de cada peça e duas frações de sua região central, conforme mostra a Figura 10. Tal escolha se deve ao fato de que o tipo de corte selecionado apresenta maior concentração de tecido conjuntivo nas extremidades da peça quando comparado à região central do corte. Foi obtido um total de 176 amostras, sendo 64 não adulteradas e 112 adulteradas.

Após a injeção das soluções de adulterantes e a separação das frações não adulteradas, as amostras foram armazenadas em sacos plásticos de polietileno e mantidas em freezer vertical a  $-12^{\circ}\text{C}$  por aproximadamente 7 dias. As análises por espectroscopia Raman foram realizadas nas amostras de carne e nas amostras de líquido exsudado da carne. As amostras foram descongeladas até temperatura ambiente ( $25^{\circ}\text{C}$ ) para análise posterior.

Para obtenção das purgas (Figura 11), as amostras foram submetidas a descongelamento controlado em geladeira a  $4-10^{\circ}\text{C}$  por 48 horas. As soluções de purga coletadas foram, então, armazenadas em tubos Eppendorf e mantidas sob refrigeração a  $4^{\circ}\text{C}$  até o momento da análise. Para a leitura das soluções de purga no espectrômetro Raman, uma etapa adicional de preparo de amostras foi necessária: a fim de evitar possíveis precipitações de proteínas devido ao tempo de exposição ao laser de alta potência (15 minutos), as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos. O líquido centrifugado foi armazenado em tubos de Duran devidamente identificados e selados com plástico Parafilm. Em seguida, eles foram armazenados sob refrigeração até o momento da aquisição dos espectros.

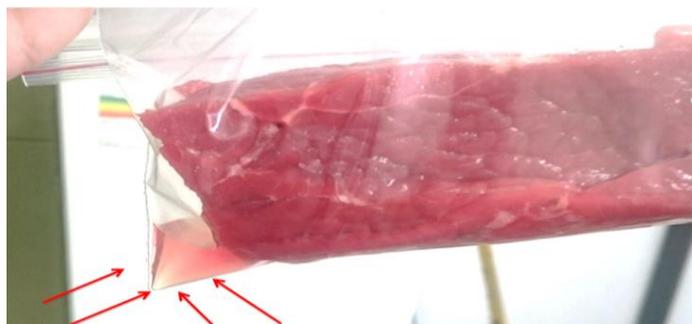


Figura 11 - Líquido exsudado da carne (Purga).

### 3.2.4 AQUISIÇÃO DE ESPECTROS

Os parâmetros de análise foram otimizados em relação ao tempo de exposição ao laser, número de varreduras e potência do laser.

A aquisição dos espectros das amostras de carne foi realizada a partir da análise direta das amostras armazenadas em sacos plásticos de polietileno. Os espectros foram coletados à temperatura ambiente e foram obtidos de  $3600\text{ cm}^{-1}$  a  $200\text{ cm}^{-1}$  com resolução de  $4\text{ cm}^{-1}$  e 256 varreduras. O tempo total de análise foi de aproximadamente 7 minutos por amostra.

Para a análise das purgas, a análise no espectrômetro Raman foi realizada colocando-se os tubos de Duran no porta-amostras, utilizando um espelho na parte posterior a fim de intensificar a quantidade de radiação espalhada, conforme mostrado na Figura 12 – (b). Os espectros foram obtidos de  $3600\text{ cm}^{-1}$  a  $200\text{ cm}^{-1}$  com resolução de  $4\text{ cm}^{-1}$  e 512 varreduras. O tempo total de análise foi de aproximadamente 15 minutos por amostra.

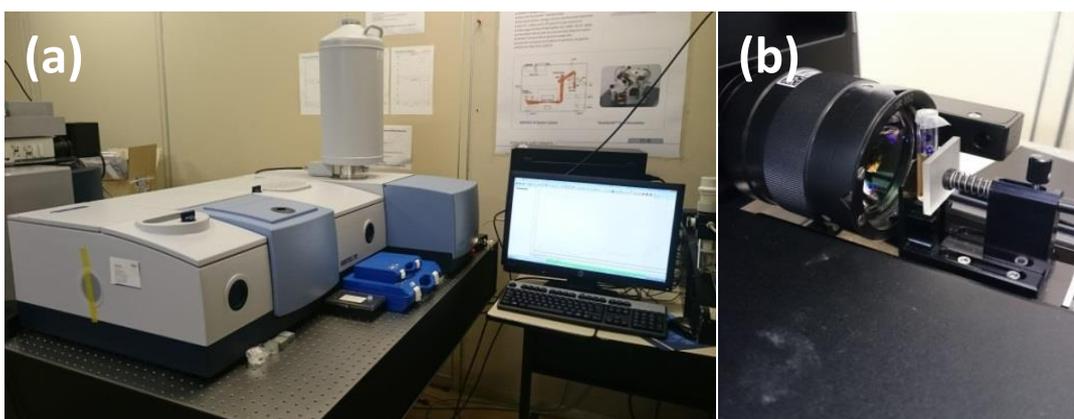


Figura 12 - (a) Espectrômetro FT-Raman. (b) Análise da amostra de purga em tubo Duran com espelho na parte posterior da amostra para intensificar o sinal.

### 3.3 PROCESSAMENTO DE DADOS

Os dados obtidos foram processados com o programa MATLAB versão 8.4 (The MathWorks, Natick, EUA), utilizando o pacote PLS Toolbox versão 7.0 (Eigenvector Technologies, Manson, EUA).

### 3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os modelos de classificação de adulteração em carne bovina foram construídos para três adulterantes: cloreto de sódio (NaCl), tripolifosfato de sódio (TPFS) e Carragena (Carrag). Os espectros Raman dos padrões de TPFS e carragena são apresentados na Figura 13. Pode-se observar que estes adulterantes apresentaram bandas com sobreposição de sinal analítico em torno de  $2900\text{ cm}^{-1}$ , característica de estiramento C-H<sup>92</sup>.

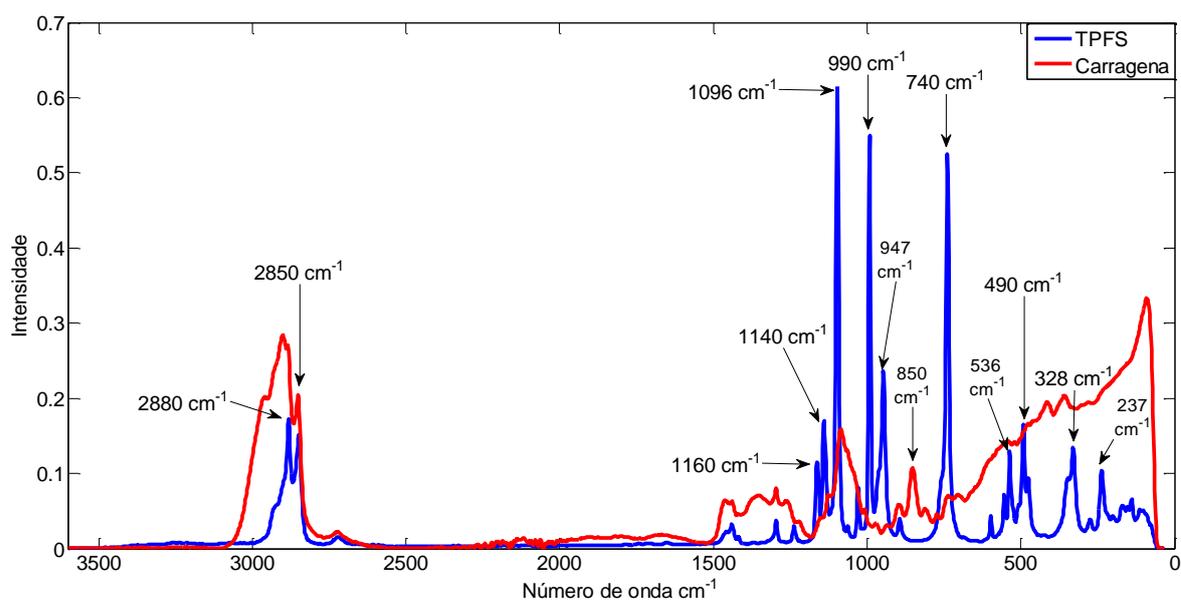


Figura 13 - Espectros Raman dos padrões de tripolifosfato de sódio (azul) e carragena (vermelho) em estado sólido.

Para a identificação de tripolifosfato de sódio, as bandas mais significativas aparecem na região de *fingerprint*, situada entre  $230\text{ cm}^{-1}$  e  $1200\text{ cm}^{-1}$ . Essa região apresenta várias bandas de alta intensidade relativa. Entretanto, para a carragena, é possível verificar a existência de duas bandas bem definidas e intensa em  $850\text{ cm}^{-1}$  e  $1086\text{ cm}^{-1}$ .

O espectro do cloreto de sódio não foi obtido, uma vez que, a vibração da ligação NaCl ocorre em regiões abaixo de  $200\text{ cm}^{-1}$ , não incluídas na faixa avaliada neste trabalho<sup>23</sup>.

#### 3.4.1 AMOSTRAS DE LÍQUIDO EXSUDADO (PURGA)

O espectro Raman para uma amostra de purga de carne bovina *in natura* não adulterada (Figura 14) apresenta bandas relacionadas a diferentes grupos funcionais de aminoácidos, lipídeos e proteínas. Algumas bandas espectrais podem ser atribuídas ao grupo CONH, como as duas bandas de estiramento NH na região entre  $3500\text{ cm}^{-1}$  e  $2900\text{ cm}^{-1}$  associadas às regiões

de vibração dos modos amida A e de amida B, respectivamente. A região entre  $1800\text{ cm}^{-1}$  e  $700\text{ cm}^{-1}$  apresenta informações estruturais de proteínas, como vibrações das folhas- $\alpha$  e folhas- $\beta$ . As principais bandas são relacionadas aos modos de vibração de amida I ( $1640\text{ cm}^{-1}$  -  $1690\text{ cm}^{-1}$ ), região que apresenta estiramento C=O, e amida III ( $1230\text{ cm}^{-1}$  -  $1300\text{ cm}^{-1}$ ), região caracterizada pelo estiramento por acoplamento de ligações C-H e vibração de flexão de N-H de grupos peptídicos. Além disso, sinais atribuídos às frações aromáticas de aminoácidos podem ser observadas, como bandas de triptofano em  $880\text{ cm}^{-1}$ ,  $1345\text{ cm}^{-1}$  e  $1557\text{ cm}^{-1}$ , bandas de fenilalanina em  $1003\text{ cm}^{-1}$  e  $1045\text{ cm}^{-1}$  e bandas de tirosina em  $850\text{ cm}^{-1}$  <sup>92</sup>.

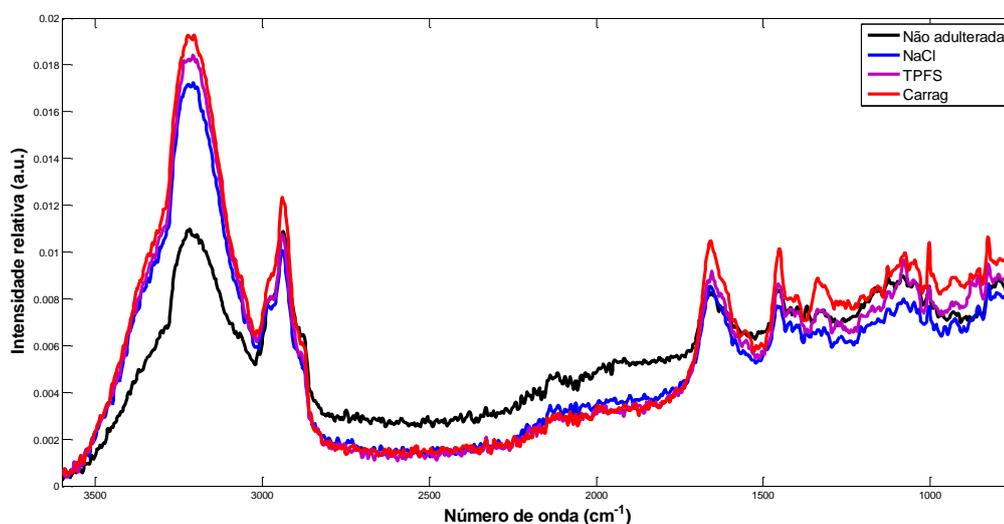


Figura 14 - Espectros Raman para amostras não adulteradas (preto) e amostras adulteradas ao nível de 5% m/v com NaCl (azul), TPFS (roxo) e Carragena (vermelho).

A adição de sais em carne, como NaCl e TPFS, ou a adição de polissacarídeos, como a carragena, mudam a conformação das proteínas provocando vibrações específicas de  $\alpha$ -hélices, folhas- $\alpha$  e folhas- $\beta$ , que podem ser detectadas por espectroscopia Raman <sup>92</sup>. As principais bandas espectrais relacionadas às mudanças da estrutura secundária de proteínas apresentam sinais intensos característicos do modo de vibração de amida I (banda centrada em torno de  $1660\text{ cm}^{-1}$ ) e sinal de vibração de amida III ( $1225\text{ cm}^{-1}$  -  $1350\text{ cm}^{-1}$ ). A região de amida I envolve estiramento de C=O, estiramento de C-N, flexão de C $\alpha$ -C-N e deformação no plano de N-H de ligações peptídicas. Na região de amida III, as bandas principais envolvem estiramento de C-N e deformação no plano de N-H de ligações peptídicas. A caracterização das mudanças nas estruturas terciárias de proteínas está relacionada ao estiramento do anel de resíduos de triptofano ( $760\text{ cm}^{-1}$ ) e bandas duplas do anel benzênico para-substituído de resíduos de tirosina, que estão centrados em  $830\text{ cm}^{-1}$  e  $850\text{ cm}^{-1}$  <sup>92</sup>. A adição de TPFS em carnes produz as mesmas bandas

significativas que o cloreto de sódio, além da banda característica de estiramento P=O em 1102  $\text{cm}^{-1}$ <sup>93</sup>. No caso do adulterante carragena, as bandas mais importantes para a caracterização são observadas em torno de 1075-1085  $\text{cm}^{-1}$ , atribuída a ligações C-O de 3,6-anidrogactose, em 1240-1260  $\text{cm}^{-1}$ , relacionada à ligação de ésteres sulfatados, e em 845  $\text{cm}^{-1}$ , atribuída à 4-sulfato-D-galactose.

A Figura 14 mostra os espectros Raman das purgas adulteradas a 5% de ganho de massa com NaCl, TPFS e carragena, respectivamente. Visualmente, há poucas diferenças espectrais entre as amostras adulteradas e não adulteradas. No entanto, uma diferença significativa é o aumento da banda em torno de 3200  $\text{cm}^{-1}$  nas amostras adulteradas (região de OH de moléculas de água)<sup>92</sup>.

#### 3.4.1.1 Ensaios preliminares

A fim de verificar o potencial de aplicação da espectroscopia Raman na análise de purgas de carne, foram realizados testes preliminares em 64 amostras distribuídas em quatro classes com 16 de cada tipo: não adulteradas, NaCl, TPFS e Carragena (Carrag).

As amostras foram divididas em dois conjuntos de dados, treinamento e teste, utilizando o algoritmo KS separadamente em cada classe. Obteve-se 44 amostras para o conjunto treinamento e 20 amostras para o conjunto teste (aproximadamente dois terços para o conjunto de treinamento e um terço para o conjunto teste). A definição de amostras adulteradas como classe 1 e amostras não adulteradas como classe 0 foi arbitrária para todos os modelos discutidos nesta subseção.

Os espectros Raman registrados para as 64 amostras são mostrados na Figura 15. Nesta figura são apresentadas as regiões utilizadas para construção dos modelos individuais. Para todos os modelos discutidos a seguir foi retirada a banda próximo a 250  $\text{cm}^{-1}$  relacionada à linha do laser. O retângulo preto representa a primeira região analisada (P1), que corresponde aos números de onda de 3589  $\text{cm}^{-1}$  a 326  $\text{cm}^{-1}$ . A segunda região (P2), delimitada pelo retângulo azul, corresponde aos números de onda entre 3589  $\text{cm}^{-1}$  e 712  $\text{cm}^{-1}$ . A terceira região avaliada (P3), delimitada pelos retângulos vermelhos, corresponde ao estiramento das ligações C-H (3589  $\text{cm}^{-1}$  a 2736  $\text{cm}^{-1}$ ) e às deformações angulares das ligações CH<sub>2</sub> e modos Amidas (I e III) – região de *fingerprint* (1868  $\text{cm}^{-1}$  a 712  $\text{cm}^{-1}$ )<sup>92</sup>. Nesta subseção, as regiões descritas acima serão avaliadas em termos da figura de mérito taxa de confiabilidade (TCONF), a qual leva em conta a taxa de falso-negativos e falso-positivos.

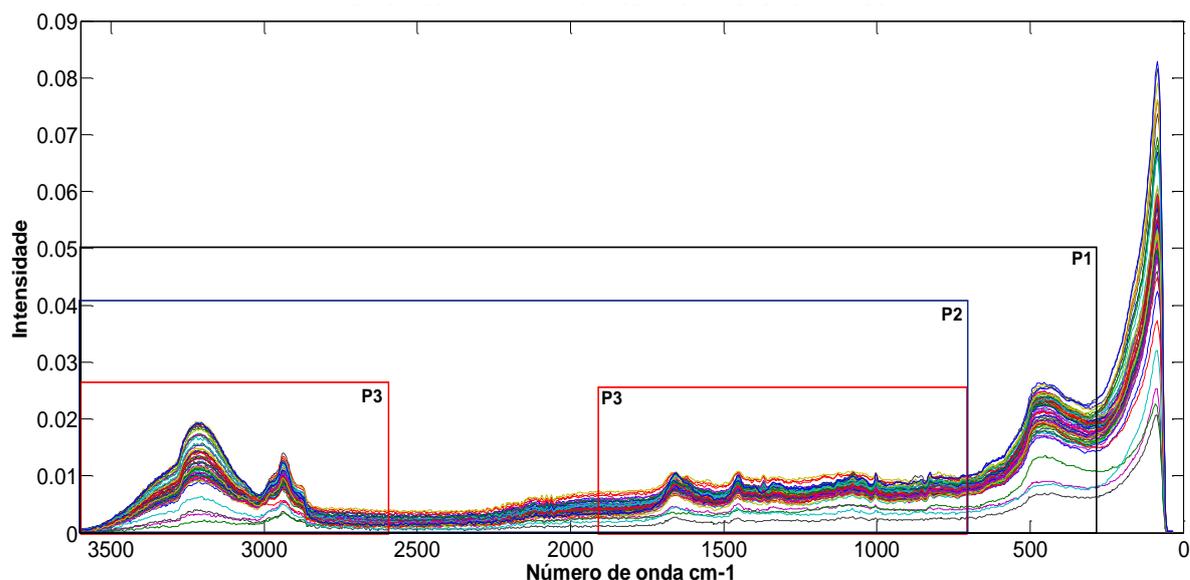


Figura 15- Espectros Raman para as 64 amostras de purga. Os retângulos correspondem às regiões utilizadas para a construção dos diferentes modelos de classificação testados: P1 – 3589  $\text{cm}^{-1}$  a 326  $\text{cm}^{-1}$ ; P2 – 3589  $\text{cm}^{-1}$  a 712  $\text{cm}^{-1}$ ; P3 – 3589  $\text{cm}^{-1}$  a 2736  $\text{cm}^{-1}$  e 1868  $\text{cm}^{-1}$  a 712  $\text{cm}^{-1}$ .

Após a separação das amostras nos conjuntos de treinamento e teste usando o algoritmo KS, os dados foram pré-processados na seguinte ordem: (a) correção da variação sistemática utilizando a normalização por vetor unitário, devido à heterogeneidade da matriz da amostra de purga; (b) os dados foram, então, centrados na média (*mean center*). A seleção do número de variáveis latentes (VL) foi obtida por validação cruzada usando venezianas (*venetian blinds*) com 6 divisões, e com base no menor erro de classificação da validação cruzada (CVCE).

Na Tabela 2, estão descritos os números de falso-negativos (FN) e falso-positivos (FP) na previsão fornecida por cada modelo testado, tanto para o conjunto de treinamento, quanto para o conjunto teste. Além disso, são mostrados os valores da taxa de confiabilidade (TCONF). Nesta Tabela, os modelos *two-class*/binários foram comparados com modelos multiclasse para a classificação individual de cada adulterante).

Tabela 2 - Comparação dos modelos de classificação construídos para as amostras de purga.

PARÂMETROS / REGIÕES		P1				P2				P3			
		<i>Two Class</i>	NaCl	TPFS	Carragena	<i>Two Class</i>	NaCl	TPFS	Carragena	<i>Two Class</i>	NaCl	TPFS	Carragena
Treinamento	TCONF (%)	93,7	53,7	84,8	59,9	84,8	75,7	81,2	90,9	93,9	53,4	90,9	100,0
	FN	2	2	1	2	5	1	1	1	2	1	0	0
	FP	0	9	2	7	0	5	3	0	0	12	3	0
Teste	TCONF (%)	80,0	40,0	73,3	60,0	80,0	20,0	73,3	53,3	100,0	40,0	66,7	66,7
	FN	0	1	1	0	0	2	1	1	0	1	1	1
	FP	1	6	1	6	1	6	1	4	0	6	2	2
N° VLs		3	4	4	4	2	4	3	5	4	3	4	6
Variância X(%)		95,3	94,2	93,2	96,5	93,2	97,4	94,9	97,9	97,1	96,1	97,7	98,4
Variância Y(%)		46,4	22,0	58,1	86,3	47,1	31,8	50,7	59,0	67,1	24,5	55,3	56,3

FP: número de amostras falso-positivas; FN: número de amostras falso-negativas; TCONF: taxa de confiabilidade do modelo; VL: variáveis latentes.

Comparando-se os resultados da Tabela 2, percebe-se que os modelos gerados para a previsão das amostras adulteradas *versus* as amostras não adulteradas em geral (modelo *two class*) apresentaram os melhores resultados. Estes modelos forneceram valores de TCONF superiores a 80,0% nas três regiões estudadas. No modelo para duas classes, apenas 2 amostras adulteradas foram classificadas como FN para o conjunto treinamento e 1 amostra não adulterada foi incorretamente classificada como adulterada na região P1 para o conjunto teste, enquanto na região P2, 5 amostras adulteradas foram classificadas como FN no conjunto treinamento e 1 amostra não adulterada classificada como FP no conjunto teste. Já na região P3, houve a previsão de 2 amostras como FP no conjunto de treinamento. Em contraposição, os modelos multiclasse para previsão individual dos adulterantes apresentaram taxas de confiabilidade abaixo de 75,0% para o conjunto teste em todas as regiões analisadas.

Para os modelos multiclasse individuais de classificação, os modelos de previsão de amostras adulteradas com solução de cloreto de sódio foram os piores, com TCONF inferiores a 76,0% para o conjunto treinamento e abaixo ou igual a 40,0% para o conjunto teste, além de apresentarem baixas taxas de variância explicada no bloco Y.

Os modelos de previsão para as amostras adulteradas com solução de tripolifosfato de sódio apresentaram TCONF para o conjunto teste superior ou igual a 66,7% e para o conjunto treinamento superiores ou iguais a 81,2%. Estes modelos foram considerados razoáveis para a predição de amostras adulteradas com solução de TPFS.

Para os modelos de previsão de amostras adulteradas com solução de carragena, os valores de TCONF encontrados para os conjuntos treinamento e teste foram de 59,9% e 60,0%, respectivamente, para a região P1. Para a região P2, o valor de TCONF para o conjunto de treinamento foi igual a 90,9%, enquanto o conjunto teste apresentou um valor de 53,3% de TCONF e, para a região P3, as TCONF para o treinamento e teste foram de 100,0% e 66,7%, respectivamente. Desta forma, os modelos de previsão das amostras injetadas com este adulterante não foram considerados eficientes para a previsão da adulteração.

De um modo geral, as bandas mais significativas para a identificação das adulterações propostas estão situadas em  $1080\text{ cm}^{-1}$  (estiramento simétrico de CO)<sup>92</sup>,  $876\text{ cm}^{-1}$  (estiramento C-C relacionada à informações sobre  $\alpha$ -hélices de proteínas secundárias),  $790\text{ cm}^{-1}$  (região característica de lipídeos)<sup>92</sup>,  $2945\text{ cm}^{-1}$  (estiramento CH)<sup>92</sup>,  $480\text{ cm}^{-1}$  (interação de água intramolecular com proteínas<sup>92</sup>),  $3220\text{ cm}^{-1}$  (estiramento N-

H de amida<sup>14</sup> e estiramento OH de água<sup>92</sup>) e as regiões em torno de 500 cm<sup>-1</sup> e 3220 cm<sup>-1</sup> relacionadas a estiramento OH de água<sup>92</sup> e estiramento N-H de amida<sup>14</sup>, além de uma banda em 790 cm<sup>-1</sup> (região característica de lipídeos)<sup>92</sup>. A banda em torno de 1080 cm<sup>-1</sup> está presente no espectro do padrão de carragena.

Os modelos da região P3 apresentaram melhores valores de TCONF comparados aos modelos das regiões P1 e P2, por se tratar de uma região mais informativa. Isto se justifica pela utilização de uma região espectral onde ocorrem sinais de estiramento das ligações C-H (3589 cm<sup>-1</sup> a 2736 cm<sup>-1</sup>) e de deformações angulares das ligações CH<sub>2</sub> e modos Amidas (I e III) – região de *fingerprint* (1868 cm<sup>-1</sup> a 712 cm<sup>-1</sup>). As previsões obtidas para os modelos construídos para a região P3 são apresentados na Figura 16.

Para esta região (P3), percebe-se que o modelo gerado para a previsão das amostras adulteradas contra as amostras não adulteradas (modelo binário) é o melhor modelo construído com dados de espectroscopia Raman.

Para o modelo de previsão de cloreto de sódio, baixas TCONF (53,7% para o conjunto treinamento e de apenas 40,0% para o conjunto teste) e baixa variância explicada no bloco Y foram observadas e podem ser explicadas pelo fato de o cloreto de sódio não apresentar modo vibracional na região estudada. No entanto, a presença do sal na purga pode ser determinada de forma indireta pela interação do sal com as moléculas de água e, consequentemente, observação de mudanças nas estruturas secundárias das proteínas. Estas alterações são caracterizadas pela análise das regiões de amida I (1600 cm<sup>-1</sup> a 1700 cm<sup>-1</sup>), regiões de amida II (1500 cm<sup>-1</sup> a 1600 cm<sup>-1</sup>) e região de estiramento O-H de água (3000 cm<sup>-1</sup> e 3500 cm<sup>-1</sup>). Entretanto, a modificação da forma da banda na região de água pode estar associada a modificações na temperatura do sistema, influenciando o modelo de classificação para a identificação da adulteração com este sal<sup>23</sup>. O modelo construído classificou 1 amostra adulterada com NaCl como FN para os conjuntos treinamento e teste, enquanto o número de FP foi igual a 12 amostras para o conjunto de treinamento e 6 amostras para o conjunto teste, sendo considerado um modelo com baixa capacidade preditiva.

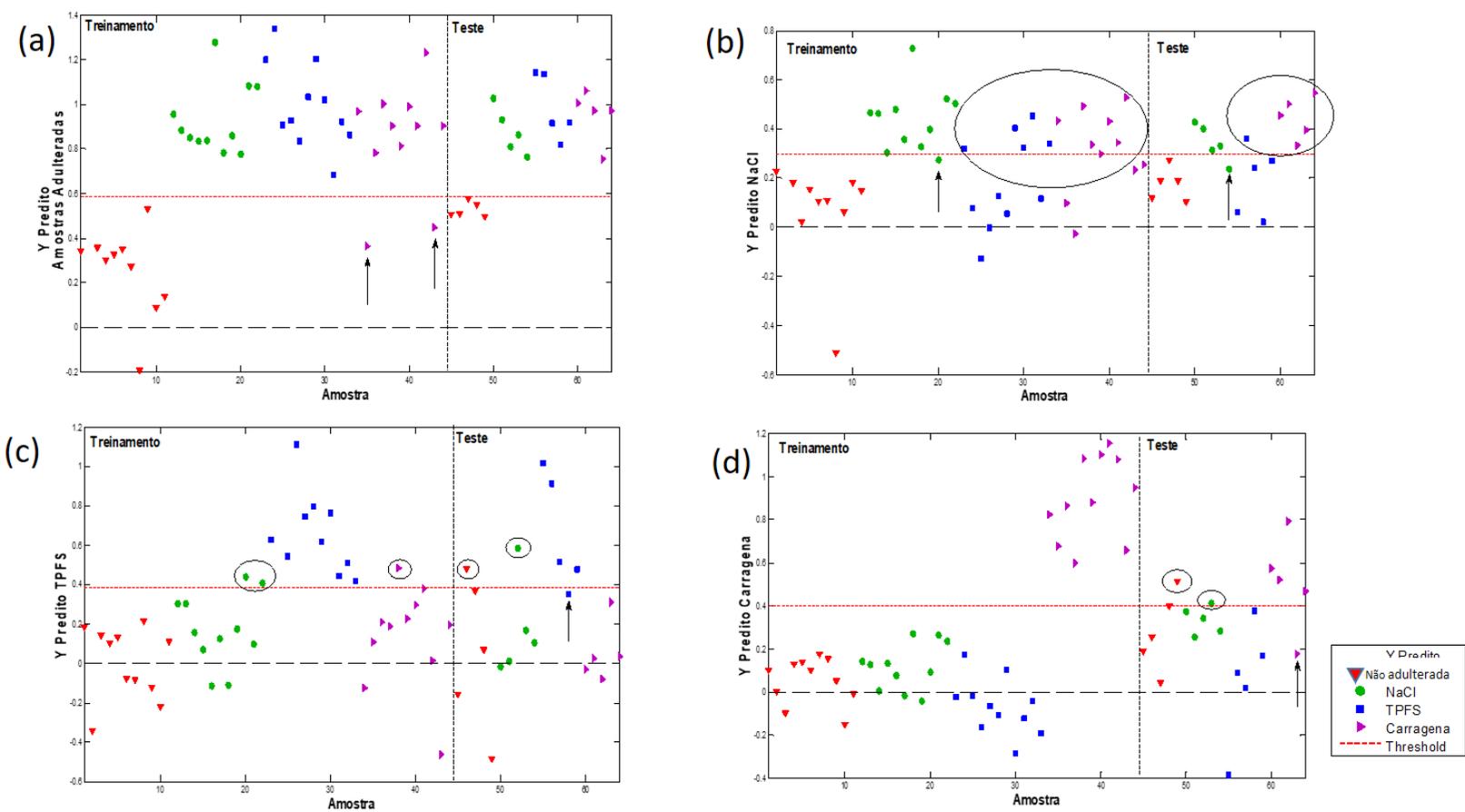


Figura 16 - Modelos PLS-DA construídos com espectros Raman – Região P3: (a) modelo Two class, (b) adulteração com NaCl, (c) adulteração com TPFS, (d) adulteração com Carragena. Setas indicam amostras FN e elipses indicam amostras FP.

O modelo construído para a detecção da adulteração com a carragena apresentou TCONF do conjunto de treinamento igual a 100,0%. No entanto, no conjunto teste TCONF do modelo foi de 66,7%. Este baixo valor de eficiência no conjunto teste indica que possivelmente houve a inclusão de informação específica do conjunto de treinamento que não é útil para a previsão generalizada no modelo. A forma de minimizar este efeito é a utilização de um menor número de variáveis latentes. Entretanto, a utilização de menor valor de VLs não apresentou bons resultados para este tipo de adulteração.

A partir da análise dos vetores de regressão (Figura 17) e VIP *scores* (Figura 18) dos modelos de classificação gerados para a região P3, pode-se concluir que a banda mais significativa para a caracterização das amostras não adulteradas ocorre em  $2940\text{ cm}^{-1}$  (estiramento CH)<sup>92</sup>, sendo esta mais intensa que a banda em  $3220\text{ cm}^{-1}$  (estiramento NH de amida<sup>14</sup> e estiramento OH de água<sup>92</sup>). Para as amostras adulteradas, estas duas bandas apresentam intensidades similares.

Em conclusão a esta seção, o modelo binário de previsão das amostras adulteradas de purga centrifugada foi considerado apropriado como método de verificação inicial para a detecção sistemática do tipo de fraude em estudo em amostras de carne bovina *in natura*, principalmente para a região do espectro Raman compreendida entre  $3589\text{ cm}^{-1}$  e  $2736\text{ cm}^{-1}$  e entre  $1868\text{ cm}^{-1}$  e  $712\text{ cm}^{-1}$ .

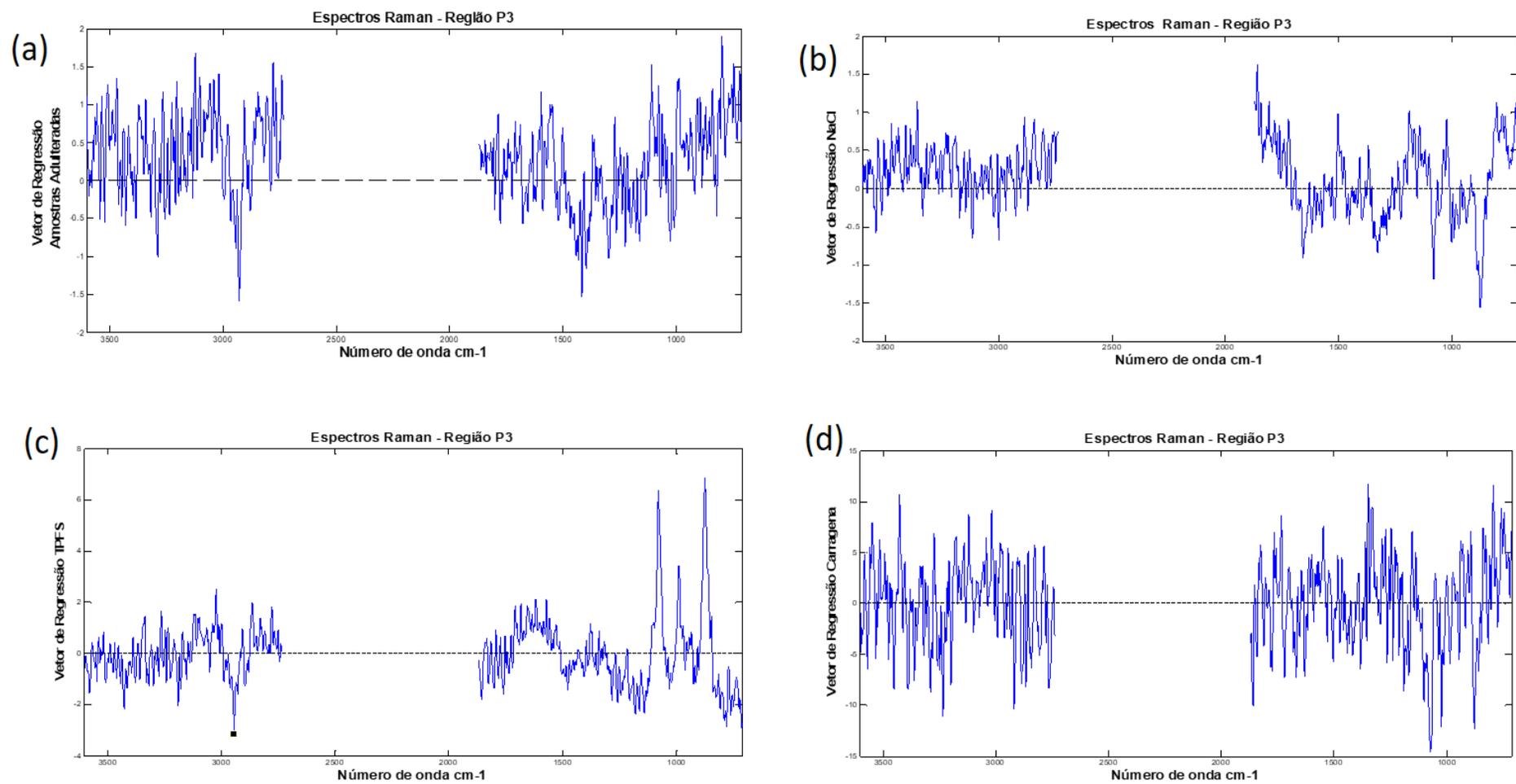


Figura 17 - Coeficientes de regressão para modelos PLS-DA construídos com espectros Raman – Região P3: (a) modelo Two class, (b) adulteração com NaCl, (c) adulteração com TPFS, (d) adulteração com Carragena.

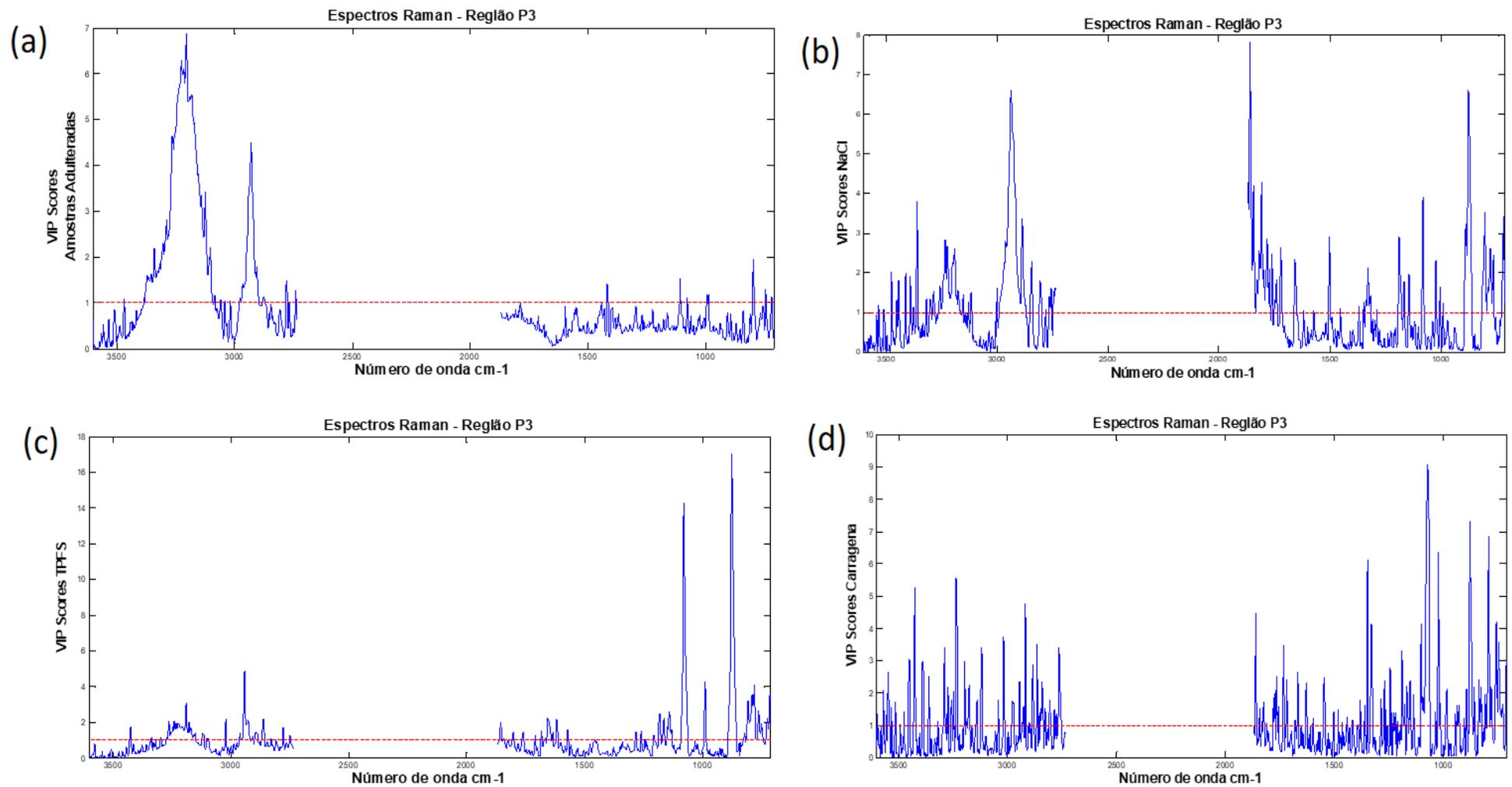


Figura 18 - VIP scores para modelos PLS-DA construídos com espectros Raman – Região P3: (a) modelo Two class, (b) adulteração com NaCl, (c) adulteração com TPFS, (d) adulteração com Carragena.

### 3.4.1.2 Modelos binário para identificação de amostras adulteradas – Modelo *Two Class*

Do total de 176 amostras obtidas pelo preparo de amostras, 165 amostras de purga centrifugadas foram utilizadas para a construção do modelo de classificação, sendo 54 não adulteradas e 111 adulteradas (9 amostras não adulteradas e 1 amostra ternária não forneceram volume suficiente para leitura no espectrômetro Raman).

Os espectros Raman para as 165 amostras utilizadas para a construção do modelo de classificação PLS-DA são mostrados na Figura 19.

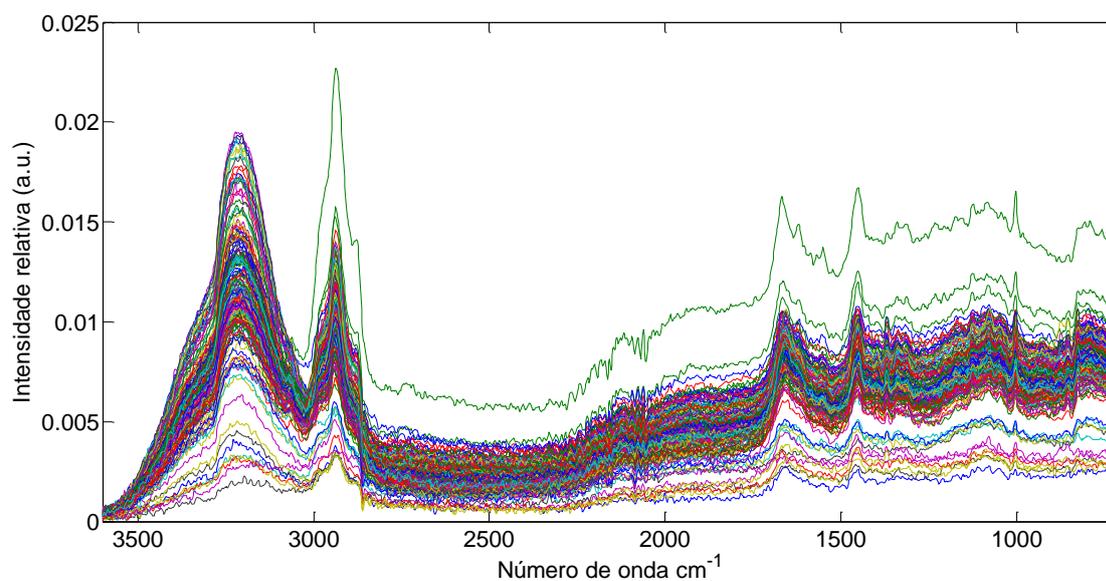


Figura 19 - Espectros Raman para as 165 amostras utilizadas para a construção do modelo de classificação PLS-DA.

As regiões mais importantes para a determinação da autenticidade das amostras de purga correspondem ao estiramento das ligações C-H ( $3589\text{ cm}^{-1}$  a  $2736\text{ cm}^{-1}$ ) e às deformações angulares das ligações  $\text{CH}_2$  e modos Amidas (I e III) – região de *fingerprint* ( $1868\text{ cm}^{-1}$  a  $712\text{ cm}^{-1}$ )<sup>92</sup>, como discutido anteriormente. Conforme observado na Figura 20, estas regiões apresentam alto potencial para aplicação para o modelo de classificação.

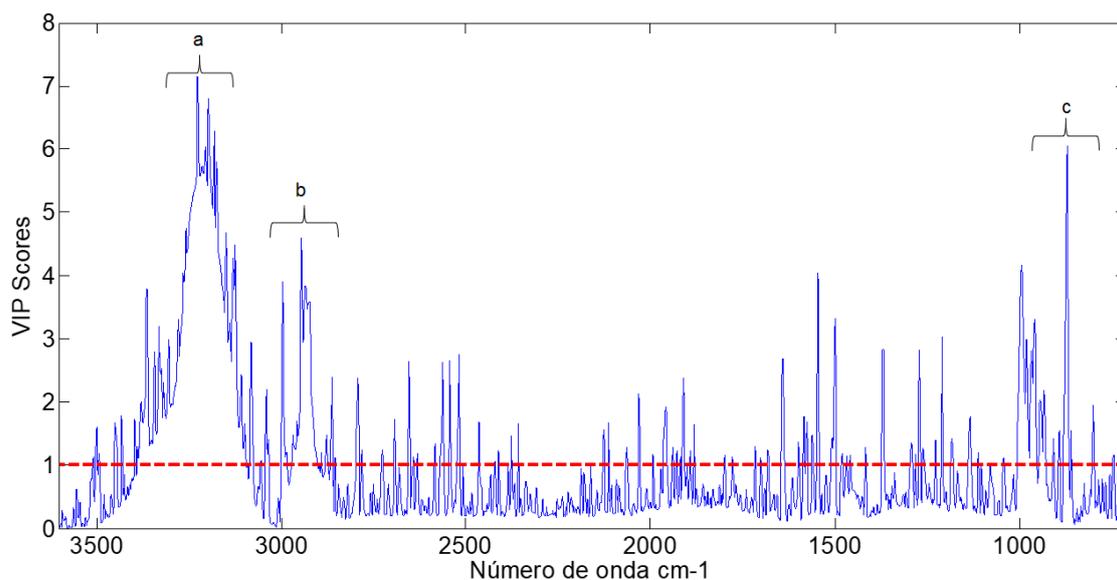


Figura 20 - VIP scores para o modelo PLS-DA. Linha tracejada horizontal indica o threshold de 1.0.

Para a interpretação espectral do modelo PLS-DA desenvolvido, é interessante analisar os *VIP scores*: valores superiores a 1,0 são consideradas significativas para a discriminação do modelo. Conforme pode ser visto na Figura 20, três picos do espectro Raman foram mais significativos para discriminação do modelo descrito. O maior *VIP scores* está associado à banda espectral centrada em  $3200\text{ cm}^{-1}$  relacionada a estiramento NH de amidas<sup>14</sup> (Figura 20– (a)), que pode ser atribuída a mudança da conformação das proteínas devido à adição de sais à carne. A segunda banda mais intensa ocorre em  $845\text{ cm}^{-1}$  (Figura 20– (c)), associado aos efeitos da carragena e presença de resíduos de 4-sulfato-D-galactose<sup>94;95</sup>. A terceira banda mais significativa é centrada em torno de  $2930\text{ cm}^{-1}$  (Figura 20– (b)), característico de estiramento CH e pode ser associado à qualidade da carne<sup>92</sup>.

Para a construção da matriz de dados os espectros das amostras foram divididos em dois terços para o conjunto treinamento e um terço para o conjunto teste. A seleção foi realizada a partir do algoritmo de seleção KS aplicado às classes não adulteradas e adulteradas separadamente. Desta forma, o conjunto treinamento foi construído com 112 amostras (37 não adulteradas e 75 adulteradas) e o conjunto teste com 53 amostras (18 não adulteradas e 35 adulteradas). Como pré-processamento foi aplicada a normalização por vetor unitário para correção dos desvios da linha de base dos espectros Raman. Em seguida, os dados foram centrados na média. O número de variáveis latentes (VL) foi baseado no menor erro de classificação da validação cruzada (CVCE) a partir da análise por validação cruzada utilizando venezianas (*venetian blinds*) com 10 pontos.

Amostras apresentando valores de resíduos espectrais Q e valores de  $T^2$  de Hotelling acima dos limites estimados a 95% de confiança foram detectada como *outliers* e removidas do modelo. Um total de 8 amostras, 7 no conjunto de treinamento (3 amostras não adulteradas e 4 amostras adulteradas) e 1 no conjunto teste (não adulterada) foram removidas do modelo, correspondendo a 4,8% das amostras originais. Assim, o melhor modelo PLS-DA foi construído com 157 amostras e utilizando 4 VLs, que representaram 95,2% da variância no bloco X e 60,5% no bloco Y. Para este modelo, os valores previstos de Y são mostrados na Figura 21. O *threshold* bayesiano foi estimado em 0,59.

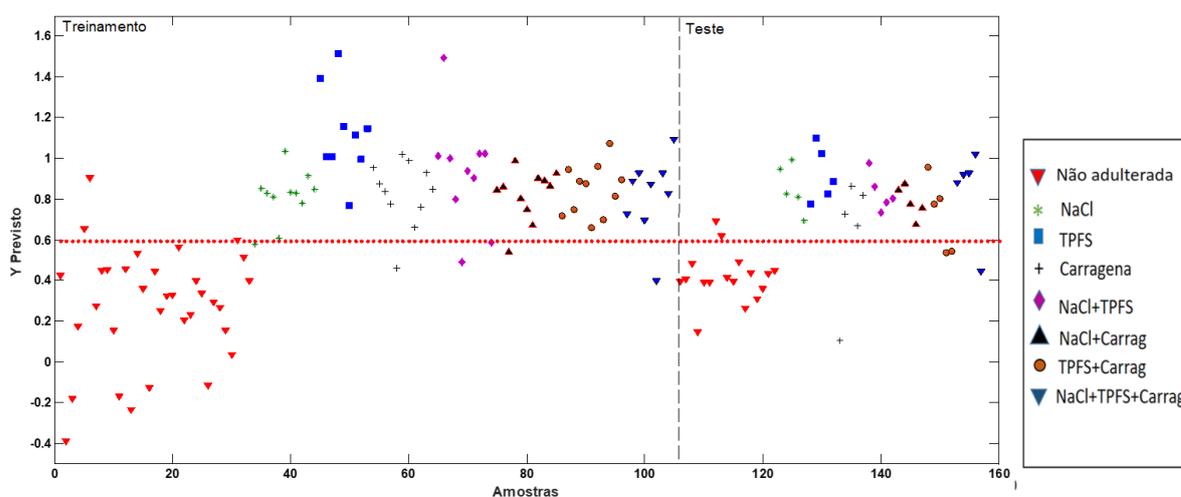


Figura 21- Valores previstos de Y para o modelo PLS-DA. Linha pontilhada horizontal indica o limite de classificação. A linha tracejada vertical divide as amostras de treinamento e teste.

Conforme pode ser visto na Figura 21, duas amostras não adulteradas foram claramente previstas como adulteradas (FP) e quatro amostras adulteradas foram nitidamente previstas como não adulteradas (FN) no conjunto treinamento. Entretanto, algumas amostras estavam muito próximas ao limite de decisão sendo atribuídas pelo modelo quimiométrico a uma das duas classes. Foram verificados, então, 3 FP e 6 FN para o conjunto treinamento que correspondem a TFP de 8,1% e TFN de 8,0%. Para o conjunto teste foram observadas duas amostras FP (11,7%) e três amostras FN (8,5%). Desta forma, a taxa de verdadeiros positivos, SEN, foi igual a 92,0% e 91,5% e a taxa de verdadeiro negativo, SPE, foi igual a 91,9% e 88,3% para os conjuntos treinamento e teste, respectivamente. Por fim, a taxa de confiabilidade, TCONF, que é uma figura de mérito global incluindo tanto o número de FN quanto o número de FP, foi estimada em

86,6% e 79,8% para os conjuntos treinamento e teste. Todas estas FOM são mostradas na Tabela 3.

Tabela 3 - Figuras de mérito estimadas para o modelo PLS-DA.

FOM	Equação	Treinamento	Teste
TFP	$\frac{FP}{VN + FP}$	8,1%	11,7%
TFN	$\frac{FN}{VP + FN}$	8,0%	8,5%
SEN	$\frac{VP}{VP + FN}$	92,0%	91,5%
SPE	$\frac{VN}{VN + FP}$	91,9%	88,3%
TCONF	$\frac{VN + VP}{VN + FP + VP + FN}$	83,9%	79,8%

TFP: taxa de falso-positivo; TFN: taxa de falso-negativo; SEN: sensibilidade, taxa de verdadeiro positivo; SPE: especificidade, taxa de verdadeiro negativo; TCONF: taxa de confiabilidade do modelo; FP: falso-positivo; FN: falso-negativo; VP: verdadeiro positivo; VN: verdadeiro negativo.

Os modelos de classificação construídos neste capítulo visaram a análise forense por discriminação preliminar. Assim, avaliando-se com foco analítico, o método de triagem desenvolvido deve minimizar principalmente falso-negativos, porque os resultados falso-positivos podem ser verificados por análise complementar para confirmação da adulteração com utilização de métodos de referência convencionais e mais laboriosos<sup>96</sup>. Levando isso em consideração, uma TFN abaixo de 10% para o conjunto teste foi considerada aceitável para nossos objetivos. Entretanto, em termos judiciais, uma amostra não adulterada classificada como adulterada por manter sob custódia uma pessoa inocente. Desta forma, a quantidade de previsões erradas deve ser minimizada. Nos modelos desenvolvidos neste trabalho a TFP ficou em torno de 12%, para testes de triagem esse resultado pode ser considerado aceitável.

### 3.4.1.2.1 Estimativa de incerteza por reamostragem por *bootstrap*

Conforme verificado na Figura 22, algumas amostras foram alocadas sobre o limite de decisão ou muito próximo a ele. Assim, a fim de completar a validação analítica do método, as incertezas para previsões das amostras foram estimadas empregando reamostragem por *bootstrap*. Ao realizar sucessivas reamostragens, uma boa estimativa dos parâmetros pode ser obtida. Desta forma, os dados dos resíduos de cada uma das amostras foram reatribuídos aleatoriamente e as estimativas foram recalculadas. Este procedimento foi realizado 1000 vezes.

Barras de erro para os valores de cada uma das previsões são mostradas na Figura 22. Seis amostras no conjunto de treinamento apresentaram valores de limite de confiança que excederam o *threshold*. Duas dessas amostras foram previstas de forma errada pelo modelo (um FP e um FN), enquanto as outras quatro amostras eram verdadeiro positivas. Para o conjunto teste, nenhuma amostra apresentou um intervalo de confiança que ultrapassou o *threshold*. Amostras que apresentaram barras de erro que ultrapassaram o *threshold* foram consideradas como previsões inconclusivas. Assim, as taxas de resultados inconclusivos foram estimadas para o modelo como 3,8% para o conjunto de treinamento e 0% para o conjunto teste.

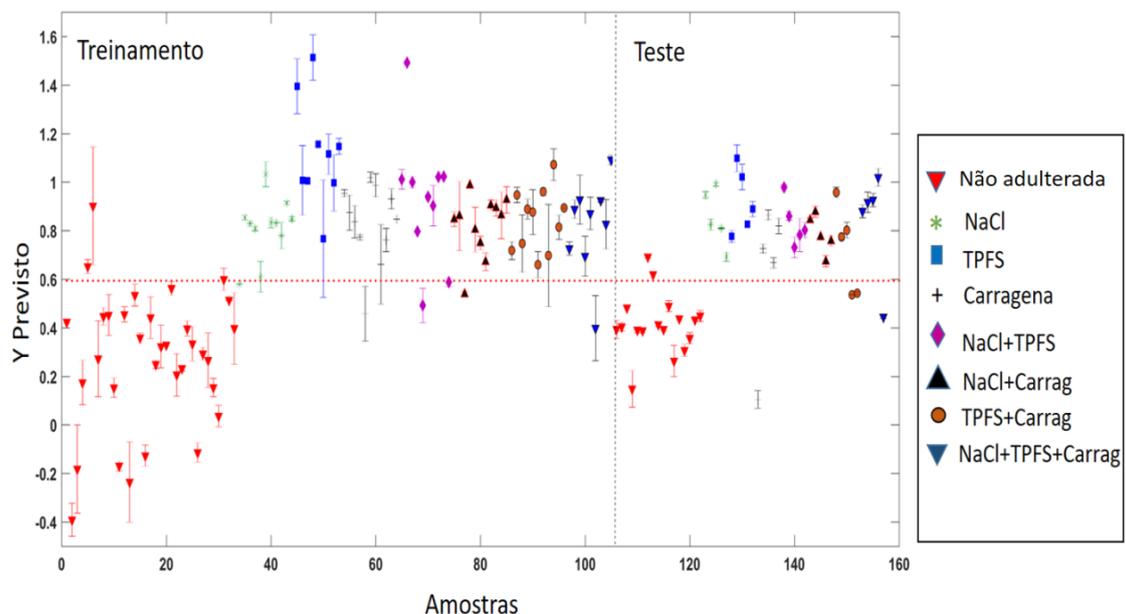


Figura 22 - Estimativa de incerteza por reamostragem por *bootstrap*. Em destaque as barras de erro para as previsões das amostras.

#### 3.4.1.2.2 Tentativa de construção de modelos por modelagem de classes

A fim de verificar a possibilidade de modelagem de classe, a SIMCA direcionado aos dados (DD-SIMCA, *data driven SIMCA*)<sup>97</sup> e modelos de uma classe PLS (OCPLS)<sup>98</sup> foram construídos para os dados de espectroscopia Raman. Os melhores modelos foram obtidos com 5 componentes principais para DD-SIMCA e 7 LV para OCPLS. Esses modelos apresentaram resultados semelhantes, com taxa de sensibilidade elevada (cerca de 94%), mas taxa de especificidade baixa (menor que 40%). Assim sendo, a modelagem de classe por estes dois métodos foi considerada insatisfatória para a identificação de fraude por adição de substâncias não cárneas às amostras estudadas.

Resultados semelhantes foram obtidos por outros autores na construção de modelos de classificação por modelagem de classe para detectar grãos de arroz infestados, e a justificativa para estes resultados foi a alta heterogeneidade das amostras<sup>69</sup>. No caso da adulteração de carnes, amostras não adulteradas foram obtidas de diferentes origens sem controle dos fatores *ante mortem*– tais como raça, sexo, idade, consumo de ração e manuseio, os quais podem influenciar nas características físico-químicas das amostras. Além disso, os adulterantes avaliados provocam alterações semelhantes nas proteínas da carne. Assim, não foi possível com esses dados obter modelos de modelagem de classe com desempenho tão satisfatório quanto aquele fornecido pelo PLS-DA.

### 3.4.2 AMOSTRAS DE CARNE

Para a construção dos modelos de classificação supervisionada, foram utilizadas 64 amostras de carne, sendo 16 amostras em cada classe: não adulteradas, cloreto de sódio (NaCl), tripolifosfato de sódio (TPFS) e Carragena (Carrag).

As amostras foram divididas em dois conjuntos de dados, sendo 44 amostras para o conjunto treinamento e 20 amostras para o conjunto teste. A seleção das amostras nos dois conjuntos foi realizada utilizando o algoritmo KS separadamente em cada classe. O número de amostras escolhidas em cada classe foi definido previamente como dois terços para o conjunto de treinamento e um terço para o conjunto teste, aproximadamente. O algoritmo KS foi aplicado antes da construção de cada modelo. A definição de amostras adulteradas como classe 1 e amostras não adulteradas como classe 0 foi arbitrária.

Os espectros Raman registrados para as 64 amostras são mostrados na Figura 23. Nesta figura, é apresentada a região utilizada para a construção do modelo, delimitada pelos retângulos vermelhos, correspondente às regiões de estiramento das ligações C-H, O-H, N-H ( $3602\text{ cm}^{-1}$  a  $2543\text{ cm}^{-1}$ ) e de deformações angulares das ligações  $\text{CH}_2$  e modos Amidas (I e III) – região de *fingerprint* ( $1868\text{ cm}^{-1}$  a  $518\text{ cm}^{-1}$ ). A região final do espectro, próximo a  $250\text{ cm}^{-1}$  apresenta informação referente a linha do laser e foi eliminada para a construção do modelo por não possuir resultados informativos.

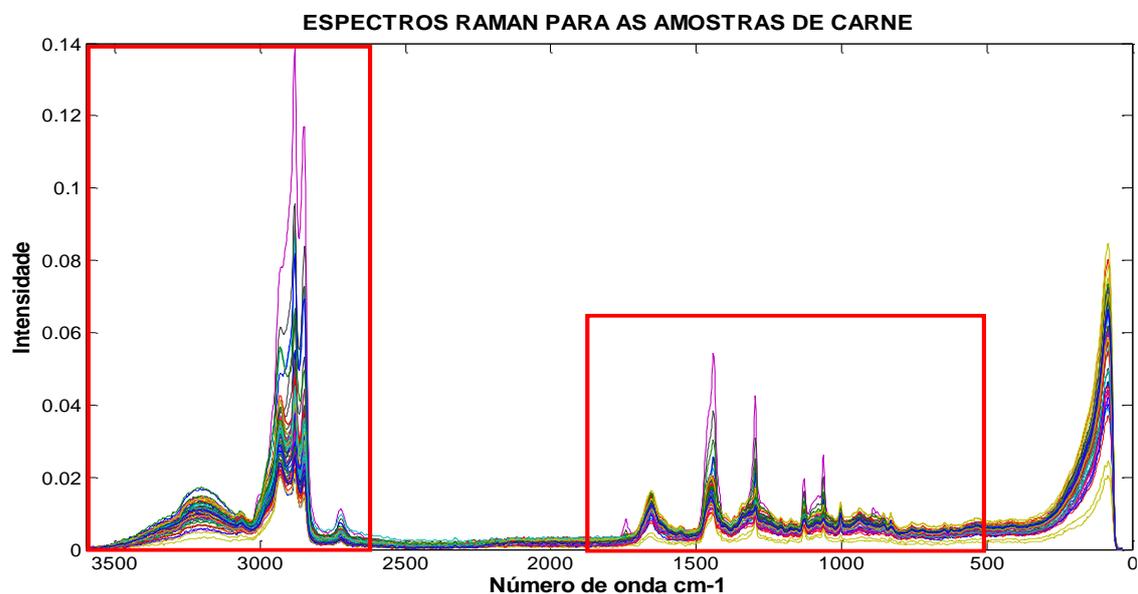


Figura 23 - Espectros Raman para as 64 amostras de carne. Os retângulos vermelhos correspondem às regiões utilizadas para a construção dos modelos de classificação.

Após a separação das amostras nos conjuntos de treinamento e teste usando o algoritmo KS, os dados foram pré-processados na seguinte sequência: inicialmente foi aplicada a normalização com vetor unitário a fim de corrigir as variações sistemáticas dos espectros Raman. Em seguida, os dados foram centrados na média. Por fim, o número de variáveis latentes (LV) foi selecionado por validação cruzada usando venezianas (*venetian blinds*) com 6 divisões, com base na menor erro de classificação da validação cruzada (CVCE).

### 3.4.2.1 Modelos de classificação multiclasse para identificação de amostras adulteradas com adição de solução de adulterantes

Os resultados obtidos para os modelos de classificação para as adulterações individuais com adição de cloreto de sódio, tripolifosfato de sódio e carragena são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Figuras de mérito do modelo de classificação individuais construído com os espectros Raman – Amostras de carne.

PARÂMETROS		ADULTERANTES		
		NaCl	TPFS	Carragena
TREINAMENTO	TFN (%)	9,1	18,2	0,0
	TFP (%)	12,1	12,1	18,2
	SEN (%)	90,9	81,8	100,0
	SPE (%)	87,9	87,9	81,8
TESTE	TFN (%)	40,0	100,0	60,0
	TFP (%)	40,0	6,7	46,7
	SEN (%)	60,0	0,0	40,0
	SPE (%)	60,0	93,3	53,3

O modelo de classificação de amostras adulteradas com a injeção de solução de cloreto de sódio apresentou valores elevados para as taxas de falso-positivos e falso-negativos (40,0%) para o conjunto teste. O alto valor para a taxa de falso-negativo é considerado como resultado crítico para o modelo uma vez que, por se tratar de um método de triagem, as amostras detectadas como não adulteradas não serão submetidas ao procedimento de confirmação, ao contrário das amostras consideradas como

adulteradas, que serão submetidas a análises por outras técnicas analíticas e/ou métodos de referência para confirmação ou não da adulteração.

Os valores de sensibilidade e seletividade do modelo foram de 90,9% e 87,9% para o conjunto treinamento, respectivamente. Para o conjunto teste, estes parâmetros apresentaram valores iguais a 60,0%, resultado considerado baixo para um modelo de classificação supervisionada. Entretanto, este resultado era esperado, uma vez que os espectros Raman obtidos não apresentam bandas características do NaCl, pois as vibrações da ligação NaCl ocorrem em regiões abaixo de  $200\text{ cm}^{-1}$ , região esta que não foi avaliada neste trabalho. Em contrapartida, conforme discutido na seção 3.4.1, a presença de sais provoca a mudança na conformação proteína. A determinação de NaCl pode ser avaliada de forma indireta na purga a partir da mudança na forma da banda situada na região de  $2900\text{ cm}^{-1}$  a  $3000\text{ cm}^{-1}$  devido a interação observada na região vibracional do estiramento O-H. Entretanto, a alteração da forma da banda de estiramento O-H da água pode ser decorrente de outros fatores, tais como a mudança de temperatura.

O modelo de classificação para identificação de adulteração com solução de tripolifosfato de sódio apresentou menor desempenho para a análise direta da carne por espectroscopia Raman. Este modelo apresentou valores de sensibilidade para o conjunto teste de 0% (100% de falso-negativo) e seletividade em torno de 93,3%. Para o conjunto treinamento, os valores de sensibilidade e especificidade estão acima de 80,0%. Conforme discutido anteriormente, este resultado é insatisfatório por se tratar de um método de triagem em que amostras consideradas não adulteradas não serão submetidas a análise para confirmação ou não da adulteração.

O modelo construído para a identificação de amostras adulteradas com carragena apresentou valores de sensibilidade e seletividade do conjunto teste iguais a 40,0% e 53,3%, respectivamente. Os baixos valores de sensibilidade e seletividade podem ser explicados pela baixa solubilidade da carragena em água a temperatura ambiente. Uma forma de aumentar a solubilidade da carragena em água é a adição de sais de sódio.

### 3.4.2.2 Modelos de classificação binário para identificação de amostras adulteradas

#### – Modelo *Two class*

Para a construção do modelo binário de classificação foram escolhidas 6 VLs, que explicam 98,2% da variância em **X** e 54,7% em **Y**. A verificação de amostras *outliers* não apresentou nenhuma amostra com alto valor de resíduo Q e alto valor de  $T^2$  de Hotelling simultaneamente. O *threshold* para este modelo foi estimado em 0,62 e as previsões das amostras são apresentadas na Figura 24.

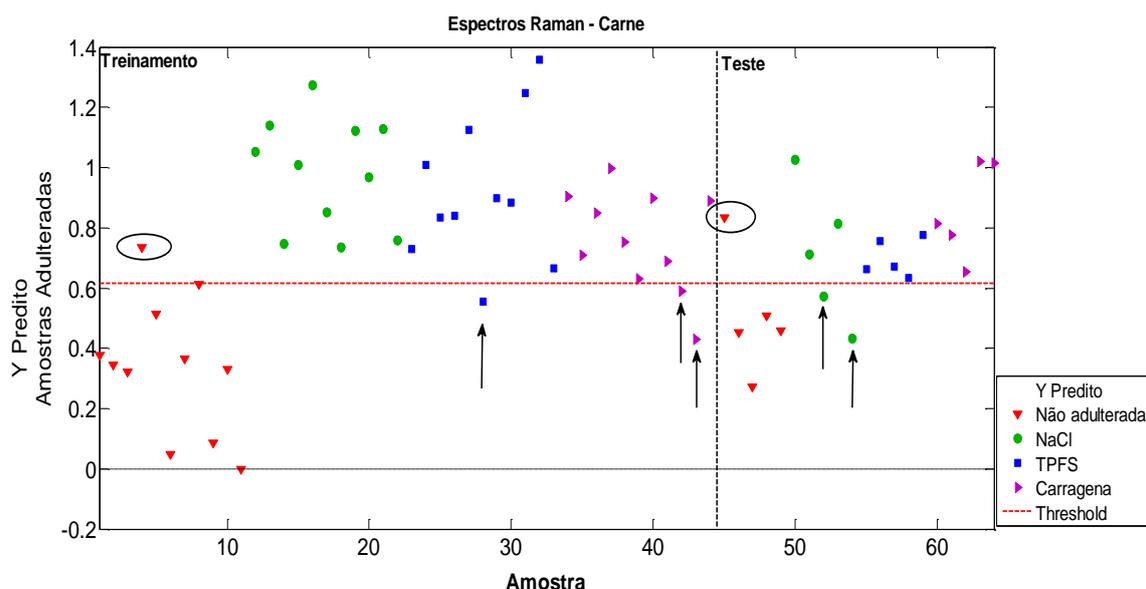


Figura 24 - Modelo PLS-DA para previsão de todas as amostras adulteradas construído com os espectros Raman.

Observa-se nesta figura que no conjunto treinamento 3 amostras adulteradas foram previstas como não adulteradas em 33 amostras possíveis (setas à esquerda – conjunto treinamento – Figura 24). Para o mesmo conjunto, 1 amostra controle foi prevista como adulterada (erro FP) em 11 amostras possíveis (elipse à esquerda – conjunto treinamento – Figura 24). Já o conjunto teste apresentou 2 amostras adulteradas classificadas como não adulteradas em 15 amostras possíveis (setas à direita – conjunto teste – Figura 24), enquanto 1 amostra não adulterada foi classificada como adulterada (FP) em 5 amostras possíveis (elipse à direita – conjunto teste – Figura 24). As figuras de mérito relativas à esta previsão são apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5 - Figuras de mérito do modelo PLS-DA para previsão de todas as amostras de carne adulteradas construído com os espectros Raman.

Parâmetros		MODELO <i>TWO CLASS</i>
<b>TREINAMENTO</b>	<b>TFN (%)</b>	9,1
	<b>TFP (%)</b>	9,1
	<b>SEN (%)</b>	90,9
	<b>SPE (%)</b>	90,9
<b>TESTE</b>	<b>TFN (%)</b>	13,3
	<b>TFP (%)</b>	20,0
	<b>SEN (%)</b>	86,7
	<b>SPE (%)</b>	80,0

Percebe-se, pelos dados da tabela, que este modelo apresenta valores de sensibilidade iguais a 86,7% e especificidade de apenas 80,0% para o conjunto teste. Para o conjunto treinamento, os valores de sensibilidade e seletividade foram iguais a 90,9%. Altas taxas de falso-positivo e falso-negativos foram obtidas neste modelo, especialmente para o conjunto teste que apresentou erros acima de 13,0%. As altas taxas de FP e FN podem ser justificadas pelo conjunto amostral com poucas amostras. Dessa forma, uma única amostra erroneamente classificada apresenta TFP e TFN acima de 10%.

Os coeficientes de regressão para este modelo foram avaliados, apresentando bandas positivas significativas para a previsão de amostras adulteradas em  $1650\text{ cm}^{-1}$  (característica de  $\alpha$ -hélice de amida I)<sup>14; 92</sup>, na região em torno de  $2930\text{ cm}^{-1}$  (associado ao estiramento CH)<sup>92</sup> e em  $940\text{ cm}^{-1}$ . Como bandas significativas para a previsão das amostras controle destacam-se as bandas negativas em  $830\text{ cm}^{-1}$  (bandas duplas atribuídas ao anel benzênico para-substituído de resíduos de tirosina)<sup>92; 99</sup>, em  $1177\text{ cm}^{-1}$  e em  $1470\text{ cm}^{-1}$  (relacionadas a vibrações no plano de CH<sub>2</sub> e CH<sub>3</sub>)<sup>92</sup>. Os coeficientes de regressão deste modelo podem ser observados na Figura 25.

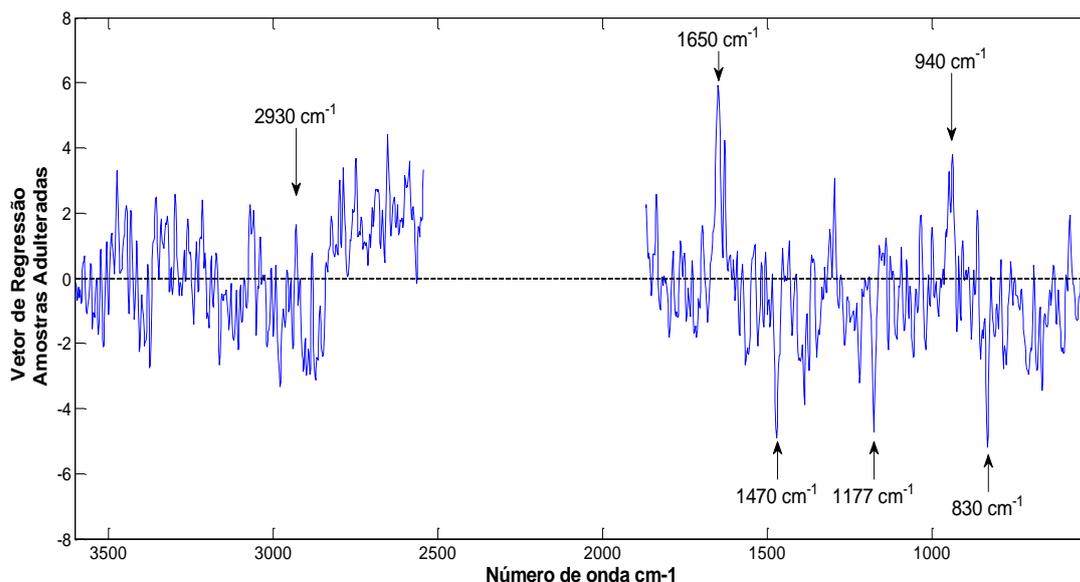


Figura 25- Coeficiente de Regressão para a previsão das amostras adulteradas.

De maneira complementar, analisando-se o gráfico de *VIP scores* (Figura 26), conclui-se que a banda mais significativa para o modelo está situada em torno de 2900  $\text{cm}^{-1}$  (estiramento CH)<sup>92</sup>, seguida, em importância, pelas bandas em 1650  $\text{cm}^{-1}$  ( $\alpha$ -hélice de amida I)<sup>14; 92</sup>, 830  $\text{cm}^{-1}$  (vibração fora do plano de COO)<sup>14</sup>, 1470  $\text{cm}^{-1}$  (vibração no plano de CH<sub>2</sub> e CH<sub>3</sub>)<sup>92</sup>, 1177  $\text{cm}^{-1}$ , 2650  $\text{cm}^{-1}$  e 1390  $\text{cm}^{-1}$ . A banda em torno de 2900  $\text{cm}^{-1}$  está presente nos espectros dos adulterantes padrões de TPFS e carragena.

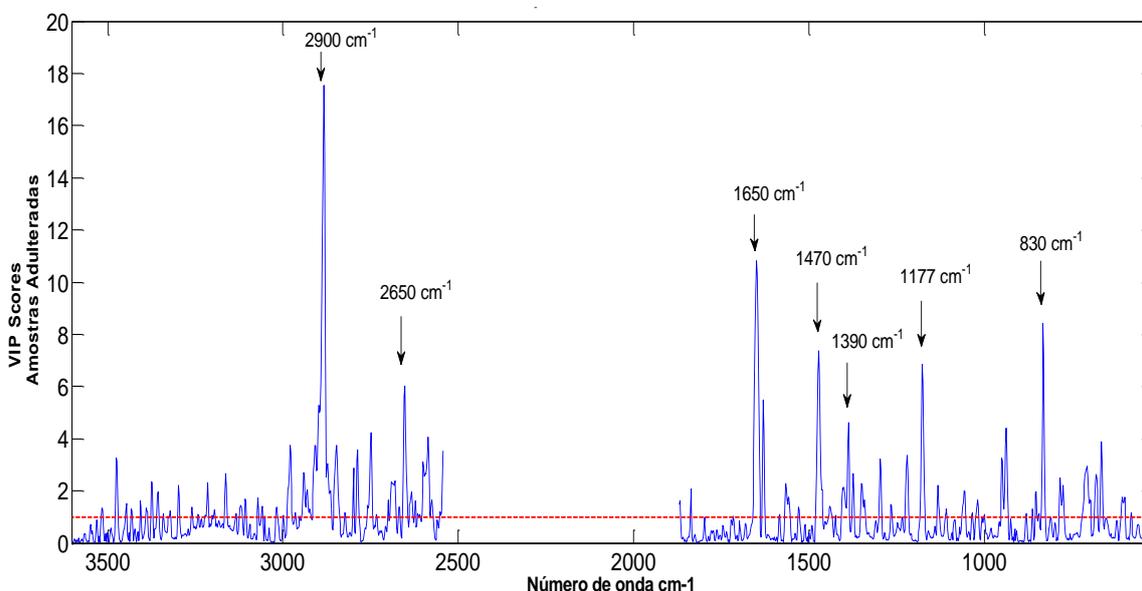


Figura 26 -VIP scores para as variáveis de Raman para a previsão das amostras adulteradas.

### 3.4.2.3 Comparação dos modelos de classificação multiclasse e binário– Carne

Para as amostras de carne foram construídos dois modelos de classificação: previsão de amostras adulteradas *versus* amostras não adulteradas (modelo binário), previsão de amostras adulteradas com solução de cloreto de sódio, previsão de amostras adulteradas com solução de tripolifosfato de sódio e previsão de amostras adulteradas com solução de carragena (modelo multiclasse). Para a comparação global desses modelos, a Tabela 6 apresenta os números de falso-negativos (FN) e falso-positivos (FP) na previsão fornecida por cada um deles, tanto para o conjunto de treinamento, quanto para o conjunto teste. Além disso, são mostrados os valores de TCONF.

Tabela 6 - Comparação dos 4 modelos de classificação construídos para as amostras carne construídos a partir dos Espectros Raman.

PARÂMETROS		MODELOS			
		NaCl	TPFS	Carragena	<i>Two Class</i>
TREINAMENTO	TCONF (%)	78,8	69,7	81,8	81,8
	FN	1	2	0	3
	FP	4	4	6	1
TESTE	TCONF (%)	20,0	0,0	0,0	66,7
	FN	2	5	3	2
	FP	6	1	7	1
N° VLs		6	5	5	6
Variância X(%)		98,2	96,4	97,9	98,2
Variância Y(%)		57,6	48,0	38,0	54,7

Observando-se os resultados da Tabela 6, é possível verificar que o modelo discriminante para a previsão das amostras adulteradas *versus* as amostras não adulteradas é o melhor modelo construído com dados de espectroscopia Raman. Este modelo forneceu valores de TCONF igual a 81,8% para o conjunto treinamento e igual a 66,7% para o conjunto teste. Em contraposição, os modelos para previsão individual dos adulterantes apresentaram taxas de eficiência abaixo de 20,0% para o conjunto teste.

O modelo de classificação binário apresentou 3 amostras adulteradas classificadas como FN para o conjunto treinamento e 2 amostras para o conjunto teste. Nos conjuntos

treinamento e teste 1 amostra não adulterada foi incorretamente classificada como adulterada (FP).

Entre os modelos de classificação individual dos adulterantes, o modelo de previsão de adulteração com solução de cloreto de sódio foi o melhor modelo individual para esta região com TCONF de 78,8% para o conjunto treinamento e apenas 20,0% de taxa de confiabilidade para o conjunto teste. Este modelo classificou 1 amostra adulterada com NaCl como FN para os conjuntos treinamento e 2 amostras para o conjunto teste, enquanto o número de FP foi igual a 4 amostras para o conjunto treinamento e 6 amostras para o conjunto teste. Entretanto, o modelo de previsão para as amostras adulteradas com solução de tripolifosfato de sódio e o modelo de identificação de adulteração com carragena foram os piores modelos individuais apresentando TCONF igual a zero para o conjunto teste.

Em conclusão a esta seção, o modelo binário (incluindo todas as amostras adulteradas de carne) foi considerado o melhor modelo para a detecção de fraude em estudo entre os modelos construídos para a previsão de amostras de carne bovina adulteradas. A região do espectro Raman compreendida em regiões de estiramento das ligações C-H ( $3602\text{ cm}^{-1}$  a  $2543\text{ cm}^{-1}$ ) e de deformações angulares das ligações  $\text{CH}_2$  e modos Amidas (I e III) – região de *fingerprint* ( $1868\text{ cm}^{-1}$  a  $518\text{ cm}^{-1}$ ) mostrou-se significativa para a identificação da adulteração. Todavia, embora tenha apresentado os melhores resultados, a baixa TCONF para o conjunto teste torna o modelo insatisfatório para alcançar o objetivo proposto. Além disso, os modelos para cloreto de sódio, tripolifosfato de sódio e carragena não são modelos apropriados para caracterização deste tipo de fraude, sendo que o modelo construído para as amostras de tripolifosfato de sódio apresentou menor desempenho entre os modelos para esta região.

### 3.5 CONCLUSÕES PARCIAIS

De um modo geral, a espectroscopia vibracional Raman permite o estudo das modificações das estruturas das proteínas, com as folhas- $\alpha$  e folhas  $-\beta$ . A espectroscopia Raman permite, também, a obtenção de informações acerca dos resíduos de aminoácidos. Tais alterações, permitiram a identificação da adulteração em carnes bovinas *in natura*.

Em conclusão a esta seção, pode-se observar que a análise da purga apresentou-se satisfatória para a identificação de fraude por injeção de produtos não cárneos à carne bovina *in natura*. Entretanto, o modelo binário de previsão de amostras adulteradas de carne foi considerado um modelo ruim para a detecção sistemática do tipo de fraude em estudo em amostras de carne bovina *in natura* para a região do espectro Raman compreendida em regiões de estiramento das ligações C-H ( $3602\text{ cm}^{-1}$  a  $2543\text{ cm}^{-1}$ ) e de deformações angulares das ligações  $\text{CH}_2$  e modos Amidas (I e III) – região de *fingerprint* ( $1868\text{ cm}^{-1}$  a  $518\text{ cm}^{-1}$ ). Além disso, os modelos para cloreto de sódio, tripolifosfato de sódio e carragena não foram modelos apropriados para caracterização deste tipo de fraude, sendo o modelo construído para as amostras de tripolifosfato de sódio o pior modelo para esta região, possivelmente pela baixa retenção deste adulterante pela matriz.

**CAPÍTULO 4: MODELO DISCRIMINANTE  
FLEXÍVEL (*SOFT* PLS-DA) PARA DETECTAR FRAUDES  
EM CARNE BOVINA *IN NATURA* COM BASE EM  
ESPECTROS DE INFRAVERMELHO MÉDIO DE SUAS  
PURGAS**

## **4.1 OBJETIVOS**

O objetivo do presente estudo foi desenvolver um método de triagem rápido, robusto e confiável utilizando espectroscopia de infravermelho médio e um método quimiométrico discriminante – PLS-DA – para detectar fraudes por adição de cloreto de sódio, tripolifosfato e carragena em carne bovina *in natura*, através da análise de suas purgas. Para tal, foram criados modelos de classificação multiclasse para detecção individual dos adulterantes e um modelo global binário para detecção de adulterações contendo, no mínimo, um dos adulterantes citados acima.

De forma complementar, as abordagens binária e multiclasse foram comparadas, os modelos construídos foram validados e as figuras de mérito apropriadas foram estimadas.

## **4.2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.2.1 MATERIAIS E REAGENTES**

Além dos materiais e reagentes descritos na seção 3.2.1, foi adquirida a maltodextrina da Athletica Nutrition (Matão, São Paulo, Brasil).

### **4.2.2 EQUIPAMENTOS E INSTRUMENTOS UTILIZADOS**

Os equipamentos utilizados nesta aplicação foram os mesmos descritos na seção 3.2.2. Foi utilizado um espectrofotômetro de infravermelho médio FTIR Frontier (Perkin Elmer, Massachusetts, EUA), usando acessório de reflectância total atenuada (ATR) equipado com cristal de diamante, pertencente ao Departamento de Química da UFMG, em Belo Horizonte.

### **4.2.3 PREPARO DE AMOSTRAS**

As amostras foram preparadas conforme procedimento descrito na seção 3.2.3. Devido a limitações na detecção de fraudes diretamente nas amostras de carne observadas em estudo prévio<sup>17</sup>, as análises foram realizadas em amostras de purgas (Figura 11). Em contraposição à análise anterior por espectroscopia Raman, não foi necessária a centrifugação das amostras de purga.

Em um procedimento similar ao descrito na seção 3.2.3, outras 20 amostras provenientes de cinco peças de carne foram adulteradas com maltodextrina a 5% e 10% em ganho de massa, e as respectivas purgas foram obtidas.

#### 4.2.4 AQUISIÇÃO DE ESPECTROS

Para análise das amostras de purgas, pequenos volumes foram adicionados sobre o cristal de ATR, com utilização de pipetas Pasteur, até a cobertura total da abertura do cristal, conforme mostrado na Figura 27. Após a adição da amostra, os espectros foram imediatamente obtidos na faixa espectral de  $4000\text{ cm}^{-1}$  a  $550\text{ cm}^{-1}$  com resolução de  $4\text{ cm}^{-1}$  e 64 varreduras. O tempo total de análise foi de, aproximadamente, 3 minutos por amostra.

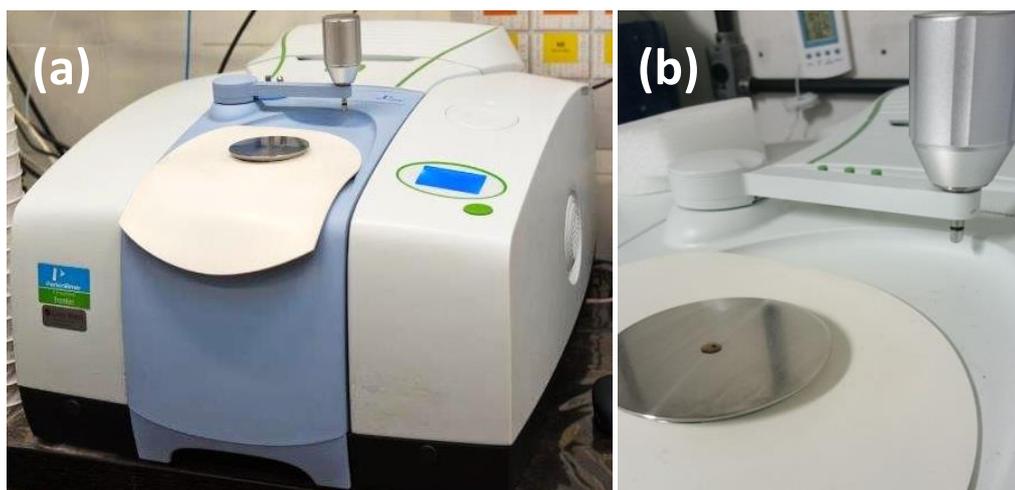


Figura 27 (a) Espectrofotômetro de infravermelho médio FTIR Frontier com acessório de reflectância total atenuada (ATR). (b) Pequeno volume de amostra adicionada até a cobertura total da abertura do cristal.

#### 4.3 PROCESSAMENTO DE DADOS

Os dados obtidos foram processados com o programa MATLAB versão 8.4 (The MathWorks, Natick, EUA), utilizando o pacote PLS Toolbox versão 7.0 (Eigenvector Technologies, Manson, EUA).

#### 4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os modelos de classificação supervisionada construídos a partir das análises da purga no infravermelho foram divididos em quatro seções. A primeira seção apresenta os resultados obtidos pela tentativa de construção de um modelo SIMCA. Na segunda seção, os resultados encontrados para os modelos multiclasse (detecção de adulterações individuais com NaCl, TPFS e carragena, respectivamente) são apresentados. Tal abordagem foi proposta como forma de verificação da adequação dos modelos para detecção destes adulterantes em amostras que contenham apenas um deles, ou soluções binárias ou ternárias deles<sup>76</sup>. A terceira seção apresenta o modelo PLS-DA de duas classe

para classificação das amostras adulteradas contra as amostras não adulteradas (modelo binário). Por fim, na quarta seção são apresentados resultados referentes à aplicação da detecção de *outliers* como ferramenta para aumentar a robustez do modelo PLS-DA flexível construído para previsão das amostras adulteradas versus amostras não adulteradas.

Para a construção dos modelos PLS-DA para os dados de infravermelho foram utilizadas 176 amostras distribuídas entre as classes. As amostras foram divididas em dois conjuntos de dados, sendo 121 amostras para o conjunto treinamento e 55 amostras para o conjunto teste. O conjunto de treinamento deve apresentar amostras que são representativas de toda a variabilidade incluída no modelo, enquanto o conjunto teste é usado para testar sua eficácia de maneira robusta e independente, a partir de amostras que foram omitidas na sua construção. A detecção prévia de *outliers* foi aplicada ao conjunto treinamento. Amostras que apresentaram resíduos Q e valores de influência ( $T^2$  de Hotelling) acima dos limites estimados em níveis de confiança de 95% foram detectadas como *outliers* e removidas do modelo. No total, duas amostras não adulteradas foram excluídas dos modelos após a detecção inicial de *outliers*. Desta forma, o modelo foi construído com 119 amostras no conjunto treinamento e 55 amostras no conjunto teste (Tabela 7).

Tabela 7 - Distribuição das amostras de purga nos conjuntos treinamento e teste.

Descrição	Total de amostras	Número de amostras Treinamento	Número de amostras Teste
<b>Amostras não adulteradas</b>	62	42	20
<b>Cloreto de Sódio (NaCl)</b>	16	11	5
<b>Tripolifosfato de sódio (TPFS)</b>	16	11	5
<b>Carragena (Carrag)</b>	16	11	5
<b>NaCl + TPFS</b>	16	11	5
<b>NaCl + Carrag</b>	16	11	5
<b>TPFS + Carrag</b>	16	11	5
<b>NaCl + TPFS + Carrag</b>	16	11	5
<b>TOTAL</b>	<b>174</b>	<b>119</b>	<b>55</b>

A seleção das amostras nos dois conjuntos foi realizada utilizando o algoritmo KS separadamente em cada classe. O número de amostras escolhidas em cada classe foi definido previamente como aproximadamente dois terços para o conjunto de treinamento e um terço para o conjunto teste. O algoritmo KS foi aplicado antes da construção de cada modelo. Portanto, as amostras de treinamento e teste são as mesmas nos modelos apresentados nas seções a seguir. Para os modelos de classificação, foi atribuído arbitrariamente a definição de amostras adulteradas como classe 1 e amostras não adulteradas como classe 0. Após a separação das amostras nos conjuntos de treinamento e teste usando o algoritmo KS, os dados foram pré-processados na seguinte sequência. Primeiro, foi aplicada correção da linha de base utilizando-se a variação normal padrão (*SNV – Standard Normal Variate*)<sup>100</sup>. Este procedimento visa eliminar variações sistemáticas, relacionadas a desvios de linha-base, não relacionadas com a investigação da propriedade química de interesse. Em seguida, os dados foram centrados na média (*mean center*). Por fim, para seleção do número de variáveis latentes as amostras foram submetidas à validação cruzada usando o critério de venezianas (*venetian blinds*) com 6 divisões para o modelo SIMCA e 10 divisões para os modelos PLS-DA.

Os espectros FTIR registrados para as 174 amostras são mostrados na Figura 28. Visualmente, é difícil notar alguma discriminação entre as amostras adulteradas e controle. Desta forma, a análise quimiométrica torna-se essencial para a interpretação dos dados. Os espectros no infravermelho médio foram agrupados em uma matriz de dados para análise multivariada empregando SIMCA e PLS-DA. Para a construção dos modelos, foram eliminadas as regiões de número de onda entre 1800  $\text{cm}^{-1}$  e 2400  $\text{cm}^{-1}$  (região de absorção de  $\text{CO}_2$  e região de absorção do diamante do ATR<sup>101</sup>), abaixo de 950  $\text{cm}^{-1}$  e acima de 3700  $\text{cm}^{-1}$  (regiões contendo somente ruído espectral). Desta forma, as regiões utilizadas para a construção dos modelos compreendem as faixas de 3699  $\text{cm}^{-1}$  a 2400  $\text{cm}^{-1}$  e 1799  $\text{cm}^{-1}$  a 950  $\text{cm}^{-1}$  (Fig. 28 – retângulos vermelhos).

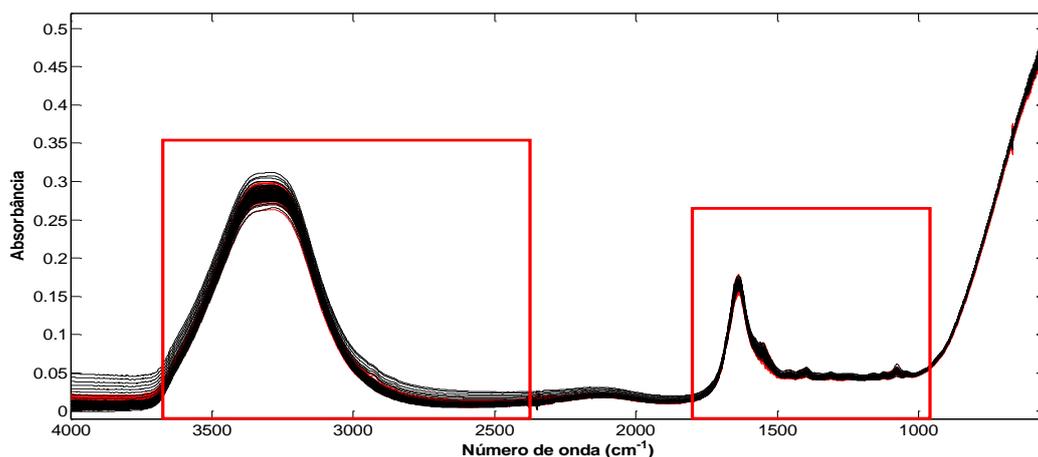


Figura 28 - Espectros FTIR para as 174 amostras de purga. Espectros em pretos (amostras adulteradas) e espectros em vermelho (amostras não adulteradas). Retângulos vermelhos indicam a região espectral utilizada na construção dos modelos de classificação.

#### 4.4.1 MODELO SIMCA

Um modelo de classificação por modelagem de uma classe utilizando o método SIMCA foi construído. A classe modelada foi a classe de amostras não adulteradas. O melhor modelo foi selecionado por validação cruzada de venezianas (6 divisões), construído com três componentes principais, e representou 90,1% da variância (dados não mostrados). Contudo, este SIMCA de uma classe proporcionou uma boa taxa de sensibilidade (SEN = 95,5% no conjunto de treinamento, com apenas dois FN, e 100% no conjunto teste) ao custo de especificidade baixa, abaixo de 50%.

Quando a variância da classe não adulterada é baixa, o SIMCA e outros métodos de modelagem de classes tendem a mostrar resultados que justificam sua preferência sobre métodos discriminantes. No entanto, quando as amostras não adulteradas são diversificadas e a variância da respectiva classe é alta, os métodos de modelagem de classe tendem a fornecer modelos com alta capacidade de detectar amostras adulteradas ao custo de baixa capacidade de classificar amostras não adulteradas<sup>69</sup>, ou a situação inversa, dependendo do número de CPs escolhidos para construir o modelo. Nestes casos, os métodos discriminantes tendem a produzir melhores modelos preditivos.

Ao considerar produtos alimentícios fabricados sob condições estritamente controladas, é mais fácil obter um conjunto representativo de amostras não adulteradas que permita modelar uma classe alvo com baixa variância relativa. Entretanto, quando a matriz alimentar em estudo é de origem animal e não processada, como a carne bovina *in natura*, essa variabilidade pode ser grande, inclusive para o mesmo corte de animais de

diferentes origens, sem controle das condições de criação e fatores *ante mortem*. Isso dificulta a obtenção de uma classe alvo de baixa variabilidade e tende a favorecer o uso de métodos discriminantes.

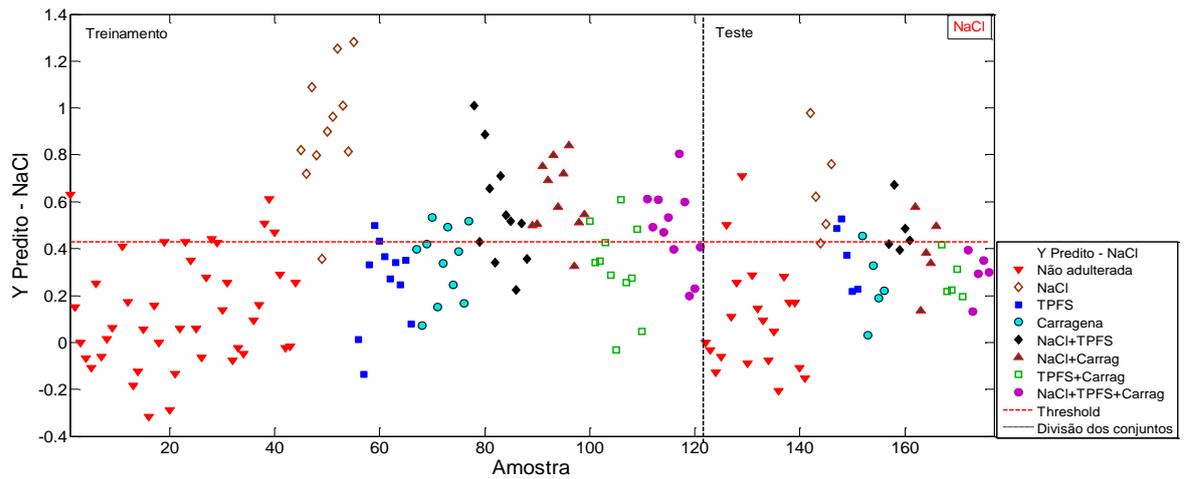
#### 4.4.2 MODELOS DE CLASSIFICAÇÃO MULTICLASSE PARA IDENTIFICAÇÃO DE AMOSTRAS ADULTERADAS COM ADIÇÃO DE SOLUÇÃO DE ADULTERANTES

Três modelos multiclasse PLS1-DA foram construídos correlacionando os espectros com vetores  $y$  específicos, cada um contendo 1,0 quando a amostra é adulterada com NaCl, STPP ou carragena, e 0,0 caso contrário. É importante ressaltar que esses adulterantes estão presentes isoladamente e em misturas binárias e ternárias, dificultando a tarefa de classificação.

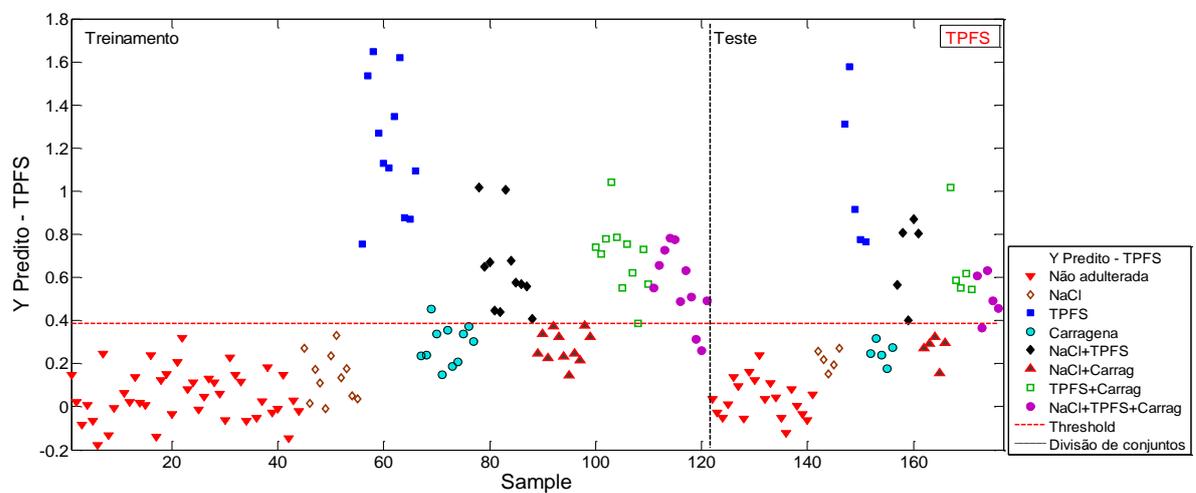
As informações sobre os modelos PLS1-DA construídos utilizando espectroscopia na região do infravermelho médio e as figuras de mérito são apresentados na Tabela 8. As previsões para os modelos com adição de cloreto de sódio, tripolifosfato de sódio e carragena são apresentadas, respectivamente, na Figura 29.

Tabela 8 - Figuras de mérito dos modelos de classificação construído com os espectros FTIR.

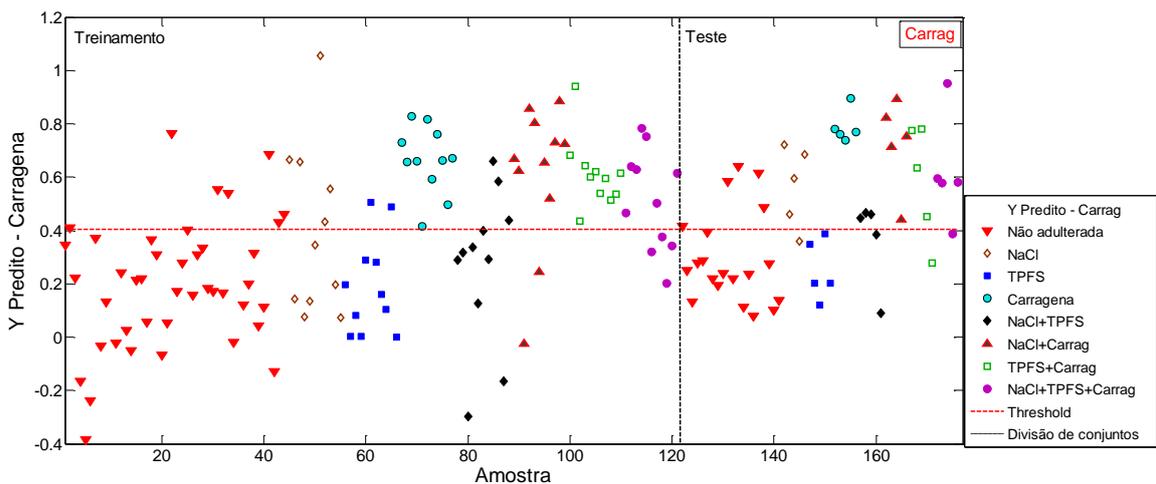
PARÂMETROS		ADULTERANTES		
		NaCl	TPFS	Carragena
TREINAMENTO	TCONF (%)	60,0	91,9	63,7
	FN	10	3	6
	FP	13	1	17
	TFN (%)	22,7	6,8	13,6
	TFP (%)	17,3	1,3	22,7
	SEN (%)	82,7	98,7	77,3
	SPE (%)	77,3	93,2	96,4
TESTE	TCONF (%)	30,7	95,0	55,7
	FN	11	1	2
	FP	5	0	12
	TFN (%)	55,0	5,0	10,0
	TFP (%)	14,3	0,0	34,3
	SEN (%)	85,7	100,0	65,7
	SPE (%)	45,0	95,0	90,0
N° VLs		6	4	5
Variância X(%)		98,6	97,1	97,7
Variância Y(%)		43,4	64,4	36,3



(a)



(b)



(c)

Figura 29 - Modelos PLS-DA para as adulterações individuais: (a) Cloreto de sódio (NaCl); (b) Tripolifosfato de sódio (TPFS); (c) Carragena (Carrag).

O modelo de classificação para detecção de adulteração com adição de cloreto de sódio foi construído utilizando 6 VL, que explicam 98,6% da variância em X e apenas 43,4% em Y. Dentre os modelos testados, as previsões do modelo PLS-DA para NaCl foram as piores, com TFN de 22,7% e TFP de 17,3% para o conjunto de treinamento, e TFN de 55,0% e TFP de 14,3% para o conjunto teste. Altos valores de falso-negativos são mais críticos que altos valores de falso-positivos, pois por se tratar de um método de triagem, neste caso as amostras consideradas como não adulteradas não seriam submetidas a análises por outras técnicas analíticas e/ou métodos de referência para confirmação ou não da adulteração. Percebe-se claramente que este modelo não foi capaz de discriminar corretamente a presença de NaCl, apresentando uma SPE baixa e uma TCONF para o conjunto teste de apenas 30,7%. Isso já poderia ser esperado, porque o NaCl não apresentava modos vibracionais na região espectral estudada<sup>23</sup>. No entanto, a presença desse sal na depuração pode ser indiretamente determinada por suas interações com moléculas de água e proteínas da carne, que afetam as estruturas conformacionais secundárias das proteínas<sup>102</sup>. Essas alterações estão refletidas nas regiões espectrais vibracionais relacionadas ao modo amida I -  $1600\text{ cm}^{-1}$  a  $1700\text{ cm}^{-1}$  – (Figura 30 – (a-II)), regiões de modo amida II –  $1500\text{ cm}^{-1}$  a  $1600\text{ cm}^{-1}$  - (Figura 30- (a – I)). Estudos apontam que a adição de NaCl induz a formação de agregados de folhas  $\beta$  de proteínas, e estas podem ser detectadas através das bandas em  $1690\text{ cm}^{-1}$  e  $1235\text{ cm}^{-1}$  - (Figura 30 – (a-IV))<sup>102</sup>. Verifica-se, também, a região entre  $3000\text{ cm}^{-1}$ - $3400\text{ cm}^{-1}$ , atribuída ao estiramento de OH em água (Figura 30 – (a-III)). Os vetores de regressão para este modelo e os demais modelos de classificação individuais são mostrados na Figura 30. Coeficientes de regressão positivos estão relacionados a adulterações, enquanto coeficientes negativos estão associados à classificação de amostras não adulteradas.

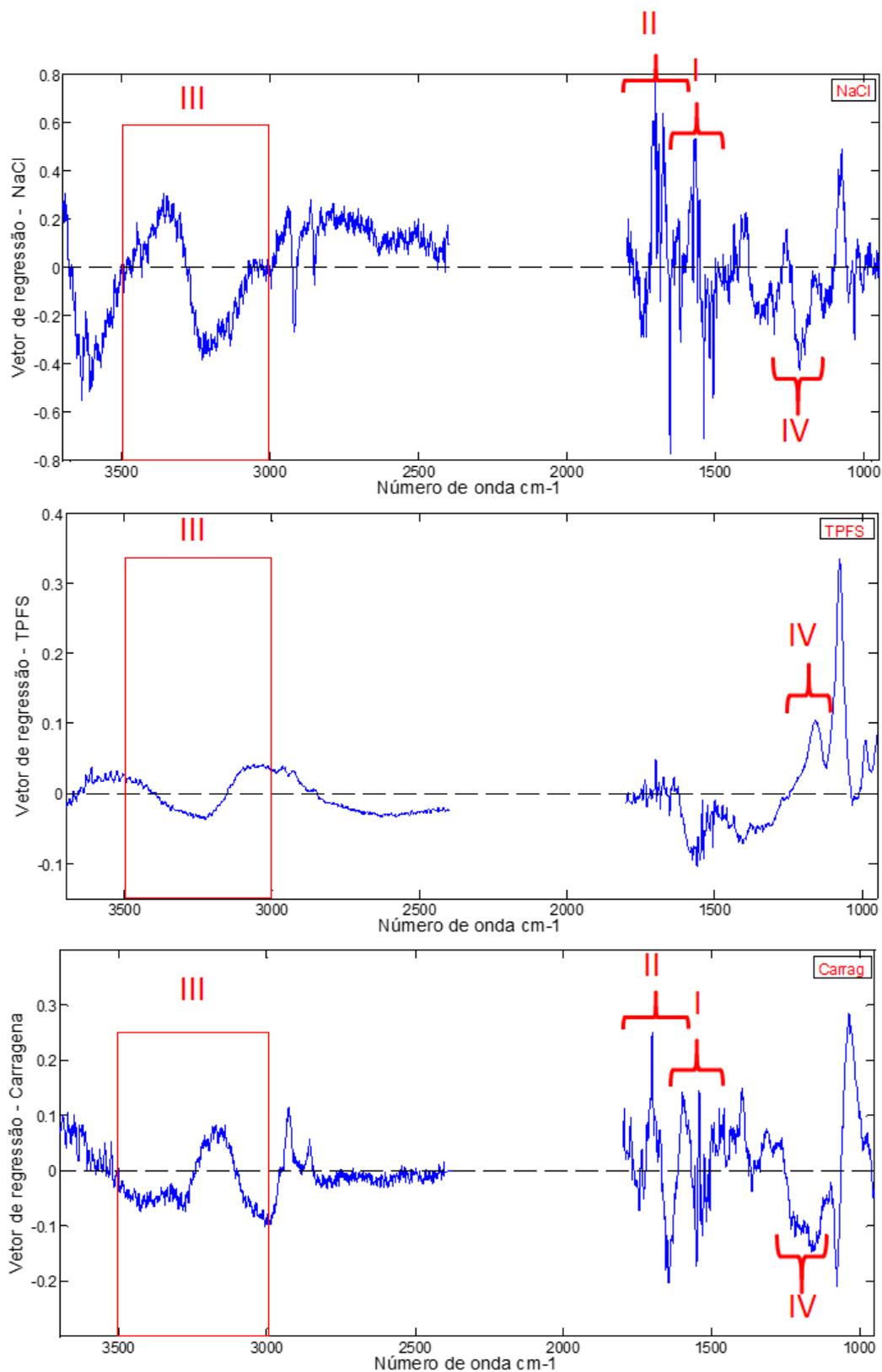


Figura 30 - Vetores de regressão para os modelos de classificação individual: (a) Cloreto de sódio (NaCl); (b) Tripolifosfato de sódio (TPFS); (c) Carragena (Carrag). Regiões destacadas: (I) modo amida II – 1500 cm<sup>-1</sup> a 1600 cm<sup>-1</sup>, (II) modo amida I - 1600 cm<sup>-1</sup> a 1700 cm<sup>-1</sup>, (III) estiramento de OH em água - 3000 cm<sup>-1</sup> a 3400 cm<sup>-1</sup> e (IV) agregados de folhas  $\beta$  de proteínas em 1235 cm<sup>-1</sup>.

O modelo multiclasse para a carragena foi construído utilizando 5 variáveis latentes, que explicam 97,7% da variância em X e apenas 36,3% da variância em Y. Em geral, este modelo apresentou baixa capacidade preditiva, com TFN de 13,6% e TFP de 22,7% para o conjunto de treinamento, e TFN de 10,0% e TFP de 34,3% para o conjunto teste (Tabela 8). Uma explicação para esse modelo de pouca capacidade preditiva está relacionada à baixa solubilidade do kappa-carragena em soluções aquosas abaixo de 80°C<sup>24</sup>. Avaliando o vetor de regressão para o modelo de previsão de amostras adulteradas com carragena é possível observar que as regiões mais significativas para a caracterização desta fraude são as regiões de amida I (Figura 30 - (c-II)) e amida II (Figura 30 - (c-I)). Vibrações características de kappa-carragena são encontradas em 1030 cm<sup>-1</sup> (estiramento de polissacarídeo CO), 1080 cm<sup>-1</sup> (vibrações de estiramento de CO e COH), 1220 cm<sup>-1</sup> (estiramento de sulfato de éster), 1390 cm<sup>-1</sup> e entre 1650-1530 cm<sup>-1</sup> (C = O)<sup>103,104</sup>. O gráfico de *VIP scores* para este modelo é mostrado na Figura 30, apresentando bandas acima do limiar de significância (1,0) relacionados a todas essas vibrações. No entanto, os dois *VIP scores* mais intensos estão na região entre 1650-1530 cm<sup>-1</sup>.

Ao contrário do modelo para identificação de adulteração com NaCl, as previsões do PLS-DA para o tripolifosfato de sódio foram as melhores entre os três modelos multiclasse. TCONF de 91,9% e 95,0% foram obtidas para treinamento e teste, respectivamente. Esse modelo forneceu apenas um FP e três FN para o conjunto de treinamento e apenas um FN para o conjunto teste. Isso resultou em SEN e SPE acima de 93% (Tabela 8). Em contraste com o NaCl, as moléculas de TPFS apresentam absorções características na região espectral do infravermelho, com vibrações em 740 cm<sup>-1</sup>, 990 cm<sup>-1</sup> e 1150 cm<sup>-1</sup><sup>96; 105</sup>. Os *VIP scores* mais intensos deste modelo (Figura 31) estão relacionados a um pico centrado em 1150 cm<sup>-1</sup>, que foi atribuído a vibrações de estiramento P = O e considerado como uma impressão digital do TPFS. Avaliando o vetor de regressão para o modelo de previsão deste tipo de adulteração, é possível observar que as regiões mais significativas para a caracterização desta fraude são relativas a agregados de folhas  $\beta$  de proteínas (Figura 30- (b-IV)).

De maneira geral, a análise dos gráficos de *VIP scores* (Figura 31) permite verificar que as bandas consideradas significativas para a previsão das amostras adulteradas (valores relativos superiores a 1,0) são 1650 cm<sup>-1</sup>, referente à região de amida I (Figura 31 - (a)), 1540 cm<sup>-1</sup>, referente à região típica de amida II<sup>102</sup> (Figura 31 - (b)), 1700 cm<sup>-1</sup>, região de amida I (Figura 31 - (c)), 1080 cm<sup>-1</sup>, característica de estiramentos

de CO e de COH<sup>104</sup> (Figura 31 - (d)), 3600 cm<sup>-1</sup> (Figura 31 - (e)), 3180 cm<sup>-1</sup>, referente à região de estiramento N-H de amida<sup>14</sup> e estiramento OH de água<sup>92</sup> (Figura 31 - (f)), 1220 cm<sup>-1</sup> (Figura 31 - (g)), 2930 cm<sup>-1</sup> característica de estiramento CH<sup>92</sup> (Figura 31 - (h)), 1160 cm<sup>-1</sup> (Figura 31 - (i)) e 1040 cm<sup>-1</sup> (Figura 31 - (j)).

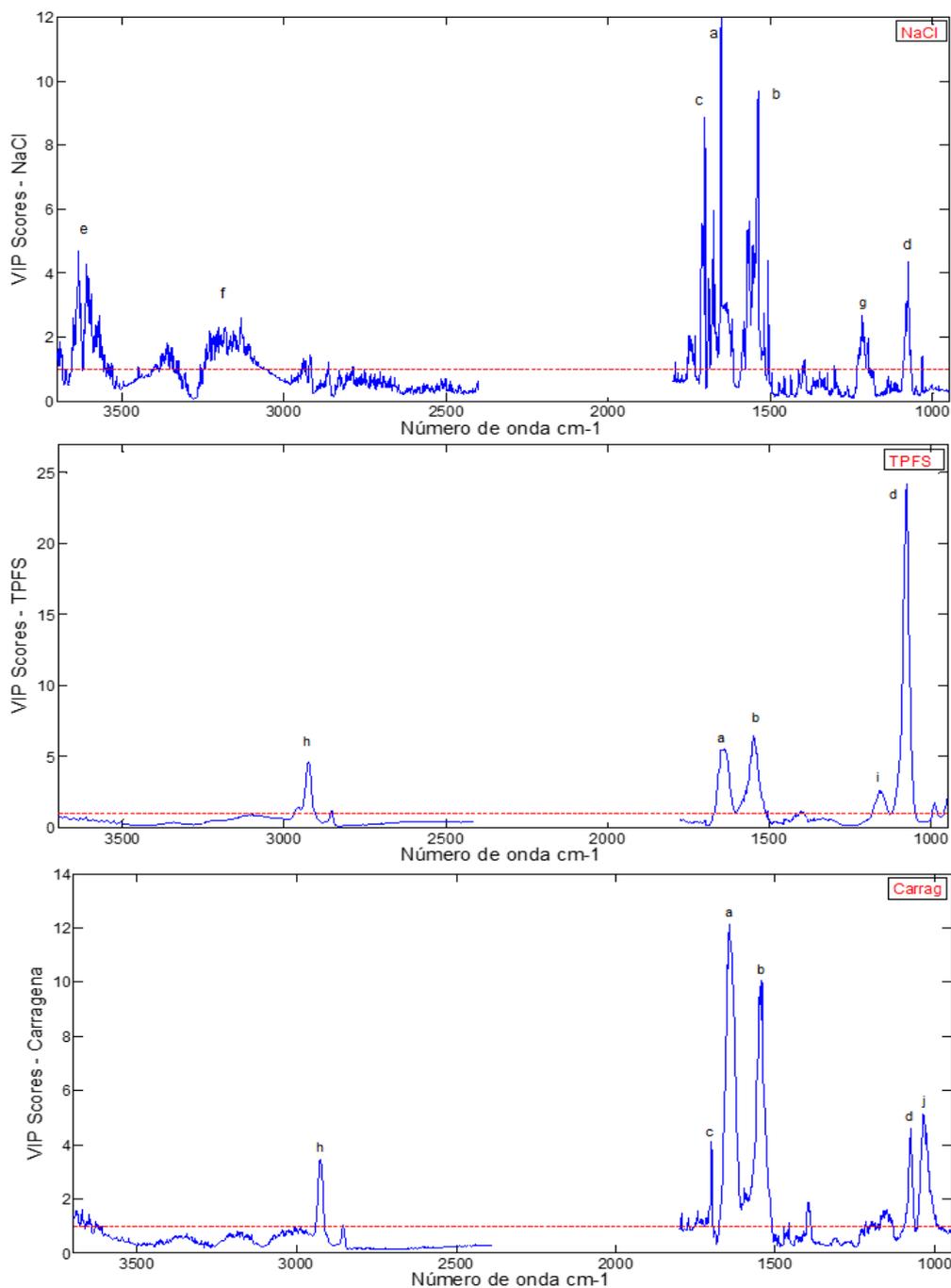


Figura 31 - VIP scores para os modelos PLS1-DA multiclasse. Em destaque as bandas características (a) 1650 cm<sup>-1</sup> – amida I, (b) 1540 cm<sup>-1</sup> – amida II, (c) 1700 cm<sup>-1</sup> – amida I, (d) 1080 cm<sup>-1</sup> – estiramentos de Co e COH, (e) 3600 cm<sup>-1</sup>, (f) 3180 cm<sup>-1</sup> – estiramento N-H de amida e estiramento OH de água, (g) 1220 cm<sup>-1</sup>, (h) 2930 cm<sup>-1</sup> – estiramento CH, (i) 1160 cm<sup>-1</sup> e (j) 1040 cm<sup>-1</sup>.

#### 4.4.3 MODELO BINÁRIO DE CLASSIFICAÇÃO PARA IDENTIFICAÇÃO DE AMOSTRAS ADULTERADAS VERSUS AMOSTRAS NÃO ADULTERADAS (MODELO TWO CLASS)

Considerando as limitações dos modelos PLS-DA multiclasse para detectar especificamente dois dos três adulterantes de carne, um modelo discriminante binário é apresentado como uma opção melhor para detectar fraudes em carne de maneira não específica. O melhor modelo PLS-DA foi obtido com a abordagem binária, utilizando 121 amostras no conjunto de treinamento e 55 amostras no conjunto teste. Foram escolhidas 8 variáveis latentes que explicam 99,4% da variância no bloco X e 76,0% da variância no bloco Y. O *threshold* Bayesiano foi estimado em 0,55.

O modelo de previsão das amostras adulteradas é apresentado na Figura 32. Como pode ser observado, apenas uma amostra adulterada foi prevista como não adulterada (FN) e duas amostras não adulteradas foram previstas como adulteradas (FP) no conjunto de treinamento. Esses resultados correspondem a uma TFP de 4,8% e TFN de 1,3%. No conjunto teste, apenas um falso positivo (5,0%) foi observado. Como consequência, a SEN foi igual a 95,2% e 95,0% para conjuntos de treinamento e teste, respectivamente. Reciprocamente, a SPE foi igual a 98,7% e 100,0% para os conjuntos de treinamento e teste, respectivamente. Por fim, a TCONF foi estimada em 93,9% e 95,0% para os conjuntos de treinamento e teste, respectivamente, o melhor resultado dentre todos os modelos desenvolvidos utilizando FTIR. Todas estas FOM são mostradas na Tabela 9.

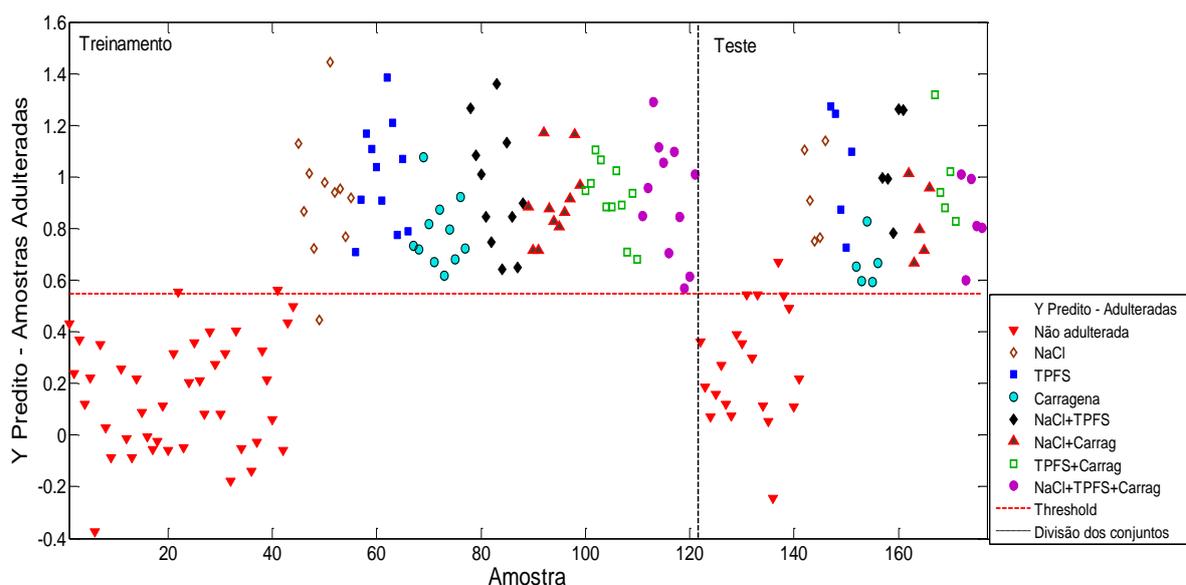


Figura 32 - Modelo PLS-DA para previsão de amostras adulteradas versus amostras não adulteradas.

Tabela 9 - Figuras de mérito dos modelos de classificação construído com os espectros FTIR - Modelo Global

PARÂMETROS		MODELO	
		TWO CLASS	SOFT PLS-DA
TREINAMENTO	TCONF (%)	93,9	93,9
	FN	1	1
	FP	2	2
	TFN (%)	1,3	1,3
	TFP (%)	4,8	4,8
	SEN (%)	95,2	95,2
	SPE (%)	98,7	98,7
TESTE	TCONF (%)	95,0	100,0
	FN	0	0
	FP	1	0
	TFN (%)	0,0	0,0
	TFP (%)	5,0	0,0
	SEN (%)	95,0	100,0
	SPE (%)	100,0	100,0
N° VLs		8	8
Variância X(%)		99,4	99,4
Variância Y(%)		76,0	76,0

Para a interpretação espectral deste modelo PLS-DA, é importante avaliar o vetor de regressão (Figura 33) em conjunto com o gráfico de *VIP scores* (Figura 34). Avaliando-se os coeficientes de regressão para as variáveis utilizadas neste modelo, valores positivos estão relacionados a adulterações, enquanto valores negativos estão associados à classificação de amostras não adulteradas. Neste modelo, as regiões espectrais a e b contêm números de onda discriminantes para a presença de adulterantes, enquanto as regiões c e d contêm variáveis que mais contribuem para a detecção de amostras não adulteradas. Verificam-se bandas positivas associadas à previsão de amostras adulteradas em torno de  $1080\text{ cm}^{-1}$  e  $1150\text{ cm}^{-1}$ , bandas habitualmente atribuída aos estiramentos de CO e de COH<sup>104</sup> de polissacarídeos (presentes na carragena) e ao estiramento P=O característico de TPFS, respectivamente. A região b (Figura 33-b), entre  $1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ , está associada às vibrações do modo amida I, que podem estar relacionadas à presença

de NaCl. Reciprocamente, o coeficiente de regressão mais negativo corresponde a uma banda larga em torno de  $1675\text{ cm}^{-1}$ , comumente atribuída à vibração da ligação entre folhas beta ( $\beta$ -turns) em proteínas como o colágeno presente naturalmente na carne (Figura 33– a)<sup>106</sup>. Da mesma forma, são observadas bandas largas negativas, associadas à previsão de amostras não adulteradas entre  $1250\text{ cm}^{-1}$  e  $1600\text{ cm}^{-1}$  (Figura 33 – c), características de amida II, e entre  $3080\text{ cm}^{-1}$  e  $3270\text{ cm}^{-1}$ , região característica de estiramento OH de água (Figura 33- d)<sup>102</sup>.

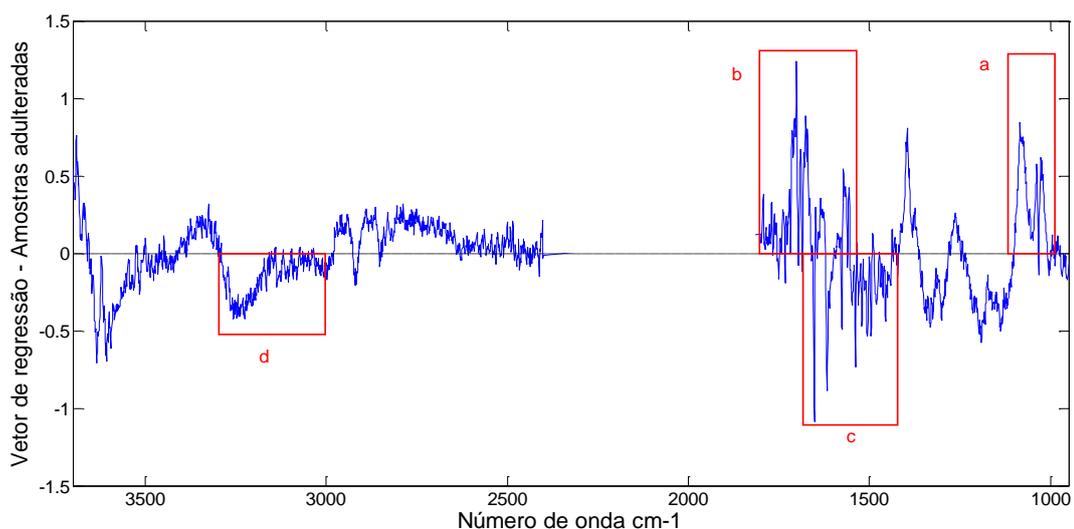


Figura 33 - Vetor de regressão para o modelo PLS-DA para previsão de amostras adulteradas – modelo global. Em destaque as bandas em torno de (a)  $1675\text{ cm}^{-1}$  – folhas- $\beta$  de proteínas, (b)  $1700\text{ cm}^{-1}$  a  $1600\text{ cm}^{-1}$  – amida I, (c)  $1600\text{ cm}^{-1}$  a  $1250\text{ cm}^{-1}$  – amida II e (d)  $2370\text{ cm}^{-1}$  a  $3080\text{ cm}^{-1}$  – estiramento OH de água.

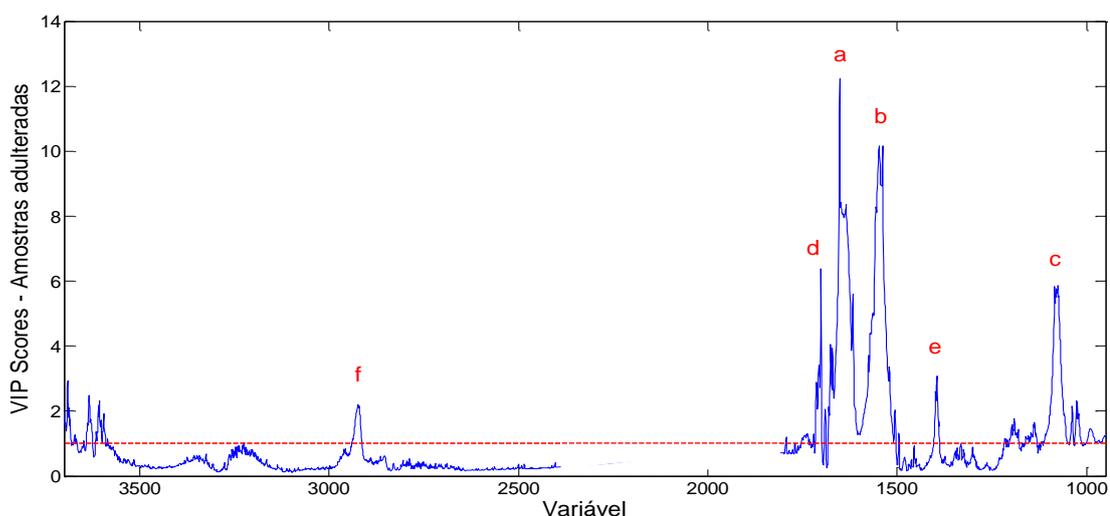


Figura 34 - VIP scores para o modelo PLS-DA binário para previsão de amostras adulteradas – modelo Two Class. Em destaque as bandas em torno de (a)  $1650\text{ cm}^{-1}$  – amida I, (b)  $1550\text{ cm}^{-1}$  – amida II, (c)  $1080\text{ cm}^{-1}$  – estiramento CO e estiramento COH, (d)  $1700\text{ cm}^{-1}$  – folhas- $\beta$  de proteínas, (e)  $1390\text{ cm}^{-1}$  e (f)  $2900\text{ cm}^{-1}$  - estiramento CH.

A análise espectral do modelo PLS-DA binário é complementada pela observação dos *VIP scores* mais intensos (Figura 34). Ao contrário dos coeficientes de regressão, os *VIP scores* representam a contribuição das variáveis para o modelo em termos absolutos. Os números de onda com intensidade de *VIP scores* superior a 1,0 contribuíram significativamente para o modelo. Os *VIP scores* mais intensos estão marcados na Figura 34 e foram associados a: região característica de amida II situadas em  $1550\text{ cm}^{-1}$  (Figura 34- b), seguida, em importância, pelas bandas em  $1650\text{ cm}^{-1}$  - região de amida I (Figura 34- a) e  $1080\text{ cm}^{-1}$  característica de estiramento de CO e ao estiramento de COH (Figura 34- c)<sup>104</sup>,  $1700\text{ cm}^{-1}$  característico de agregados de folhas  $\beta$  quando há adição de NaCl (Figura 34- d)<sup>102</sup>,  $1390\text{ cm}^{-1}$  (Figura 34- e) e em torno de  $2900\text{ cm}^{-1}$ , característica de estiramento CH (Figura 34 - f)<sup>92</sup>.

#### 4.4.4 MODELO PLS-DA FLEXÍVEL COM EMPREGO DE DETECÇÃO DE OUTLIERS (SOFT PLS-DA)

O modelo PLS-DA apresentado na última seção (4.4.3) forneceu bons resultados, com SEN em torno de 95% e SPE superior a 98%. No entanto, este tipo de modelo discriminante binário tem sido alvo de críticas, porque não seria capaz de detectar novos tipos de fraudes. Essa limitação potencial foi contornada pela adoção de uma metodologia de detecção de *outliers* como uma etapa de otimização de uma versão flexível do PLS-DA (seção 2.5.4).

O objetivo desta etapa foi a verificação da habilidade do modelo em prever amostras contendo adulterantes não utilizados na construção do modelo (conjunto de treinamento). Desta forma, o modelo foi validado com um conjunto teste contendo 20 amostras adulteradas com solução 5% m/v de maltodextrina. Um total de dez amostras foram adulteradas até um ganho de 10% em massa e as outras 10 amostras foram adulteradas até um ganho de 5% em massa utilizando seringas descartáveis ponta *luer lock* 60 mL acopladas com agulhas fúcsia 40 mm x 1,20 mm.

Duas amostras não adulteradas foram detectadas como *outliers*, uma vez que apresentaram resíduos Q e valores de  $T^2$  de Hotelling acima dos limites para um nível de confiança de 95%. Assim, o melhor modelo PLS-DA foi construído utilizando 139 amostras (119 amostras no conjunto treinamento e 20 amostras de maltodextrina no conjunto teste). Foram utilizadas 8 variáveis latentes que explicam 99,4% da variância em X e 76,0% da variância em Y. O threshold Bayesiano foi estimado em 0,55.

Para este modelo, a SEN e a SPE foram iguais a 95,2% e 98,7% para o conjunto treinamento, respectivamente. Para o conjunto teste, os valores obtidos foram iguais a 100,0%. Todas as figuras de mérito para o modelo são apresentados na Tabela 9.

A detecção de *outliers* para este modelo foi avaliado de duas formas: a primeira baseia-se na detecção de *outliers* a partir dos erros estimados em  $\mathbf{y}$  e a segunda a partir do gráfico de  $T^2$  de Hotelling *versus* Resíduos Q.

A detecção de *outliers* baseada no modelo de previsão usando amostras adulteradas com maltodextrina como conjunto teste mostrou alta capacidade de previsão deste tipo de fraude em um intervalo de confiança de 99,9%. O limite superior à classe adulterada foi estimado em 1,6089 e o limite inferior para previsão de amostras *outlier* foi calculado como igual a -0,6089, conforme a Figura 35. Amostras que estejam acima do limite superior ou abaixo do limite inferior são consideradas *outliers* do modelo construído.

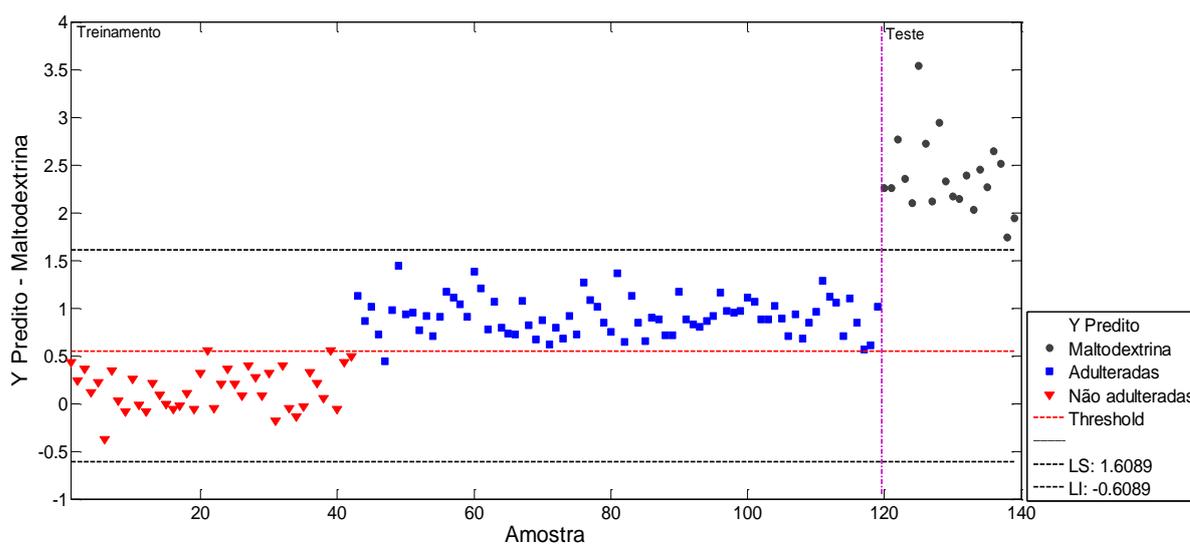


Figura 35 - Modelo PLS-DA para detecção das amostras de maltodextrina como outliers – Modelo Soft PLS-DA. Os limites superior e inferior para a classificação das amostras outliers estão destacadas em preto.

Conforme pode ser verificado na Figura 35, uma amostra adulterada foi prevista como um falso-negativo e duas amostras não adulteradas foram previstas como falso-positivos. Observando as amostras de maltodextrina pertencentes ao conjunto teste, constata-se que 100,0% das amostras foram corretamente previstas como *outliers* no modelo global de previsão de adulteração em amostras de carne bovina *in natura*. Como pode ser observado, todas as 119 amostras do conjunto de treinamento estão dentro dos

limites de aceitação, enquanto todas as 20 amostras adulteradas com maltodextrina apresentaram valores de  $y$  superiores ao limite superior. Assim, um novo tipo de fraude foi identificado corretamente. Geralmente, espera-se que amostras contendo novos tipos de adulterantes apresentem valores de  $y$  acima do limite superior. Por outro lado, espera-se que outros tipos de amostras não adulteradas (por exemplo, outros cortes bovinos) apresentem valores de  $y$  abaixo do limite inferior.

De forma complementar, a detecção de amostras anômalas foi avaliada pelo gráfico de  $T^2$  de Hotelling *versus* Resíduos Q (Figura 36). Como pode ser observado, todas as amostras adulteradas pela adição de solução de maltodextrina apresentaram alta influência e altos resíduos a um nível de confiança de 95% , sendo consideradas, portanto, como *outliers*.

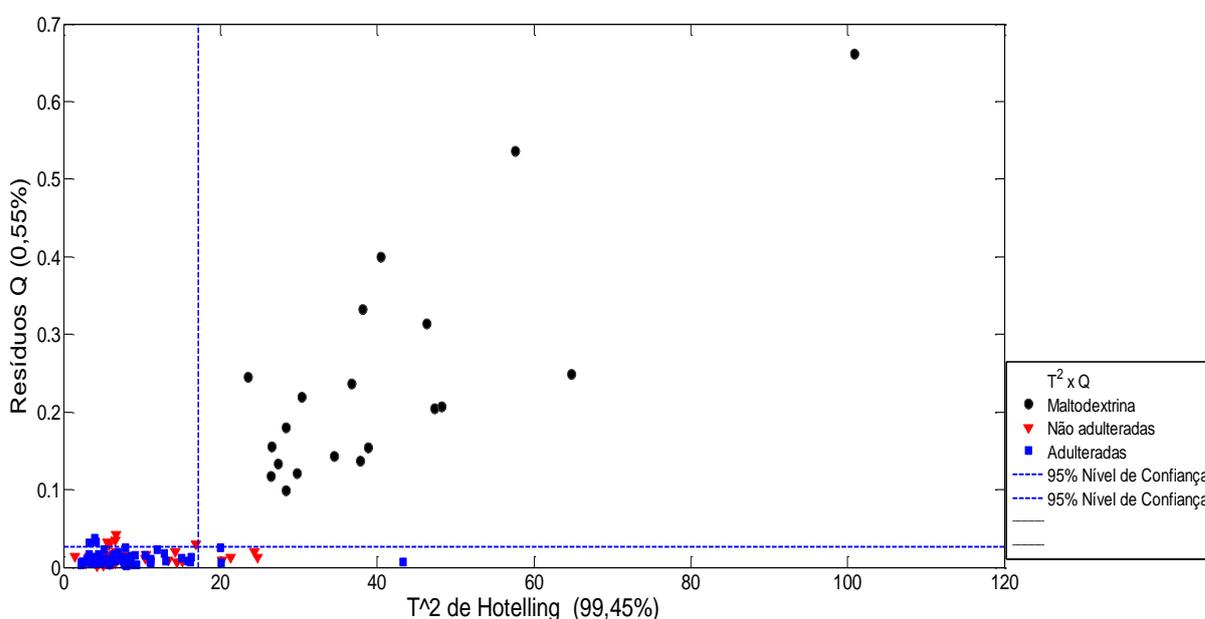


Figura 36 - Gráfico de  $T^2$  de Hotelling versus Resíduos Q para previsão de amostras de maltodextrina como *outliers* – Modelo *Soft PLS-DA*.

## 4.5 CONCLUSÕES PARCIAIS

De um modo geral, a tentativa de construção de um modelo SIMCA não forneceu bons resultados para esta aplicação. Este modelo apresentou boa capacidade de detectar amostras adulteradas, mas baixa capacidade de classificar amostras não adulteradas (seção 4.4.1). O comportamento deste modelo está relacionado com a alta diversidade na classe alvo, uma vez que essas amostras de carne foram originadas de diferentes animais de diversas origens. Resultados semelhantes têm sido observados para modelos de uma classe construídos com grande diversidade de amostras, como o mesmo produto agrícola originário de diferentes países<sup>69</sup> ou diferentes variedades com características diversas<sup>107</sup>.

Em conclusão a esta seção, um método robusto, simples, rápido e baixo custo (apenas o custo do equipamento já existente na maioria das unidades de polícia do país) foi desenvolvido e validado para detecção de fraudes por injeção de cloreto de sódio, tripolifosfato de sódio e carragena em carne bovina *in natura*. Modelos PLS-DA multiclasse construídos para detectar especificamente cada adulterante forneceram bons resultados apenas para o tripolifosfato de sódio. Entretanto, o modelo PLS-DA binário construído para detectar fraudes com esses três adulterantes forneceu os melhores resultados para esta aplicação. Além disso, o modelo PLS-DA flexível construído a partir da metodologia de detecção de *outliers* mostrou-se eficiente para detecção de amostras com algum tipo de desvio em relação à maioria dos dados no conjunto amostral (nova fonte de variância), mostrando-se promissor na análise de autenticidade de alimentos.

**CAPÍTULO 5: EMPREGO DE ESPECTROSCOPIA  
RAMAN DE IMAGEM E MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS  
PARA A DETECÇÃO DE FRAUDES EM CARNES  
BOVINA *IN NATURA***

## 5.1 OBJETIVOS

O objetivo desta seção é o desenvolvimento de um método de triagem utilizando espectroscopia Raman de imagem e o método quimiométrico de resolução multivariada de curvas – MCR – para detectar fraudes em carne bovina *in natura*. Para este fim, foram criados modelos para detecção de fraude por adição de cloreto de sódio, tripolifosfato de sódio, carragena e maltodextrina. Foram utilizadas amostras de carne analisadas diretamente no equipamento de espectroscopia de imagem.

## 5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.2.1 MATERIAIS E REAGENTES

O cloreto de sódio P.A. utilizado foi adquirido da Química Moderna (Barueri, São Paulo, Brasil), tripolifosfato de sódio P.A. da Synth (Diadema, São Paulo, Brasil), carragena kappa da Palazzo do Diet Light (Monteiro Lobato, São Paulo, Brasil) e maltodextrina da Athletica Nutrition (Matão, São Paulo, Brasil). Como solvente foi utilizada água milli-Q (Millipore – Bedford, MA, EUA) com resistividade 18,2 M $\Omega$ . As soluções adulterantes foram injetadas utilizando seringas descartáveis ponta *luer lock* 60 mL (SR Productos para la Salud, Paraguay) acopladas com agulhas fúcsia 40 mm x 1,20 mm (BD PrecisionGlide, Curitiba, Brasil).

### 5.2.2 INSTRUMENTAÇÃO

Foi utilizado um espectrômetro Raman de imagem Xplora Plus (Horiba, São Paulo, Brasil) acoplado a um microscópio ótico, usando uma lente de aumento de 10 vezes, pertencente ao Instituto Nacional de Criminalística, em Brasília. A potência do laser foi selecionada em 100% (785 nm).

### 5.2.3 PREPARO DE AMOSTRAS

Para o preparo das amostras a serem analisadas por espectroscopia de imagem, foi utilizada uma peça de lagarto bovino (*M.semitendinosus*) embalada a vácuo pesando aproximadamente 4,0 kg, adquirida em uma casa de carnes local de fornecedor confiável. A peça de carne foi dividida em 15 frações de aproximadamente 2,5 cm de espessura.

As frações da amostra foram divididas em cinco grupos com três frações cada: amostras não adulteradas, amostras adulteradas com cloreto de sódio, amostras

adulteradas com tripolifosfato de sódio, amostras adulteradas com carragena e amostras adulteradas com maltodextrina.

As três frações de carne que foram selecionadas e identificadas como amostras não adulteradas são duas frações das extremidade da peça de lagarto bovino e uma fração da região central da mesma peça, pois esse corte lagarto bovino apresenta maior concentração de tecido conjuntivo nas suas extremidades quando comparado à região central.

Em cada grupo de amostras adulteradas, a injeção das soluções adulterantes a 5% m/v foi realizada sob condições controladas de volume de injeção e de ganho de massa de 2%, 5% e 10%, respectivamente. Foi verificado experimentalmente que acima de 10% de adulteração, não há ganho significativo de retenção de solução adulterante pela peça de carne. As injeções foram realizadas perpendicularmente à superfície da amostra e de forma que a agulha estivesse inteiramente inserida nesta. Foram utilizadas seringas descartáveis com capacidade de 60 mL, com ponta *luer lock* e acopladas com agulhas fúcsia 40 mm x 1,20 mm. Os adulterantes foram injetados em diversos pontos do corte com espaçamento de cerca de 1 cm entre os pontos. Em cada ponto de injeção foram inseridos aproximadamente 0,5 mL de solução adulterante.

Após a injeção das soluções adulterantes e a separação das amostras não adulteradas, as amostras foram armazenadas em sacos plásticos de polietileno e mantidas em freezer vertical a  $-12^{\circ}\text{C}$  por aproximadamente 7 dias. Para análise no espectrômetro Raman de imagem, as amostras congeladas foram cortadas em frações de aproximadamente 30 mm x 25 mm x 2 mm e colocadas sobre lâmina para microscópico. A fim de evitar a desidratação das amostras, elas foram cobertas com lâminula de vidro e armazenadas sob refrigeração até o momento da análise.

#### **5.2.4 AQUISIÇÃO DOS ESPECTROS**

Para a análise das amostras de carne, as mesmas foram posicionadas no suporte para lâminas de vidro da plataforma do microscópio (Figura 37). Os espectros foram registrados de  $2400\text{ cm}^{-1}$  a  $400\text{ cm}^{-1}$  em mapeamento ponto-a-ponto de uma superfície de  $700\text{ }\mu\text{m} \times 700\text{ }\mu\text{m}$ , obtendo-se um total de 225 espectros por amostra (15 pontos x 15 pontos). O tempo total de análise foi de aproximadamente 2 horas por amostra.

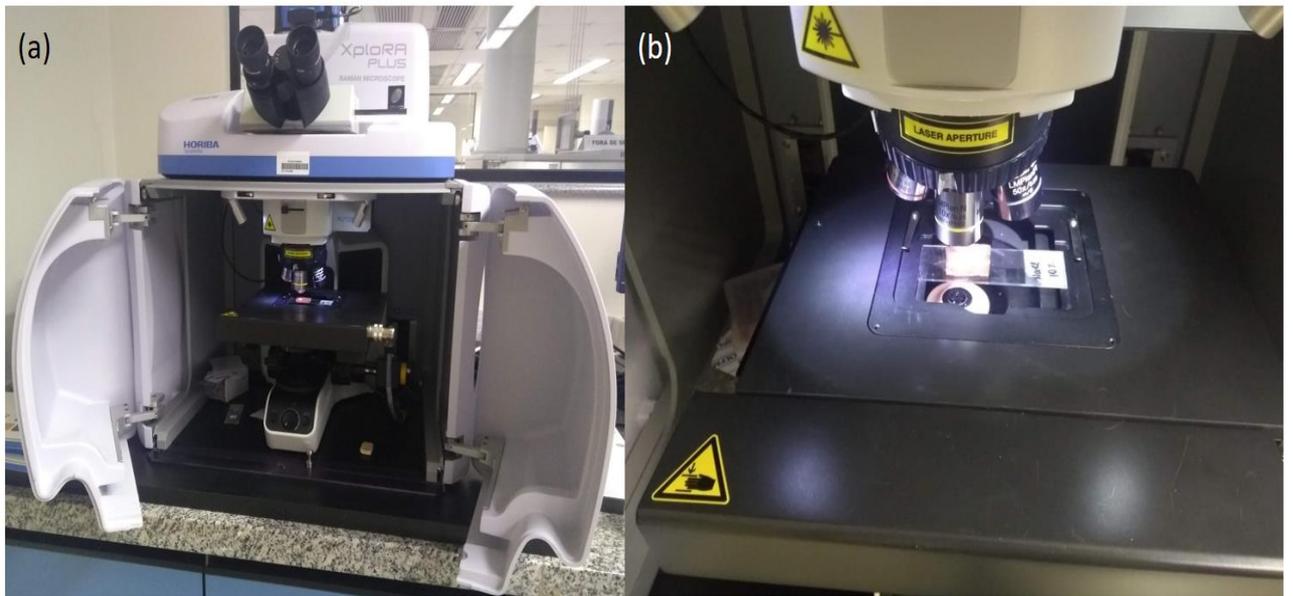


Figura 37 - (a) Espectrômetro Raman de imagem e (b) disposição da amostra na plataforma do microscópio

### 5.3 PROCESSAMENTO DE DADOS

Os dados obtidos foram processados com o programa MATLAB 2015 versão 8.5 (The MathWorks, Natick, EUA), utilizando a interface gráfica Hypertools Toolbox<sup>108</sup> versão 2.0, gratuitamente disponível em <https://www.hypertools.org/download>.

## 5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os modelos MCR-ALS construídos a partir das análises da carne por espectroscopia Raman de imagem estão divididos em quatro subseções. A primeira seção apresenta os resultados encontrados para os modelos individuais visando a identificação de adulteração com cloreto de sódio (NaCl), tripolifosfato de sódio (TPFS), carragena e maltodextrina, respectivamente. Tal abordagem é proposta como forma de verificação da adequação dos modelos para detecção destes adulterantes em amostras de carne. A segunda seção apresenta o modelo para detecção das amostras adulteradas com soluções salinas (NaCl e TPFS) contra as amostras não adulteradas. Na terceira seção é apresentado o modelo de identificação de polissacarídeos (carragena e maltodextrina) contra amostras não adulteradas. Por fim, é apresentado o modelo das amostras adulteradas *versus* amostras não adulteradas (modelo global). Para este modelo, a matriz foi aumentada com os espectros de todas as amostras (Figura 38), contendo, respectivamente, amostras não adulteradas, adulteradas com NaCl, amostras adulteradas com TPFS, amostras adulteradas com carragena e amostras adulteradas com maltodextrina.

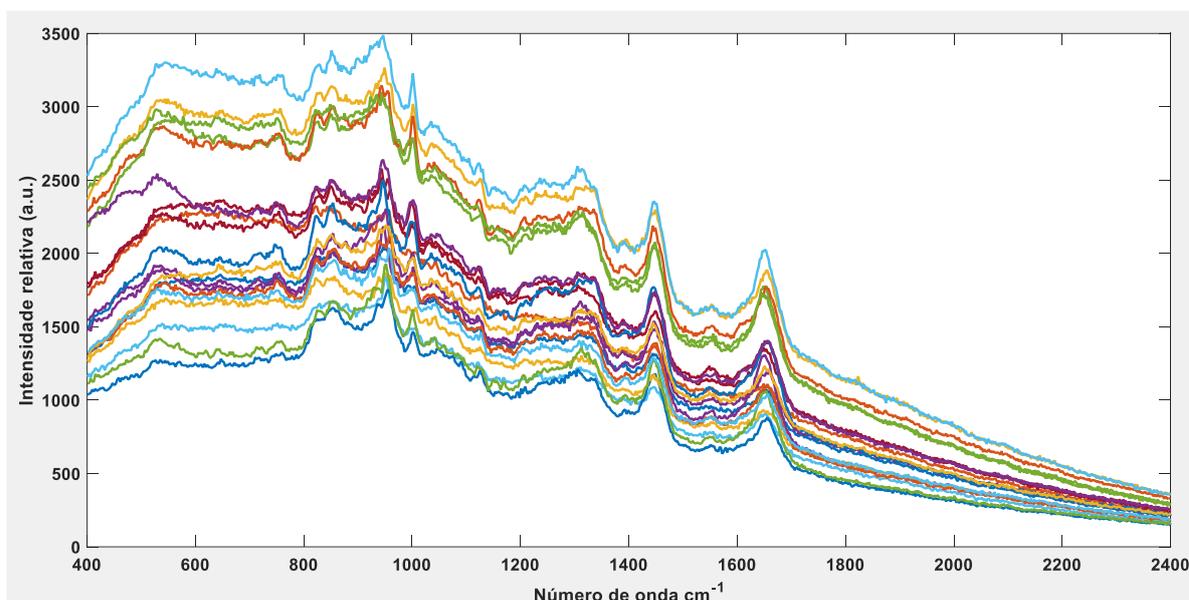


Figura 38 - Espectros médios das amostras de carne analisadas por espectroscopia Raman de imagem.

O mapeamento Raman foi realizado ponto-a-ponto. A faixa espectral mapeada foi de 2400 cm<sup>-1</sup> a 400 cm<sup>-1</sup>. Para a construção dos mapas químicos, foi utilizado o método de resolução multivariada de curvas com mínimos quadrados alternado – MCR-ALS (*Multivariate curve resolution with alternating least-squares*). Todo o espectro e regiões que apresentaram bandas características da presença dos adulterantes foram testadas

sendo utilizada as regiões que apresentaram resultados mais significativas para a identificação da adulteração.

Como pré-processamento foi aplicada primeira derivada conjuntamente com alisamento Savistky-Golay de janela de 7 pontos, a fim de corrigir os desvios dos espectros Raman. Outros pré-processamentos foram testados (alisamento Savistky-Golay, variação normal padrão – SNV e correção de sinais de espalhamento multiplicativo – MSC), mas apresentaram resultados similares. Em seguida, foi aplicada a restrição de não-negatividade na concentração e 6 componentes foram selecionadas por amostragem aleatória.

A análise por MCR-ALS é iniciada a partir do carregamento dos arquivos referentes às imagens que serão analisadas na plataforma da interface gráfica *Hypertools* versão 2.0. Em seguida, o vetor de comprimento de onda é escolhido para disposição das amostras. A segunda etapa desta análise envolve a definição das amostras que serão utilizadas para a análise multivariada e definição do número de linhas e colunas da matriz aumentada. Neste trabalho foram definidas três colunas referente às amostras não adulteradas e às amostras adulteradas nas concentrações de 2%, 5% e 10% em ganho de massa, respectivamente. O número de linhas foi determinado de acordo com a quantidade de adulterante avaliado – 2 linhas para os modelos individuais (controle e adulterante), 3 linhas para os modelos de classe de adulterantes (sais e polissacarídeos) e 5 linhas pra o modelo global.

A terceira etapa desta análise é o pré-processamento das amostras. Como pré-processamento foi utilizada a primeira derivada conjuntamente com alisamento Savistky-Golay de janela de 7 pontos, a fim de corrigir os desvios dos espectros Raman. Em seguida, as componentes recuperadas foram selecionadas por amostragem aleatória (*random guess*). Outros parâmetros foram testados (*endpoint member*), mas apresentaram resultados similares. Posteriormente, foi aplicada a restrição de não-negatividade na concentração. Para o modelo global foi determinada a recuperação de 6 componentes considerando a carne, a água e os quatro adulterantes utilizados nesta análise. Este mesmo número de componentes a serem recuperadas foram utilizados nos demais modelos apresentados.

Por fim, a última etapa envolve a interpretação dos mapas de distribuição referentes às componentes recuperadas. Para a definição da componente recuperada mais significativa para a identificação da adulteração das peças de carne, foi escolhida a componente que apresentou maior variância explicada para o modelo construído com a

maior distinção entre as amostras adulteradas e amostras não adulteradas. A análise por MCR-ALS na interface gráfica *Hypertools* é demonstrada na Figura 39.

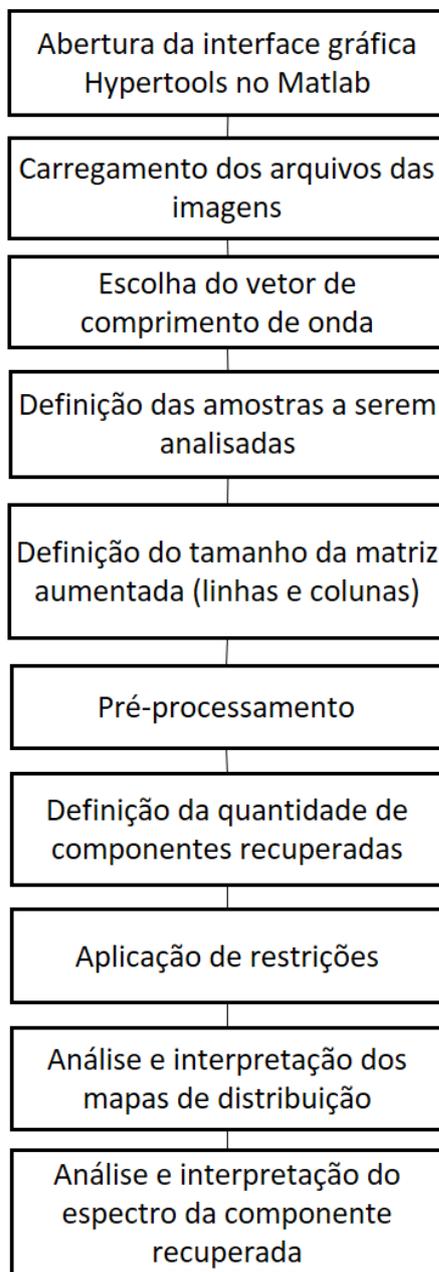


Figura 39 - Fluxograma das etapas de análise por MCR-ALS na interface gráfica Hypertools.

A escolha das regiões para construção dos modelos levou em consideração as regiões de modos vibracionais de proteínas para identificação de adulteração com sais (NaCl e TPFS). Conforme discutido na seção 3.4.1, a adição de sais em carne, como NaCl e TPFS, altera a conformação das proteínas provocando vibrações específicas de  $\alpha$ -hélices, folhas- $\alpha$  e folhas- $\beta$ , que podem ser detectadas por espectroscopia Raman<sup>111;115</sup>. A

adição de carragena e de maltodextrina são identificadas a partir de regiões do espectro que apresentam bandas características destes compostos.

#### 5.4.1 MODELOS INDIVIDUAIS PARA AMOSTRAS ADULTERADAS

As regiões espectrais utilizadas para a construção dos modelos individuais são apresentadas na Figura 40. Como pode ser observado, para a construção dos modelos de identificação de amostras adulteradas com solução salina de cloreto de sódio (NaCl) e tripolifosfato de sódio (TPFS) foram construídas matrizes aumentadas contendo os espectros das amostras na faixa de  $1200\text{ cm}^{-1}$  a  $1400\text{ cm}^{-1}$ . Para a identificação da adulteração com carragena, a matriz aumentada contém os espectros na faixa de  $800\text{ cm}^{-1}$  a  $1100\text{ cm}^{-1}$  e, por fim, para a determinação da adulteração com maltodextrina foi utilizada a faixa espectral de  $800\text{ cm}^{-1}$  a  $1000\text{ cm}^{-1}$ .

O conjunto de dados utilizados contém os espectros das amostras não adulteradas (primeira linha) e amostras adulteradas (segunda linha) a 2%, 5% e 10% de ganho de massa, respectivamente (Figura 41). Após o pré-processamento dos dados, a análise por MCR foi aplicada com a determinação de 6 componentes. Como observado na Figura 41, o mapa de concentração e o espectro otimizado da quinta componente, cuja variância explicada é igual a 9,7%, permitiu a diferenciação entre amostras adulteradas com cloreto de sódio (pixels com coloração avermelhada) e amostras não adulteradas (pixels com coloração azulada). As cores denotam a concentração relativa do adulterante em cada pixel da superfície mapeada, sendo que a cor azul indica a ausência do adulterante, ou seja, nenhuma característica espectral observada no pixel. E a cor vermelha indica a presença do adulterante. É possível observar que a região mais significativa para identificação desta fraude está ocorrendo entre  $1306\text{ cm}^{-1}$  (característica de modos de estiramento C=O, estiramento de C=C, modo tesoura de CH<sub>2</sub>, modo de torção de CH<sub>2</sub> e deformação no plano de CH de gorduras e lipídeos presentes na carne<sup>92</sup>) e  $1363\text{ cm}^{-1}$ , referente à resíduos de triptofano<sup>92</sup>.

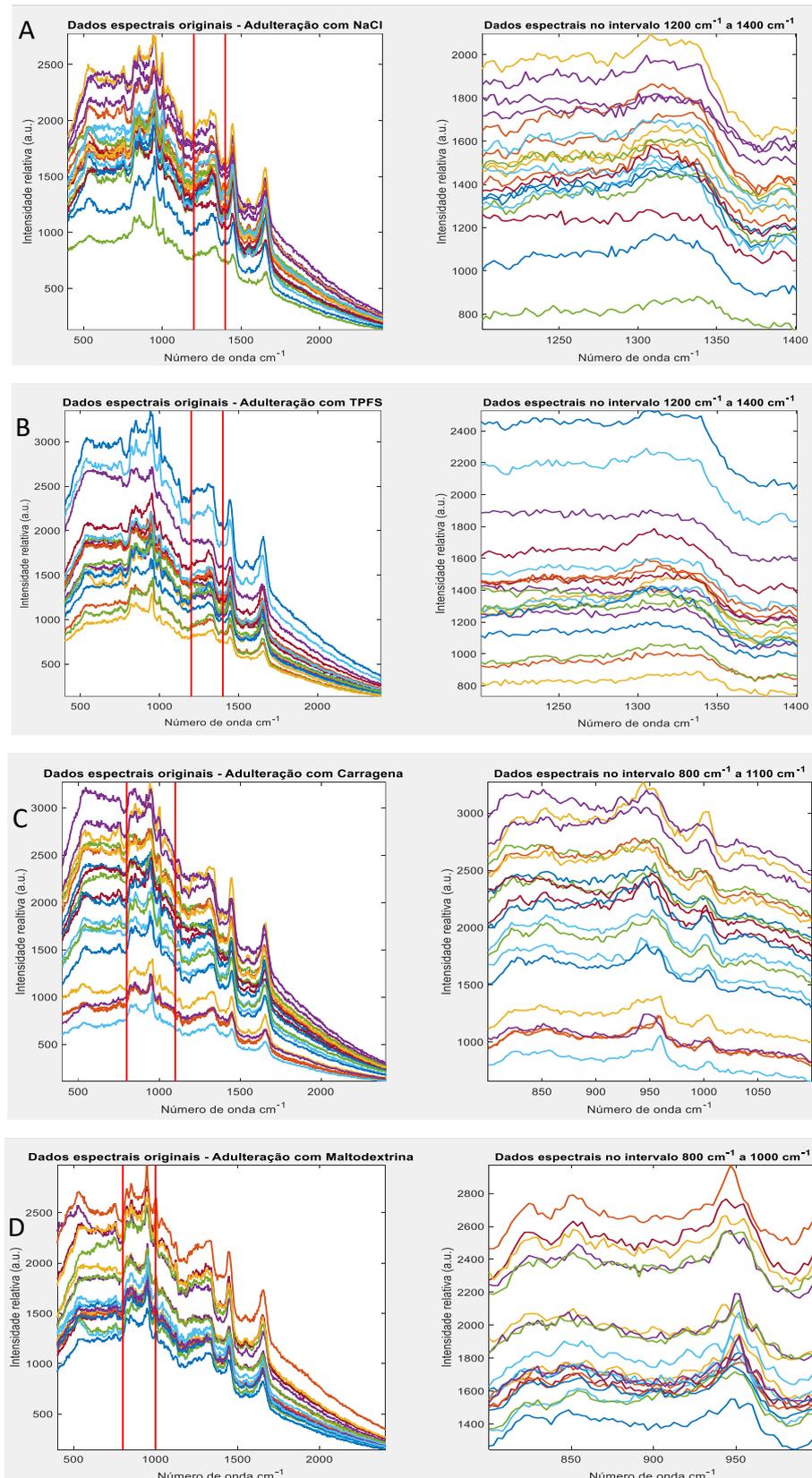


Figura 40 – À esquerda: espectro completo para a identificação de adulteração com (A) NaCl, (B) TPFS, (C) Carragena e (D) Maltodextrina. À direita: Região espectral selecionada para a construção do modelo quimiométrico – (A) 1200  $\text{cm}^{-1}$  a 1400  $\text{cm}^{-1}$ , (B) 1200  $\text{cm}^{-1}$  a 1400  $\text{cm}^{-1}$ , (C) 800  $\text{cm}^{-1}$  a 1100  $\text{cm}^{-1}$  e (D) 800  $\text{cm}^{-1}$  a 1000  $\text{cm}^{-1}$ .

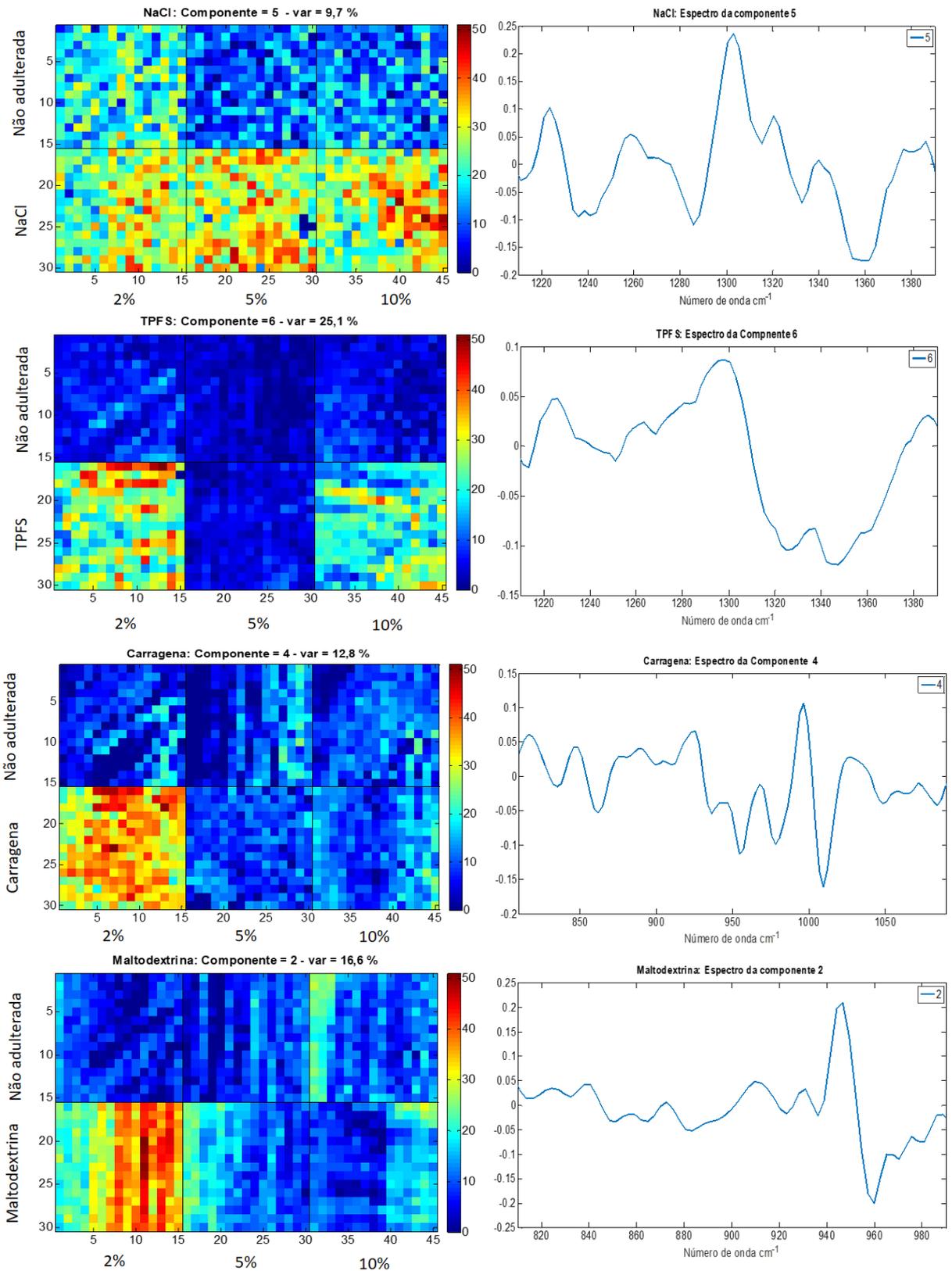


Figura 41 - À esquerda, distribuição espectral das amostras adulteradas com NaCl, TPFS, Carragena e Maltodextrina - 1ª linha: amostras não adulteradas; 2ª linha: amostras adulteradas a 2%, 5% e 10%, respectivamente. À direita: espectro estimado pelo MCR.

Para a diferenciação entre amostras adulteradas com tripolifosfato de sódio (pixels de coloração avermelhada) e amostras não adulteradas (coloração azulada) nos mapas de concentração, foi escolhida a sexta componente, responsável por 25,1% da variância do modelo. A maior concentração de pixels avermelhados é observada no mapa de distribuição referente à amostra adulterada à 2% em ganho de massa. A amostra adulterada a 10% apresentou pixels amarelados e um único ponto alaranjado, o que pode indicar uma menor concentração do adulterante nos pixels da região analisada. Entretanto, para a amostra adulterada à 5% não foram encontrados pixels com tonalidade avermelhada, indicando a ausência de adulterante na superfície analisada. Este resultado pode ser explicado por ter sido analisada uma região da amostra que não continha o adulterante ou que não apresentou mudanças nas conformações das proteínas. A região mais significativa para identificação deste tipo de adulteração ocorre em torno da banda em  $1350\text{ cm}^{-1}$ . As regiões identificadas como significativas para a determinação da adulteração com NaCl e TPFS são regiões características de amida III de proteínas<sup>92</sup>, cuja conformação é alterada devido à adição de sais<sup>102</sup>.

Para a diferenciação entre amostras adulteradas com carragena (pixels com coloração avermelhada) e amostras não adulteradas (pixels com coloração azulada) foi selecionada a quarta componente recuperada, responsável por 12,8% da variância do modelo. Os mapas de concentração das amostras adulteradas a 5% e 10% não apresentaram coloração característica de adulteração, ou seja, não apresentam o perfil espectral recuperado pela quarta componente, possivelmente por ter sido analisada uma região amostral que não continha o adulterante.

Observando o espectro otimizado pelo MCR na Figura 41, é possível observar que a região mais significativa para identificação da adição de carragena à carne ocorre entre  $950\text{ cm}^{-1}$ , região característica de estiramento C-C de amida I (mudança da estrutura secundária de proteínas<sup>92</sup>), e em  $1100\text{ cm}^{-1}$ .

Para a identificação da adulteração com solução de maltodextrina, foi escolhida a segunda componente recuperada pelo modelo MCR, cuja variância explicada é igual a 16,6%, que permitiu a diferenciação dos mapas de concentração entre a amostra adulterada com maltodextrina a 2% em ganho de massa (pixels de coloração avermelhada) e amostras não adulteradas (coloração azulada). As amostras adulteradas a 5% e 10% em ganho de massa não apresentaram pixels com coloração avermelhada para a superfície analisada. Possivelmente, a região analisada da amostra não continha a solução adulterante ou não apresentou mudanças nas conformações das proteínas. A

região espectral mais significativa para identificação deste tipo de fraude ocorre em torno de  $940\text{ cm}^{-1}$ , região característica de estiramento C-C de amida I, referente à mudança das estruturas secundárias de proteínas<sup>92</sup>.

## 5.4.2 MODELOS PARA DETERMINAÇÃO DE AMOSTRAS ADULTERADAS COM SOLUÇÕES SALINAS (NaCl e TPFS)

A região espectral utilizada para aplicação do MCR é apresentada na Figura 42. Como pode ser observado, para a construção do modelo de identificação de amostras adulteradas com solução salina de cloreto de sódio (NaCl) e tripolifosfato de sódio (TPFS) foi construída uma matriz aumentada contendo os espectros das amostras na faixa de 1200  $\text{cm}^{-1}$  a 1400  $\text{cm}^{-1}$ .

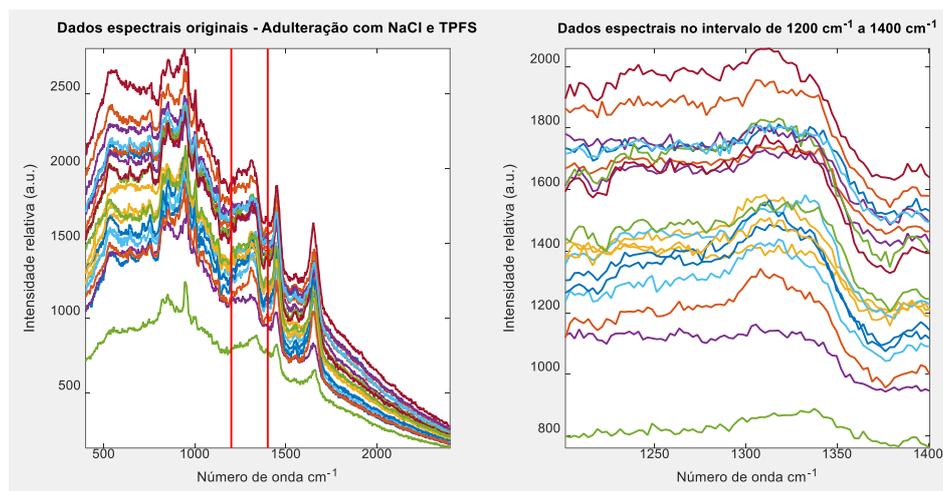


Figura 42 – À esquerda: espectro completo para a identificação de adulteração com NaCl e TPFS. À direita: Região espectral selecionada para a construção do modelo quimiométrico –1200  $\text{cm}^{-1}$  a 1400  $\text{cm}^{-1}$ .

A matriz foi aumentada na direção das colunas e das linhas. Em direção às colunas sendo constituída da matriz dos espectros das amostras não adulteradas e das matrizes das amostras adulteradas com NaCl e TPFS. Na direção das linhas, as matrizes foram organizadas primeiro com as amostras não adulteradas, seguida das amostras com a 2%, 5% e 10% de ganho de massa, respectivamente. Após o pré-processamento dos dados, a análise por MCR foi aplicada através do cálculo de 6 componentes. Como observado na Figura 43, o perfil espectral recuperado na primeira componente, cuja variância explicada é igual a 8,6%, permitiu a diferenciação entre os mapas de concentração das amostras adulteradas com NaCl e TPFS (pixels com coloração avermelhada) e amostras não adulteradas (pixels com coloração azulada). As amostras adulteradas com TPFS a 5% não apresentou coloração avermelhada para a região analisada. Possivelmente, a região analisada da amostra não continha a solução adulterante ou não apresentou mudanças nas conformações das proteínas. Entretanto, para a amostra adulterada a 10% em ganho de massa, foi verificada a existência de um único pixel com coloração alaranjada, indicando uma menor concentração do adulterante na região analisada. A estratégia da matriz

aumentada com a presença de dois adulterantes para aumentar a variabilidade na matriz  $\mathbf{X}$  e, conseqüentemente, melhorar a capacidade do MCR de resolver os componentes, não melhorou o desempenho do modelo em comparação ao modelo obtido com apenas um adulterante.

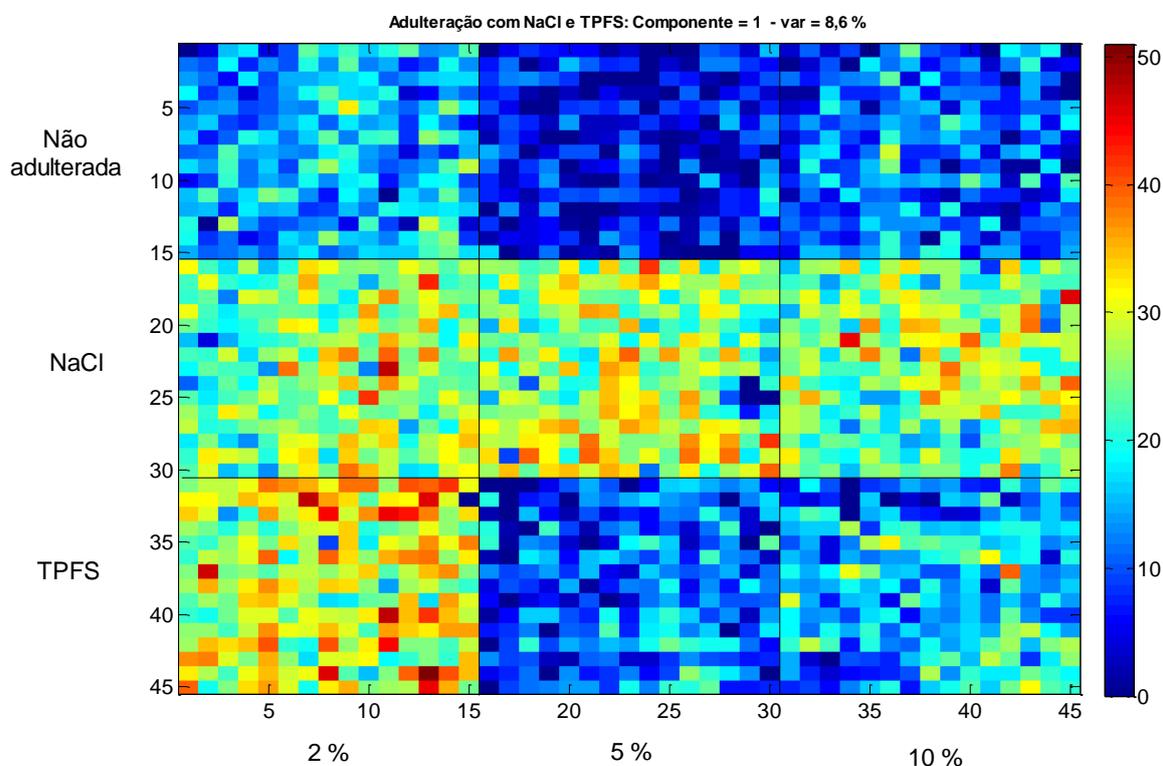


Figura 43 - Distribuição espectral. 1ª linha: amostras não adulteradas; 2ª linha: amostras adulteradas com NaCl; 3ª linha: amostras adulteradas com TPFS. Nível de adulteração: 2%, 5% e 10% de ganho de massa, respectivamente.

Conforme Figura 44, é possível observar no espectro recuperado pelo método MCR que a região mais significativa para identificação desta fraude está em  $1230\text{ cm}^{-1}$ , característica de folhas- $\beta$  de proteínas<sup>92</sup>,  $1255\text{ cm}^{-1}$  referente à dupla hélice de proteínas<sup>92</sup>,  $1306\text{ cm}^{-1}$  característica de modos de estiramento C=O, estiramento de C=C, modo tesoura de  $\text{CH}_2$ , modo de torção de  $\text{CH}_2$  e deformação no plano de CH de gorduras e lipídeos presentes na carne<sup>92</sup>, e entre  $1340\text{ cm}^{-1}$  e  $1360\text{ cm}^{-1}$ , regiões características de amida III de proteínas<sup>92</sup>, cuja conformações são alteradas devido à adição de sais<sup>102</sup>.

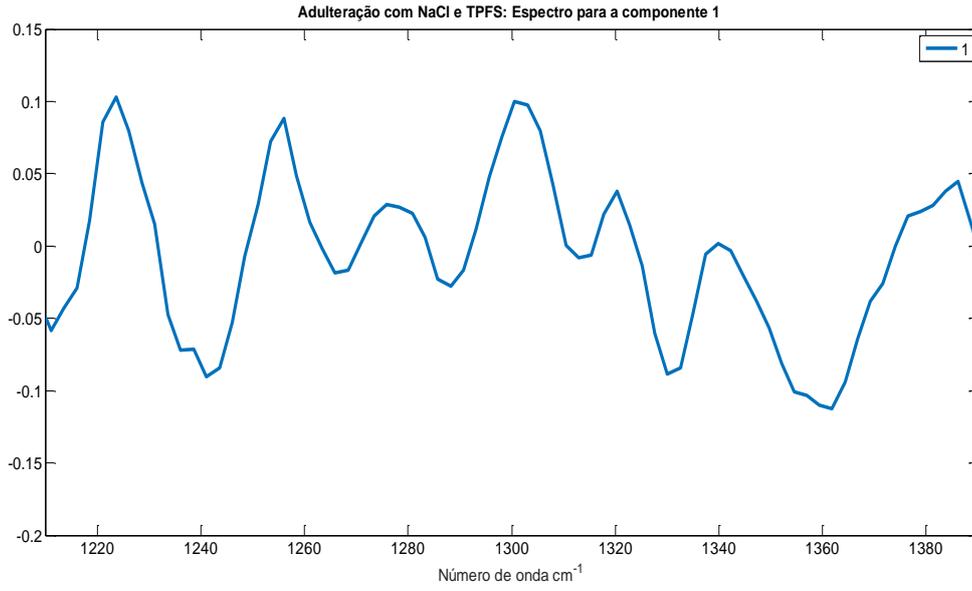


Figura 44 - Região espectral referente à componente 1.

### 5.4.3 MODELOS PARA DETERMINAÇÃO DE AMOSTRAS ADULTERADAS COM SOLUÇÕES DE POLISSACARÍDEOS (CARRAGENA E MALTODEXTRINA)

A região espectral utilizada para a construção do modelo MCR desta seção é apresentada na Figura 45. Como pode ser observado, para a construção do modelo de identificação de amostras adulteradas com carragena e maltodextrina foi organizada uma matriz aumentada contendo os espectros das amostras na faixa de  $800\text{ cm}^{-1}$  a  $1100\text{ cm}^{-1}$ .

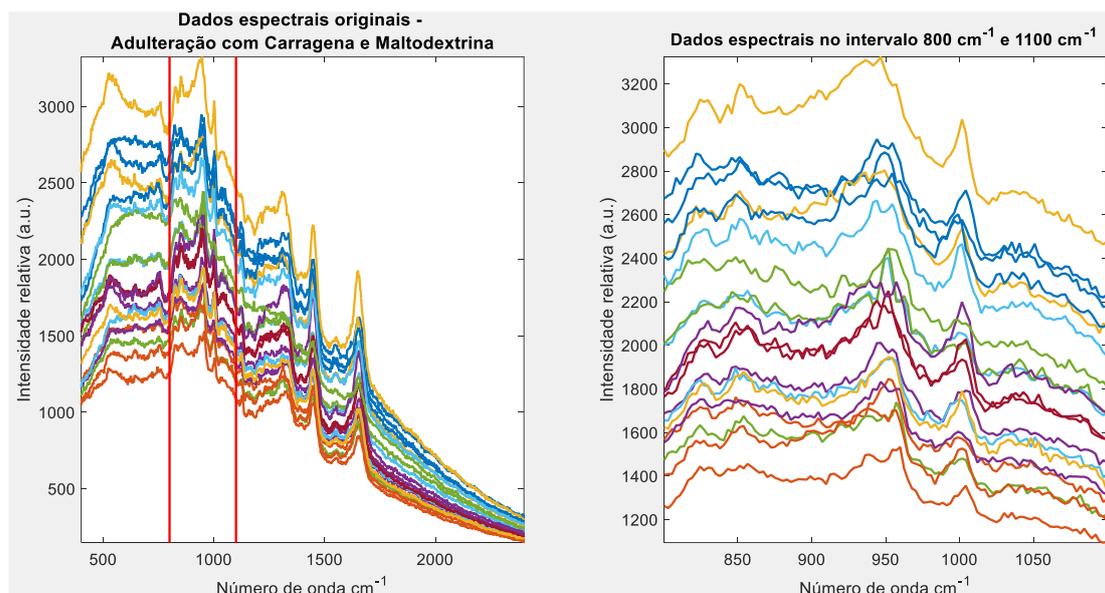


Figura 45 - À esquerda: espectro completo para a identificação de adulteração com Carragena e Maltodextrina. À direita: Região espectral selecionada para a construção do modelo quimiométrico –  $800\text{ cm}^{-1}$  a  $1100\text{ cm}^{-1}$ .

A matriz aumentada foi construída na direção das colunas e linhas. Na direção das colunas, iniciou-se com a matriz de amostras não adulteradas, seguida da matriz com as amostras adulteradas com carragena e, por último, a matriz com os espectros das amostras com adição de maltodextrina. O aumento na direção das linhas foi feito pelas matrizes das amostras não adulteradas, seguidas das matrizes das amostras adulteradas com 2%, 5% e 10% de ganho de massa nas respectivas colunas. Após o pré-processamento dos dados, o MCR foi aplicado com o cálculo de 6 componentes.

Como observado na Figura 46, o perfil espectral otimizado na primeira componente, cuja variância explicada é igual a 9,2%, permitiu a diferenciação entre os mapas de concentração das amostras com a presença de carragena e maltodextrina (pixels com coloração avermelhada) e amostras não adulteradas (pixels com coloração azulada). As amostras adulteradas a 5% e 10% em ganho de massa não apresentaram pixels com

coloração avermelhada na superfície analisada. Possivelmente, a área analisada da amostra não continha a solução adulterante ou não apresentou mudanças nas conformações das proteínas. Entretanto, pixels de coloração alaranjada foram observados nas imagens correspondentes às amostras adulteradas a 10% com carragena e a 5% com maltodextrina. Isto indica uma menor concentração do adulterante na região analisada.

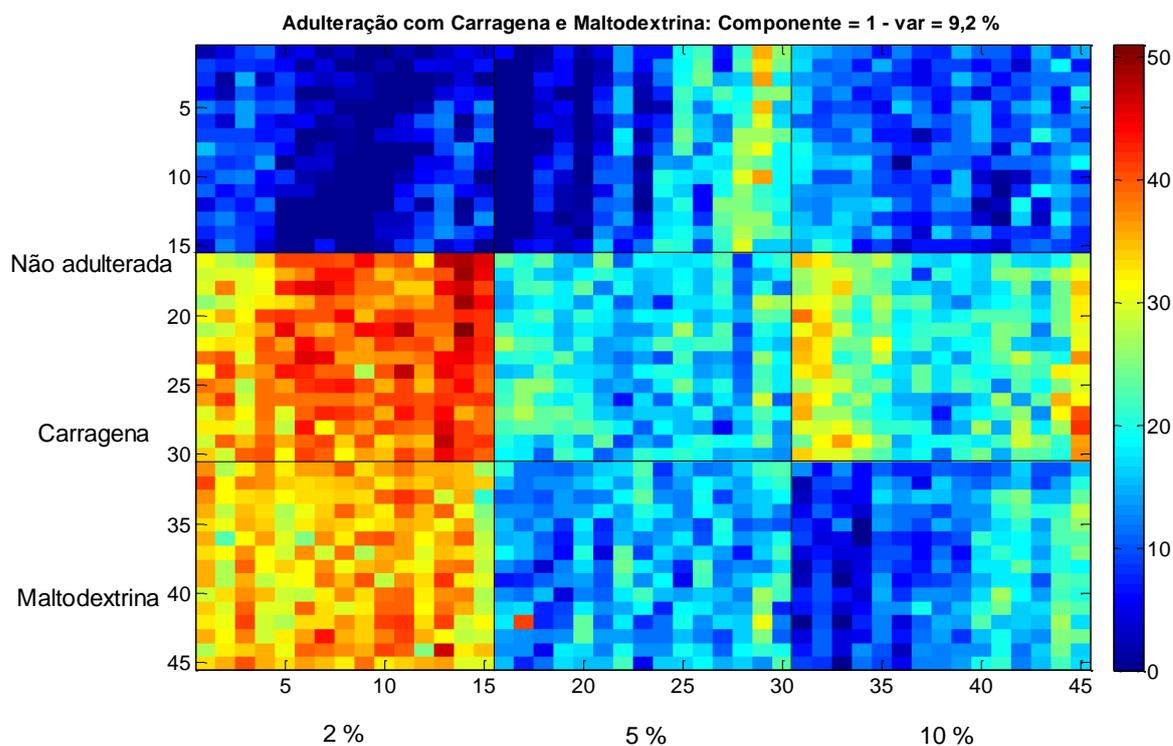


Figura 46 - Distribuição espectral. 1º linha: amostras não adulteradas; 2ª linha: amostras adulteradas com Carragena; 3ª linha: amostras adulteradas com Maltodextrina. Nível de adulteração: 2%, 5% e 10% de ganho de massa, respectivamente.

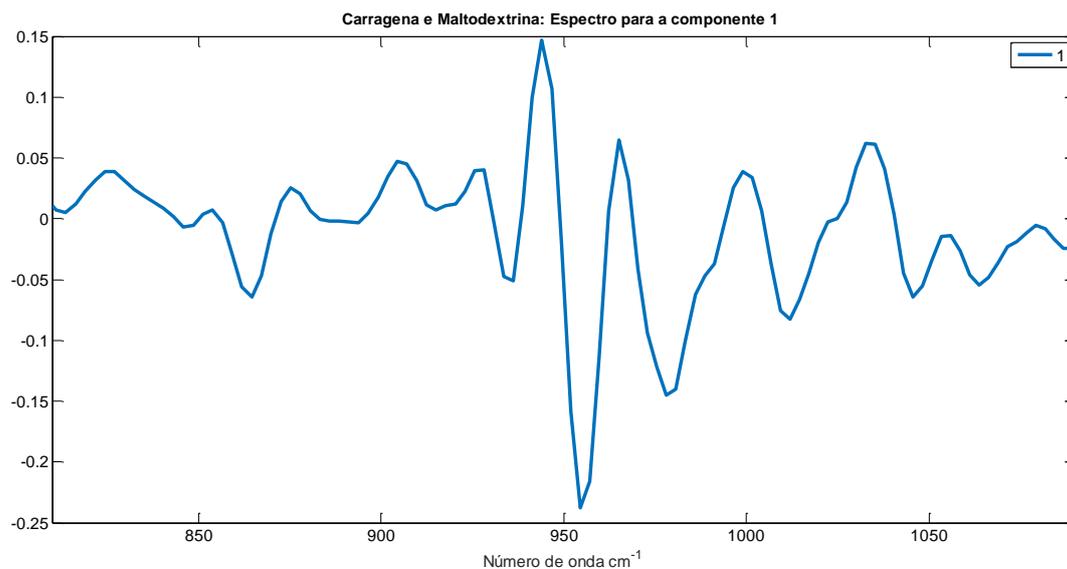


Figura 47 - Região espectral referente à componente 1.

Conforme a Figura 47, é possível observar que a região mais significativa para identificação deste tipo de fraude está entre  $940\text{ cm}^{-1}$  e  $950\text{ cm}^{-1}$ , região característica de estiramento C-C de amida I referente à mudança das estruturas secundárias de proteínas<sup>92</sup>.

#### 5.4.4 MODELOS PARA DETERMINAÇÃO DE AMOSTRAS ADULTERADAS COM INGREDIENTES NÃO CÁRNEOS (MODELO GLOBAL)

A região espectral utilizada para a construção do modelo MCR com a presença dos quatro adulterantes é apresentada na Figura 48. Como pode ser observado, para a construção do modelo global de identificação de amostras adulteradas, foi organizada uma matriz aumentada contendo os espectros das amostras na faixa de  $950\text{ cm}^{-1}$  a  $1050\text{ cm}^{-1}$ .

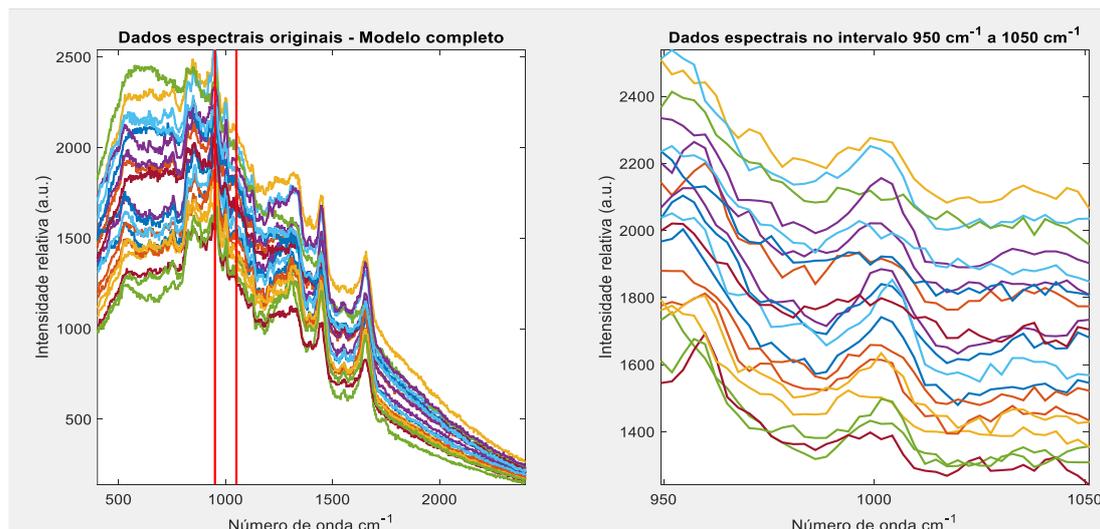


Figura 48 - À esquerda: espectro completo para a identificação de adulteração com NaCl, TPFS, Carragena e Maltodextrina – Modelo Global. À direita: Região espectral selecionada para a construção do modelo quimiométrico –  $950\text{ cm}^{-1}$  a  $1050\text{ cm}^{-1}$ .

Como nas seções anteriores, a matriz foi aumentada na direção das linhas e das colunas. A ordem das matrizes adicionadas foi amostras não adulteradas, amostras com adição de NaCl, TPFS, carragena e maltodextrina. Para as amostras adulteradas, as linhas foram aumentadas com as matrizes com 2, 5 e 10% de ganho de massa. Após o pré-processamento dos dados, o método MCR foi aplicado com o cálculo de 6 componentes.

Como observado na Figura 49, o espectro recuperado na quinta componente, cuja variância explicada é igual a 13,0%, permitiu identificar pixels nas amostras adulteradas (pixels de coloração avermelhada) diferentes das amostras não adulteradas (pixels de coloração azul). Como observado nos modelos anteriores, algumas amostras adulteradas não apresentaram pixels com coloração avermelhada para a região analisada. Possivelmente, a região analisada da amostra não continha os adulterantes ou não apresentou mudanças nas conformações das proteínas. Pixels alaranjados foram identificados em algumas amostras, indicando a menor concentração do adulterante na

região analisada. Entretanto, nenhuma amostra não adulterada apresentou pixels com coloração avermelhada.

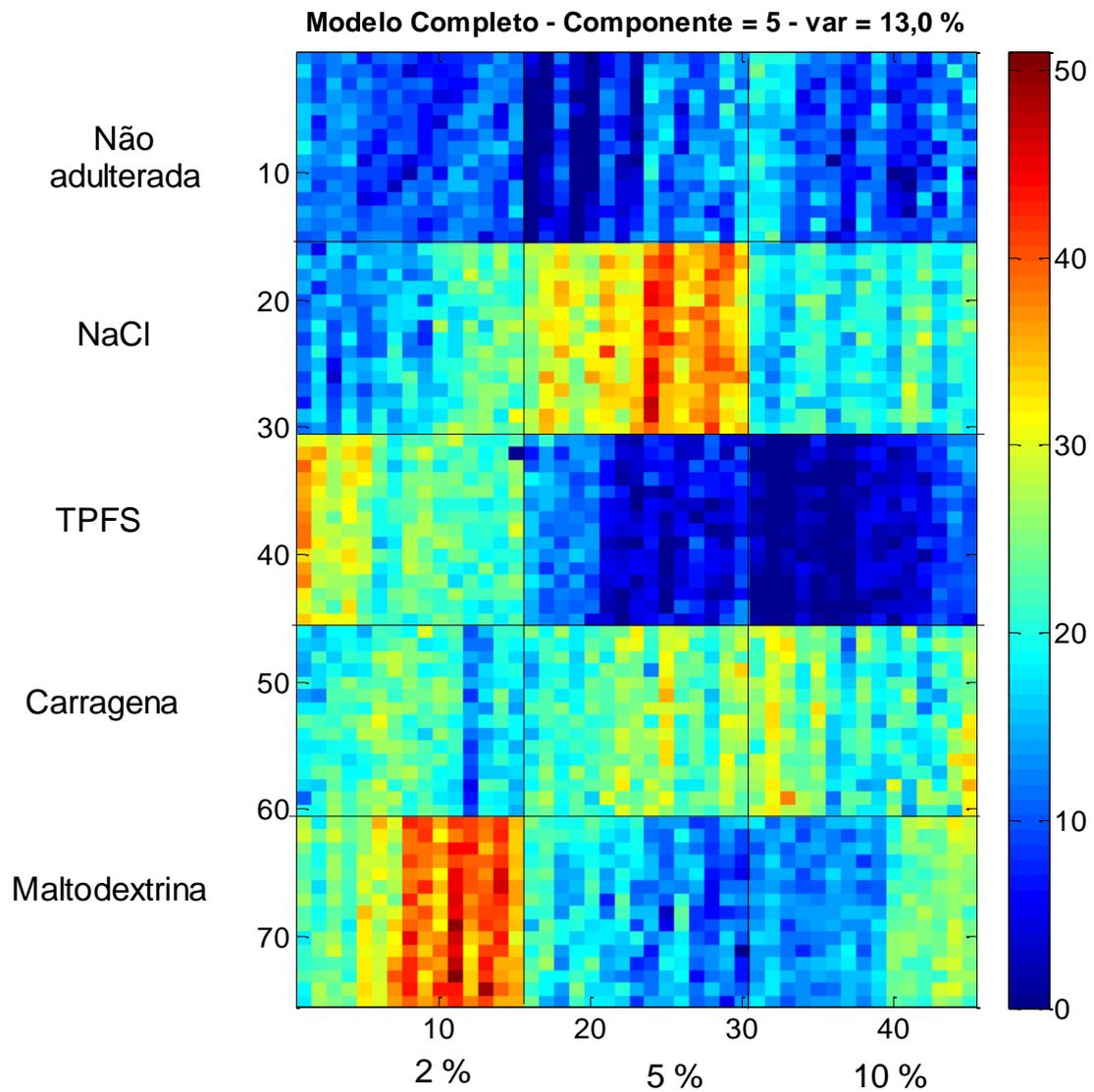


Figura 49 - Distribuição espectral. 1º linha: amostras não adulteradas; amostras adulteradas - 2ª linha: NaCl; 3ª linha: TPFS; 4ª linha: Carragena; 5ª linha: Maltodextrina. Nível de adulteração: 2%, 5% e 10% de ganho de massa, respectivamente.

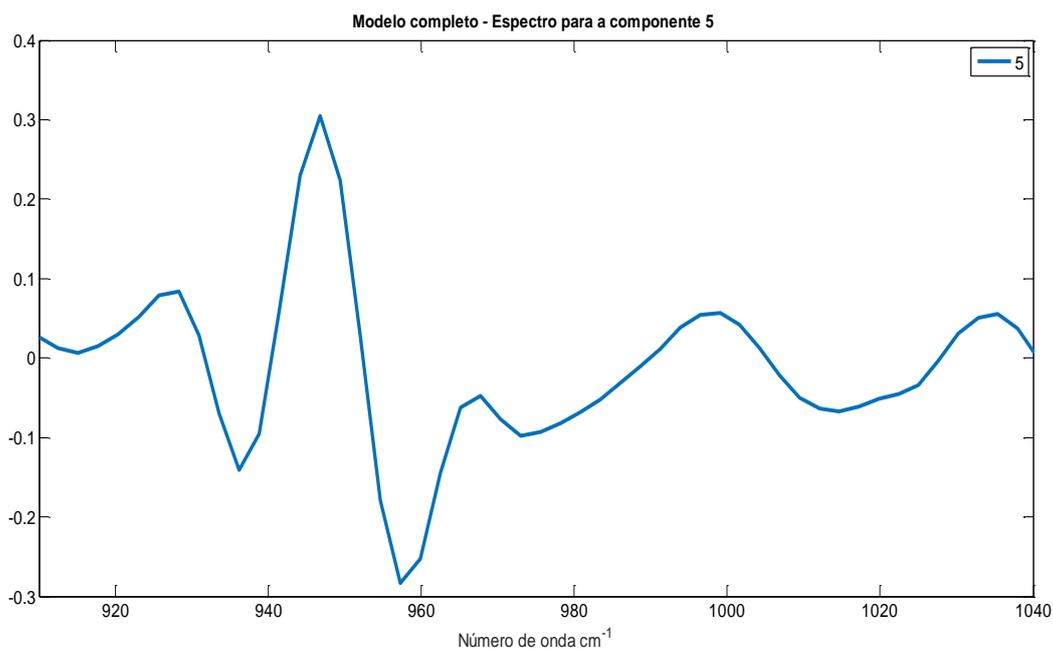


Figura 50 - Região espectral referente à componente 5.

Conforme a Figura 50, é possível observar no espectro recuperado pelo MCR, que a região mais significativa para identificação deste tipo de fraude ocorre entre  $940\text{ cm}^{-1}$  e  $960\text{ cm}^{-1}$ , região característica de estiramento C-C de amida I referente à mudança das estruturas secundárias de proteínas<sup>92</sup>.

## 5.5 COMPARAÇÃO ENTRE OS MODELOS

Comparando-se os resultados obtidos para a análise por espectroscopia Raman de imagem (Tabela 10), é possível perceber que todos os modelos gerados apresentaram valores abaixo de 25,0% de variância explicada para as componentes individuais recuperadas pelo método de resolução multivariada de curvas – MCR. São valores baixos, entretanto, os mapas de concentração desses componentes apresentaram a melhor distinção entre as classes adulteradas e não adulteradas.

Entre os modelos de previsão individual, o modelo para identificação da adulteração com tripolifosfato de sódio foi o que apresentou maior variância explicada (25,1%), utilizando a sexta componente recuperada. Já o modelo para identificação de NaCl, foi o que apresentou menor percentual de variância (9,7%), utilizando a quinta componente recuperada. Este valor era esperado, pois o NaCl não apresenta modo vibracional na região espectral analisada.

Para os modelos de classe de substância adulterante, os valores de variância explicada obtidos para os modelos de sais e polissacarídeos foram próximos (8,6% e 9,2%, respectivamente), sendo utilizada a primeira componente recuperada. Entretanto, não foram identificados pixels correspondentes à adulteração em todas as amostras, adulteradas, possivelmente por ter sido utilizada uma região da amostra que não continha o adulterante ou que não apresentou mudança conformacional da proteína.

Este mesmo aspecto foi observado para o modelo global em que foi construída uma matriz aumentada com as amostras não adulteradas e com as amostras adulteradas trabalhadas acima. A variância explicada para o modelo gerado foi de aproximadamente 13,0% utilizando a quinta componente recuperada. Pode-se perceber que nem todas as amostras adulteradas apresentaram pixels com a coloração referente à detecção de adulteração (tons avermelhados). Entretanto, as amostras não adulteradas não apresentaram pixels característicos deste tipo de fraude.

Tabela 10- Comparação dos modelos globais obtidas pela análise por espectroscopia Raman de imagem.

<b>MODELOS</b>	<b>Região Espectral analisada (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Componente recuperada</b>	<b>Variância (%)</b>	<b>Regiões significativas (cm<sup>-1</sup>)</b>
<b>NaCl</b>	1200-1400	5	9,7	1306, 1350
<b>TPFS</b>	1200-1400	6	25,1	1350
<b>Carragena</b>	800-1100	4	12,8	950, 1100
<b>Maltodextrina</b>	800-1000	2	16,6	940
<b>Sais</b>	1200-1400	1	8,6	1230, 1255, 1306, 1340-1360
<b>Polissacarídeos</b>	800-1100	1	9,2	940
<b>Global</b>	950-1050	5	13,0	940

## 5.6 CONCLUSÕES PARCIAIS

Em conclusão a esta seção, é possível observar que o emprego de espectroscopia Raman de imagem foi capaz de detectar fraudes em algumas amostras de carnes bovinas *in natura* adulteradas com ingredientes não cárneos. Além disso, foi possível atribuir à região característica de estiramento C-C de amida I (940 cm<sup>-1</sup>), referente à mudança das estruturas secundárias de proteínas<sup>92</sup>, e à região característica de amida III de proteínas (1250 cm<sup>-1</sup> a 1350 cm<sup>-1</sup>), como regiões significativas para a identificação deste tipo de fraude. Entretanto, não foi possível a detecção da fraude em todas as amostras por possíveis falhas na amostragem com a seleção de uma região que possivelmente não contém o adulterante.

## **CAPÍTULO 6: CONCLUSÃO**

## 6.1 CONCLUSÕES

Modelos discriminantes utilizando dados de espectroscopia de absorção no infravermelho médio e espectroscopia Raman foram construídos para identificar a presença de produtos não cárneos em amostras de carne bovina *in natura*. O melhor resultado foi obtido para os modelos PLS-DA construídos a partir de dados de ATR-FTIR foi o modelo global de previsão de amostras adulteradas *versus* amostras não adulteradas, enquanto o modelo para identificação de adulteração com TPFS apresentou o melhor desempenho entre os modelos individuais.

Uma etapa de otimização do modelo global foi realizada a partir da detecção de *outliers* baseada nos parâmetros convencionais, resíduos Q e T<sup>2</sup> de Hotelling, e no cálculo do intervalo de confiança para os valores previstos de y/classe. Esta abordagem foi aplicada em um conjunto teste composto por 20 amostras de carne com a injeção de um novo adulterante, maltodextrina, e classificou corretamente todas essas amostras como *outliers*.

Nos modelos discriminantes entre amostras não adulteradas e adulteradas empregando espectroscopia Raman, a incerteza na classificação de cada amostra foi estimada empregando reamostragem *bootstrap*, dando uma maior confiabilidade aos resultados. De um modo geral, a análise da purga apresentou-se satisfatória para a identificação de fraude por injeção de produtos não cárneos à carne bovina *in natura*. Entretanto, a análise direta da carne por espectroscopia Raman não foi considerada uma boa metodologia para a detecção sistemática do tipo de fraude em amostras de carne bovina *in natura*. Além disso, os modelos para cloreto de sódio, tripolifosfato de sódio e carragena não se mostraram apropriados para caracterização deste tipo de fraude, sendo o modelo construído para as amostras de TPFS o que apresentou menor desempenho para esta região, possivelmente pela baixa retenção deste adulterante pela matriz.

Comparando-se os modelos obtidos por ATR-FTIR e FT-Raman para a análise das purgas, valores próximos de confiabilidade foram observados para os modelos globais de detecção de fraude. Entretanto, a análise por ATR-FTIR apresentou a vantagem de ser cerca de 5 vezes mais rápida que a análise por FT-Raman.

Métodos empregando a espectroscopia Raman de imagem mostraram-se promissores para a detecção de fraudes em carnes bovinas *in natura*. Entre os modelos de previsão individual, o modelo para identificação da adulteração com tripolifosfato de sódio foi o que apresentou a componente recuperada com maior variância explicada utilizando a sexta componente recuperada.

Para os modelos de classe de substância adulterante, os valores de variância explicada obtidos para as componentes recuperadas dos modelos de sais e polissacarídeos foram próximos, sendo utilizada a primeira componente recuperada. Entretanto, não foram identificados pixels correspondentes à adulteração em todas amostras adulteradas, assim como no modelo utilizando uma matriz aumentada com amostras não adulteradas e amostras adulteradas com NaCl, TPFS, Carragena e Maltodextrina. A amostra de carne é uma matriz complexa e a distribuição da solução de adulterante pelas fibras musculares pode ocorrer de forma não homogênea, assim, o adulterante em estudo pode estar ausente na região amostral analisada. Desta forma, conclui-se que uma estratégia experimental mais adequada para detecção de fraudes por injeção de soluções aquosas de sais e polissacarídeos é a análise da purga, pois a análise do líquido exsudado da carne tende a fornecer melhores resultados em comparação à análise direta na peça de carne.

## **CAPÍTULO 7: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 7.1 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 EVANGELISTA, J. (1994) **Tecnologia de alimentos**. 2a ed. Editora Atheneu, 1994.
- 2 ABERLE, E. D., FORREST, J. C., GERRARD, D. E., MILLS, E.W. (2001) **Principles of meat science**. 4<sup>th</sup> ed. Kendall/Hunt Publishing Company.
- 3 IARC, INTERNATIONAL AGENCE FOR RESEARCH IN CANCER. (2015) **IARC Monographs evaluate consumption of red meat and processed meat**. WHO. Lyon, France.
- 4 OECD/FAO - Organization for Economic Cooperation and Development /Food and Agriculture Organization (2019) **OECD-FAO Agricultural Outlook 2019-2028**. OECD Publishing, Paris/Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- 5 ABIEC - Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes (2019). **Beef Report - Perfil da Pecuária no Brasil**. ABIEC.
- 6 OECD - ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. (2018) **AGRICULTURAL OUTLOOK 2018-2027**.
- 7 IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. (2019) **Indicadores IBGE: Estatística da Produção Pecuária jan.-mar. 2019**
- 8 MCGRATH, T. F., PATTERSON, J., FAUHL-HASSEK, C., DONARSKI, J., ALWIJN, M., VAN RUTH, S., & ELLIOT, C. T. (2018) **What are the scientific challenges in moving from targeted to non-targeted methods for food fraud testing and how can they be addressed? - Spectroscopy case study**. Trends in Food Science & Technology, 76, 38-55.
- 9 DAILYMAIL. (2013) **Secrets of the supermarket frozen chickens pumped full of water and additives in cement-mixer style machin**. Disponível em: <<http://www.dailymail.co.uk/news/article-2519822/Secrets-supermarket-frozen-chickens-pumped-water-additives-cement-mixer-style-machines.html#ixzz4r4AgcfWR>>. Acesso em Maio 2019
- 10 THE TIMES. (2007) **Chicken fillets ‘secretly pumped up with water’ to increase weight**. Disponível em: <<https://www.thetimes.co.uk/article/chicken-fillets-secretly-pumped-up-with-water-to-increase-weight-2h5hp5gts3h>>. Acesso em Maio 2019.
- 11 VEJA. (2013) **Escândalo de venda de carne de cavalo cresce na Europa**. Disponível em: < <https://veja.abril.com.br/economia/escandalo-de-venda-de-carne-de-cavalo-cresce-na-europa/>>. Acesso em Março 2019.
- 12 BOYACI, I. H., TEMIZ, H. T., UYSAL, R. S., VELIOGLU, H. M., YADEGARI, R. J., & RISHKAN, M. M. **A novel method for discrimination of beef and horsemeat using Raman spectroscopy**. Food Chemistry, 148, 37-41.
- 13 ROPODI, A. I.; PANAGOOU, E. Z.; & NYCHAS, G. J. E. (2017) **Multispectral imaging (MSI): A promising method for the detection of minced beef adulteration with horsemeat**. Food Control, 73, 57-63.
- 14 ZAJAC, A.; HANUZA, J.; & DYMINSKA, L. (2014) **Raman spectroscopy in determination of horse meat content in the mixture with other meats**. Food Chemistry, 156, 333-338.
- 15 MAMANI-LINARES, L. GALLO, C., & ALOMAR, D. (2012). **Identification of cattle, llama and horse meat by near infrared reflectance or transfectance spectroscopy**. Meat Science, 90, 378-385.
- 16 PF, POLÍCIA FEDERAL. (2012) **PF deflagra Operação Vaca Atolada em BH, Contagem e Ibitaré**. Disponível em: <

- <http://www.pf.gov.br/agencia/noticias/2012/junho/a-pf-deflagrou-hoje-15-06-a-operacao-vaca-atolada-em-bh-contagem-e-ibirite>>. Acesso em Abril 2019.
- 17 NUNES, K. M., ANDRADE, M. V. O., SANTOS FILHO, A. M. P., LASMAR, M. C., & SENA, M.M. (2016) **Detection and characterisation of frauds in bovine meat in natura by non-meat ingredient additions using data fusion of chemical parameters and ATR-FTIR spectroscopy**. Food Chemistry, 205, 14-22.
- 18 PORTAL G1. (2017) **Pescados adulterados em SC recebiam sódio e água para ter peso aumentado, diz PF**. Disponível em: < <https://g1.globo.com/sc/santa-catarina/noticia/pescados-adulterados-em-sc-recebiam-sodio-e-agua-para-ter-peso-aumentado-diz-pf.ghtml>>. Acesso em Março 2019.
- 19 FOLHA DE SÃO PAULO. (2017) **Polícia Federal indicia 63 pessoas na Operação Carne Fraca**. Disponível em: < <https://www1.folha.uol.com.br/mercado/2017/04/1876020-policia-federal-indicia-63-pessoas-na-operacao-carne-fraca.shtml>>. Acesso em Março 2019.
- 20 NUNES, K. M. (2015) **Utilização de espectroscopia no infravermelho médio, fusão de dados e métodos quimiométricos de classificação na análise de fraudes em carnes bovinas in natura**. (Dissertação de Mestrado). Departamento de Química, UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte - MG.
- 21 CHENG, Q. & SUN, C. W. (2008) **Factors affecting the water holding capacity of red meat products: A review of recent research advances**. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 48, 137–159.
- 22 FDA, US FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. (2009) **Addressing Challenges of Economically-Motivated Adulteration**.
- 23 PERISIC, N., AFSETH, N. K., OFSTAD, R., & KOHLER, A. (2011) **Monitoring Protein Structural Changes and Hydration in Bovine Meat Tissue Due to Salt Substitutes by Fourier Transform Infrared (FTIR) Microspectroscopy**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59, 10052–10061.
- 24 AYADI, M. A., KECHAOU, A., MAKNI, I., & ATTIA, H. (2009) **Influence of carrageenan addition on turkey meat sausages properties**. Journal of Food Engineering, 93, 278-283.
- 25 TOLENTINO, V. (2013) **Oficina mostra importância do consumo de carne bovina**. EMATER. Disponível em: < <http://ruralcentro.uol.com.br/noticias/oficina-mostra-importancia-do-consumo-de-carne-bovina-67567>>. Acesso em maio de 2019.
- 26 UNICAMP. (2011) **TACO - Tabela brasileira de composição de alimentos**. NEPA, Núcleo de estudos e pesquisa em alimentação.
- 27 BALLIN, N. Z. (2010) **Authentication of meat and meat products**. Meat Science, 86, 577-587.
- 28 MOORE, J. C.; SPINK, J.; & LIPP, M. (2012) **Development and application of a database on food ingredient fraud and economically motivated adulteration from 1980–2010**. Journal of Food Science, 77, 118-126.
- 29 HOSSAIN, M. A. M., ALI, M. E., HAMID, S. B. A., ASING, MUSTAFA, S., DESA, M. N. M., & ZAIDUL, I. S. M. (2017) **Targeting double genes in multiplex PCR for discriminating bovine, buffalo and porcine materials in food chain**. Food Control, 73, 175-184.

- 30 IWObI, A., SEBAH, D., KRAEMER, I., LOSHER, C., FISCHER, G., BUSCH,  
U., & HUBER, J. (2015) **A multiplex real-time PCR method for the  
quantification of beef and pork fractions in minced meat.** Food Chemistry,  
169, 305-313
- 31 ALAMPRESE, C., AMIGO, J. M., CASIRAGHI, E., & ENGELSEN, S. B.  
(2016) **Identification and quantification of turkey meat adulteration in fresh,  
frozen-thawed and cooked minced beef by FT-NIR spectroscopy and  
chemometrics.** Meat Science, 121, 175-181.
- 32 LOPEZ-MAESTRESALAS, A., INSAUSTI, K., JAREN, C., PEREZ-RONCAL,  
C., URRUTIA, O., BERIAIN, M. J., & ARAZURI, S. (2019). **Detection of  
minced lamb and beef fraud using NIR spectroscopy.** Food Control, 98, 465-  
473.
- 33 WU, T., ZHONG, N., & YANG, L. (2018) **Identification of adulterated and  
non-adulterated Norwegian salmon using FTIR and an improved PLS-DA  
method:** Food Analytical Methods, 11, 1501-1509.
- 34 KAMRUZZAMAN, M., SUN, D. W., ELMASRY, G., & ALLEN, P. (2013) **Fast  
detection and visualization of minced lamb meat adulteration using NIR  
hyperspectral imaging and multivariate image analysis.** Talanta, 103, 130-  
136.
- 35 POUR S. O., FOWLER, S. M., HOPKINS, D. L., TORLEY, P. J., GILL, H., &  
BLANCH, E. W. (2019). **Investigation of chemical composition of meat using  
spatially off-set Raman spectroscopy.** Analyst, 144, 2618-2627.
- 36 ALAMPRESE, C., CASALE, M., SINELLI, N., LANTERI, S., & CASIRAGHI,  
E. (2013). **Detection of minced beef adulteration with turkey meat by UV-vis,  
NIR and MIR spectroscopy.** LWT – Food Science and Technology, 53, 225–  
232.
- 37 MEZA-MARQUEZ, O. G.; GALLARDO-VELAZQUEZ, T.; & OSORIO-  
REVILLA, G. (2010) **Application of mid-infrared spectroscopy with  
multivariate analysis and soft independent modeling of class analogies  
(SIMCA) for the detection of adulterants in minced beef.** Meat Science, 86,  
511-519.
- 38 KARMAS, E. (1975) **Fresh meat technology.** London, England.: Noyes Data  
Corporation.
- 39 OLIVEIRA, A. L. (2000) **Maciez da carne bovina.** Cadernos técnicos de  
veterinária e zootecnia. Belo Horizonte: UFMG, 33, 7-18
- 40 DABÉS, A. C. (2000) **Maturação da carne bovina: princípios fundamentais.**  
Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia. Belo Horizonte: UFMG, v.33, 19-  
23.
- 41 BRASIL. (2017) **DECRETO Nº 9.013, DE 29 DE MARÇO DE 2017.**  
Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal  
(RIISPOA). MAPA, MINISTÉRIO DE AGRICULTURA, PECUÁRIA E  
ABASTECIMENTO.
- 42 COMMISSION RECOMMENDATION (EC) (2005) **Concerning a coordinated  
programme for the official control of foodstuffs. L59.** Official Journal of the  
European Union, 27-39.
- 43 MS - MINISTÉRIO DA SAÚDE. (1998) **Portaria nº 1004, de 11 de dezembro  
de 1998.** SVS, SECRETARIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. 1998.

- 44 BRASIL. (1940) **DECRETO-LEI N° 2.848, DE 7 DE DEZEMBRO DE 1940**. Código Penal. 1940.
- 45 MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. (1999) **INSTRUÇÃO NORMATIVA N° 20, DE 21 DE JULHO DE 1999**. SDA, SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA.
- 46 HOFFMANN, B., MUNCH, S., SCHWAGELE, F., NEUSUB, C., & JIRA, W. (2017) **A sensitive HPLC-MS/MS screening method for the simultaneous detection of lupine, pea, and soy proteins in meat products**. Food Control, 71, 200-209.
- 47 SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B.; & SNYDER, S. A. (2013) **Organic Chemistry**. Editora Wiley.
- 48 SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; & NIEMAN, T. A. (2002) **Princípios de análise instrumental**. 5ª. Porto Alegre: Bookman.
- 49 COZZOLINO, D. (2015) **The role of vibrational spectroscopy as a tool to assess economically motivated fraud and counterfeit issues in agricultural products and foods**. Analytical Methods, 7, 9390–9400.
- 50 BARBOSA, L. C. A. (2007) **Espectroscopia no Infravermelho na caracterização de compostos orgânicos**. Viçosa: Editora UFV.
- 51 MCCREERY, R. L. (2000) **Raman Spectroscopy for Chemical Analysis**. Wiley-interscience.
- 52 FARIA, D. L. A.; SANTOS, L. G. C.; & GONÇALVES, N. S. (1997) **uma demonstração sobre o espalhamento inelástico de luz: repetindo o experimento de raman**. Química Nova, 20.
- 53 OPILIK, L.; SCHMID, T.; & ZENOBI, R. (2013) **Modern Raman Imaging: Vibrational Spectroscopy on the Micrometer and Nanometer Scales**. Annual Review of Analytical Chemistry, 6, 379-398.
- 54 CHENG, J. H.; NICOLAI, B.; & SUN, D. W. (2017) **Hyperspectral imaging with multivariate analysis for technological parameters prediction and classification of muscle foods: A review**. Meat Science, 123, 182-191.
- 55 LORENTE, D., ALEIXOS, N., GOMEZ-SANCHIS, J., CUBEROS, S., & BLASCO, J. (2013) **Selection of Optimal Wavelength Features for Decay Detection in Citrus Fruit Using the ROC Curve and Neural Networks**. Food and Bioprocess Technology, 6, 530-541.
- 56 ELMASRY, G., KAMRUZZAMAN, M., SUN, D. W., & ALLEN, P. (2012) **Principles and Applications of Hyperspectral Imaging in Quality Evaluation of Agro-Food Products: A Review**. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 52, 999-1023.
- 57 STEWART, S., PRIORE, R., J., NELSON, M. P., & TREADO, P. J. (2012) **Raman Imaging**. Annual Review of Analytical Chemistry, 5, 337-360.
- 58 FERREIRA, M. M. C. (2015) **Quimiometria - Conceitos, métodos e aplicações**. Campinas, SP: Editora da Unicamp.
- 59 BRUNS, R. E. & FAIGLE, J. F. G. (1985) **Quimiometria**. Química Nova, 8, 84-99.
- 60 NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; & BRUNS, R. E. (2006) **25 anos de Quimiometria no Brasil**. Química Nova, 29, 1401-1406.
- 61 ESSLINGER, S.; RIEDL, J.; & FAUHL-HASSEK, C. (2014) **Potential and limitations of non-targeted fingerprinting for authentication of food in official control**. Food Research International, 60, 189-204.

- 62 U.S. PHARMACOPEIAL CONVENTION. (2017) **The United States pharmacopeia. National formulary.** Collodion, 1, 1076.
- 63 BRERETON, R. G. (2011) **One-class classifiers.** Journal of Chemometrics, 25, 225-246.
- 64 BERGO, M. C. J. (2014) **Transferência de calibração na discriminação de mogno e espécies semelhantes utilizando NIRS e PLS-DA.** (Dissertação de Mestrado). Instituto de Química, Universidade de Brasília, Brasília.
- 65 OLIVERI, P. & DOWNEY, G. (2012) **Multivariate class modeling for the verification of food-authenticity claims.** Trends in Analytical Chemistry, 35, 74-86.
- 66 POMERANTSEV, A. L. & RODIONOVA, O. Y. (2018) **Multiclass partial least squares discriminant analysis: Taking the right way A critical tutorial.** Journal of Chemometrics, 32.
- 67 CHONG, I. G.; JUN, C.; H. (2005) **Performance of some variable selection methods when multicollinearity is present.** Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 78, 103-112.
- 68 MARTINS, A. R., TALHAVINI, M., VIEIRA, M. L., ZACCA, J. J., & BRAGA, J. W. B. (2017) **Discrimination of whisky brands and counterfeit identification by UV-Vis spectroscopy and multivariate data analysis.** Food Chemistry, 229, 142-151.
- 69 BIANCOLILLO, A., FIRMANI, P., BUCCI, R., MAGRI, A., & MARINI, F. (2019) **Determination of insect infestation on stores rice by near infrared (NIR) spectroscopy.** Microchemical Journal, 145, 252-258.
- 70 OLIVERI, P., LOPEZ, M. I., CASOLINO, M. C., RUISANCHEZ, I., CALLAO, M. P., MEDINI, L., & LANTERI, S. (2014) **Partial least squares density modeling (PLS-DM) - A new class-modeling strategy applied to the authentication of olives in brine by near-infrared spectroscopy.** Analytica Chimica Acta, 851, 30-36.
- 71 XU, L., YAN, S. M., CAI, C. B., & YU, X. P. (2013) **One-class partial least squares (OCPLS) classifier.** Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 126, 1-5.
- 72 WOLD, S. (1976) **Pattern-recognition by means of disjoint principal components models.** Pattern Recognition, 8, 127-139.
- 73 SENA, M. M., ALMEIDA, M. R., BRAGA, J. W. B., & POPPI, R. J. (2017) **Multivariate Statistical Analysis and Chemometrics.** Spectroscopic Methods in Food Analysis. FRANCA, A. S. e NOLLET, L. M. L. Boca Raton, FL, USA: CRC Press.
- 74 SUN, D. W. (2009) **Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control.** Nova York: Academic Press.
- 75 BARKER, M. & RAYENS; W. (2003) **Partial least squares for discrimination.:** Journal of Chemometrics, 17, 166-173.
- 76 BOTELHO, B. G., REIS, N., OLIVEIRA, L. S., & SENA, M. M. (2015) **Development and analytical validation of a screening method for simultaneous detection of five adulterants in raw milk using mid-infrared spectroscopy and PLS-DA.** Food Chemistry, 181, 31-37.
- 77 SENA, M. M., ALMEIDA, M. R., BRAGA, J. W. B., & POPPI, R. J. (2017) **Spectroscopic Methods in Food Analysis.** CRC Press.

- 78 GONDIM, C. S., JUNQUEIRA, R. G., & SOUZA, S. V. C. (2011) **Trends in implementing the validation of qualitative methods of analysis.** Revista Instituto Adolfo Lutz, 70, 433-447.
- 79 KENNARD, R. W. & STONE, L. A. (1969) **Computer aided design of experiments:** Technometrics, 11, 137-148.
- 80 BROWN, C. D. & GREEN; L., R. (2009) **Critical factors limiting the interpretation of regression vectors in multivariate calibration.** TrAC-Trends in Analytical Chemistry, 28, 506-514.
- 81 RODIONOVA, O. Y., TITOVA, A. V., & POMERANTSEV, A. L. (2016). **Discriminant analysis is an inappropriate method of authentication.** TrAC - Trends in Analytical Chemistry, 78, 17-22.
- 82 BORIN, A. & POPPI, R. J. (2004) **Multivariate quality control of lubricating oils using Fourier transform infrared spectroscopy.** Journal of the Brazilian Chemical Society, 15, 570-576.
- 83 DA SILVA, V. A. G., TALHAVINI, M., ZACCA, J. J., TRINDADE, B. R., & BRAGA, J. W. B. (2014) **Discrimination of Black Pen Inks on Writing Documents Using Visible Reflectance Spectroscopy and PLS-DA.** Journal of the Brazilian Chemical Society, 25, 1552-1564.
- 84 SOARES, L. F., DA SILVA, D. C., BERGO, M. C. J., CORADIN, V. T. R., BRAGA, J. W. B., & PASTORE, T. C. M. (2017). **Evaluation of a NIR handheld device and PLS-DA for discrimination of six similar Amazonian wood species.** Química Nova, 40, 418-426.
- 85 ZOUBIR, A. M. & BOASHASH, B. (1998) **The bootstrap and its application in signal processing.** IEEE Signal Processing Magazin, 15, 56-76.
- 86 EFRON, B. (1979) **1977 RIETZ LECTURE - Bootstrap methods - another look at the jackknife.** Annals of Statistics, 7, 1-26.
- 87 WEHRENS, R.; PUTTER, H.; & BUYDENS, L. M. C. (2000) **The bootstrap: a tutorial.** Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 54, 35-52.
- 88 ALMEIDA, M. R., CORREA, D. N., ROCHA, W. F. C., SCAFI, F. J. O., & POPPI, R. J. (2013) **Discrimination between authentic and counterfeit banknotes using Raman spectroscopy and PLS-DA with uncertainty estimation.** Microchemical Journal, 109, 170-177.
- 89 VAN DER VOET, H. (1999) **Pseudo-degrees of freedom for complex predictive models: The example of partial least squares.** Journal of Chemometrics, 13, 195-208.
- 90 MARÇO, P. H., VALDERRAMA, P., ALEXANDRINO, G. L., POPPI, R. J., & TAULER, R. (2014) **Resolução multivariada de curvas com mínimos quadrados alternantes: descrição, funcionamento e aplicações.** Química Nova, 37, 1525-1532.
- 91 MUNIZ FILHO, R. C. D. (2011) **Aplicação de métodos de resolução multivariada de curvas a dados experimentais gerados por diferentes técnicas analíticas: Uma visão exploratória da biossíntese da violaceína.** (Tese de Doutorado). Instituto de Química, UNICAMP, Campinas.
- 92 HERRERO, A. M. (2008) **Raman spectroscopy a promising technique for quality assessment of meat and fish: A review.** Food Chemistry, 107, 1642-1651.
- 93 GURSES, M. S., ERKEY, C., KIZILEL, S., & UZUN, A. (2018) **Characterization of sodium tripolyphosphate and sodium citrate dehydrate residues on surfaces.** Talanta, 176, 8-16.

- 94 PEREIRA, L., AMADO, A. M., CRITCHLEY, A. T., VAN DE VELDE, F., &  
RIBEIRO-CLARO, P. J. A. (2009) **Identification of selected seaweed  
polysaccharides (phycocolloids) by vibrational spectroscopy (FTIR-ATR and  
FT-Raman)**. *Food Hydrocolloids*, 23, 1903-1909.
- 95 GAO, X. Q., HAO, X. Z., XIONG, G. Y., GE, Q. F., ZHANG, W. G., ZHOU, G.  
H., & YIU, X. Y. (2016) **Interaction between carrageenan/soy protein isolates  
and salt-soluble meat protein**. *Food and Bioproducts Processing*, 100, 47-53.
- 96 KHANMOHAMMADI, M., ASHORI, A., KARRGOSHA, K., &  
GARMARUDI, A. B. (2007) **Simultaneous Determination of Sodium  
Triphosphate, Sodium Sulfate and Linear Alkylbenzenesulfonate in  
Washing Powder by Attenuated Total Reflectance: Fourier  
Transform Infrared Spectrometry**. *Journal of Surfactants and Detergents*, 10,  
81-86.
- 97 ZONTOV, Y., RONDINOVA, O. Y., KUCHEREJAVSKIY, S. V., &  
POMERANSTSEV, A. (2017) **DDSIMCA - A MATLAB GUI tool for data  
driven SIMCA approach**: *Chemometric Intelligent Laboratory System*, 167, 23-  
28.
- 98 XU, L., GOODARZI, M., SHI, W., CAI, C-B, & JIANG, J. G. (2014) **A  
MATLAB toolbox for class modeling using one-class partial least squares  
(OCPLS) classifiers** *Chemometric Intelligent Laboratory System*, 139, 58-63.
- 99 ZHU, D.-Y., KANG, Z-L., MA, H-J., XU, X-L., & ZHOU, G-H. (2018) **Effect  
of sodium chloride or sodium bicarbonate in the chicken batters: A physico-  
chemical and Raman spectroscopy study**. *Food Hydrocolloids*, 83, 222-228.
- 100 RINNAN, A.; BERG, F.; & ENGELSEN, S. B. (2009) **Review of the most  
common pre-processing techniques for near-infrared spectra**. *Trends in  
Analytical Chemistry*, 28, 1201-1222.
- 101 KÜPPER, L., HEISE, H. M., & BUTVINA, L. N. (2001) **Novel developments in  
mid-IR fiber-optic spectroscopy for analytical applications**. *Journal of  
Molecular Structure*, 563-564, 173-181.
- 102 PERISIC, N., AFSETH, N. K., OFSTAD, R., NARUM, B., & KOHLER, A.  
(2013) **Characterizing salt substitution in beef meat processing by  
vibrational spectroscopy and sensory analysis**. *Meat science*, 95, 576-585.
- 103 VOLERY, P.; BESSON, R.; & SCHAFFER-LEQUART, C. (2004)  
**Characterization of Commercial Carrageenans by Fourier Transform  
Infrared Spectroscopy Using Single-Reflection Attenuated Total  
Reflection**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7457-7463.
- 104 SMRCKOVÁ, P., HORSKY, J., SÁRKA, E., KOLÁČEK, J. NETOPILIK, M.,  
WALLTEROVÁ, Z., KRULIS, Z., SYNITSYAA, A., & HRUSKOVÁ, K.  
(2013). **Hydrolysis of wheat B-starch and characterisation of acetylated  
maltodextrin**. *Carbohydrate Polymer*, 98, 43-49.
- 105 BURIKOV, S. A., DOLENKO, S. A., FADEEV, V. V., & SUGONYAEV, A. V.  
(2007) **Identification of Inorganic Salts and Determination of Their  
Concentrations in Aqueous Solutions Based on the Valence Raman Band of  
Water Using Artificial Neural Networks**. *Pattern Recognition and Image  
Analysis*, 17, 554-559.
- 106 CAO, H. & XU, S. (2008) **Purification and characterization of type II  
collagen from chick sternal cartilage**. *Food Chemistry*, 108, 439-445.
- 107 SANTOS, P. M., SIMEONE, M. L. F., PIMENTEL, M. A. G., & SENA, M. M.  
(2019). **Non-destructive screening method for detecting the presence of**

**insects in sorghum grains using near infrared spectroscopy and discriminant analysis.** *Microchemical Journal*, 149, 104057.

108

MOBARAKI, N.; AMIGO, J. M. (2018) **HYPER-Tools. A graphical user-friendly interface for hyperspectral image analysis.** *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 172, 174-187.

## 8 MATERIAL SUPLEMENTAR

**Tabela 1S:** Publicações recentes sobre fraudes em carnes.

<b>Autor</b>	<b>Ano</b>	<b>Revista</b>	<b>Número</b>	<b>Página</b>	<b>Tipo de carne</b>	<b>Tipo de Fraude</b>	<b>Adulterantes</b>	<b>Técnica Analítica</b>	<b>Método Quimiométrico</b>
Cozzolino, D.; Murray, I.	2004	<b>LWT-Food Science and Technology</b>	37	447-452	Frango, boi, porco e cordeiro	Substituição		Vis/NIR	PCA/PLS
Jukna, Česlovas; Jukna, Vigilijus; Pečiulaitienė, Nijolė; Klementavičiūtė; Jolita	2008	<b>Vetereinarija ir Zootechnika</b>	41		Boi	Substituição		Condutividade	
Meza-Márquez, O. G.; Gallardo-Velázquez, T.; Oorio-Revilla, G.	2010	<b>Meat Science</b>	86	511-519	Boi e cavalo	Substituição, adição	Proteína de soja	FTIR	SIMCA
Rohman, A.; Sismindari; Erwanto, Y.; Che Man, Y. B.	2011	<b>Meat Science</b>	88	91-95	Boi e porco	Substituição		FTIR	PLS
Mamani-Linares, L.; Gallo, C.; Alomar, D.	2012	<b>Meat Science</b>	90	378-385	Boi, cavalo e lhama	Substituição		NIR	PLS
Alamprese, C.; Casale, M.; Sinelli, N.; Lanteri, S.; Casiraghi, E.	2013	<b>LWT-Food Science and Technology</b>	53	225-232	Boi e peru	Substituição		UV-Vis/NIR/MIR	PCA/LDA/PLS/Data fusion

<b>Autor</b>	<b>Ano</b>	<b>Revista</b>	<b>Número</b>	<b>Página</b>	<b>Tipo de carne</b>	<b>Tipo de Fraude</b>	<b>Adulterantes</b>	<b>Técnica Analítica</b>	<b>Método Quimiométrico</b>
Kamruzzaman, M.; Sun, D.; ElMasry, G.; Allen, P.	2013	<b>Talanta</b>	103	130-136	Porco e cordeiro	Substituição		Análise hiperespectral NIR	PLS/MLR
Soares, Sónia; Amaral, Joana S.; Oliveira, M. Beatriz P.P.; Mafra, Isabel	2013	<b>Meat Science</b>	94	115-120	Frango e porco	Substituição		PCR	
Morsy, Noha; Sun, Da-Wen	2013	<b>Meat Science</b>	93	292-302	Boi	Processamento		NIR	LDA/PLS-DA
von Bargaen, Christoph; Dojahn, Jörg; Waidelich, Dietmar; Humpf, Hans-Ulrich; Brockmeyer, Jens	2013	<b>Journal of Agricultural and Food Chemistry</b>	61	11986-11994	Porco e ovelha	Substituição		HPLC-MS/MS	
Lu, CX; Chen, LJ; Yang, ZL; Liu, X; Han, LJ	2013	<b>Applied Spectroscopy</b>	67	1390-1394	Boi e peixe	Substituição		NIR	
Barbin, DF; Sun, DW; Su, C	2013	<b>Innovative Food Science &amp; Emerging Technologies</b>	18	226-236	Boi e porco	Substituição		Análise hiperespectral NIR	PLS
Cajka, Tomas; Danhelova; Hana; Zachariasova, Milena; Riddellova, Katerina; Hajslova, Jana	2013	<b>Metabolomics</b>	9	545-557	Frango	Substituição		DART-TOF-MS	
Zajac, A.; Hanuza, J.; Dyminska, L.	2014	<b>Food Chemistry</b>	156	333-338	Boi e cavalo	Substituição		FT-Raman	

<b>Autor</b>	<b>Ano</b>	<b>Revista</b>	<b>Número</b>	<b>Página</b>	<b>Tipo de carne</b>	<b>Tipo de Fraude</b>	<b>Adulterantes</b>	<b>Técnica Analítica</b>	<b>Método Quimiométrico</b>
Boyaci, I. H.; Temiz, H. T.; Uysal, R. S.; Velioglu, H. M.; Yadegari, R. J.; Rishkan, M. M.	2014	<b>Food Chemistry</b>	148	37-41	Boi e cavalo	Substituição		Raman	PCA
Boyaci, I.; Uysal, R. S.; Temiz, T.; Shendi, E. G.; Yadegari, R. J.; Rishkan, M. M.; Velioglu, H. M.; Tamer, U.; Ozay, D. S.; Vural, H.	2014	<b>European Food Research and Technology</b>	238	845-852	Frango, boi, porco, peixe, ovelha e cordeiro	Substituição		Raman	PCA
Mahdi Guerhazi, Olfa Kanoun, and Nabil Derbel	2014	<b>Sensors Journal</b>	14	3624-3630	Boi e vitela	Substituição		Bio-impedância	
Iwobi, A.; Sebah, D.; Kraemer, I.; Losher, C.; Fischer, G.; Busch, U.; Huber, I. A	2015	<b>Food Chemistry</b>	169	305-313	Boi e porco	Substituição		PCR	
Ortea, Ignacio; Gallardo, José M.	2015	<b>Food Chemistry</b>	170	145-153	Boi	Substituição, origem, processamento		relação isotópica estável e análises multi-elementos	PCA
Kamruzzaman, Mohammed; Makino, Yoshio; Oshita, Seichi	2015	<b>Analytical Chimica Acta</b>	853	19-29	Frango, boi e porco	Substituição		Análise hiperespectral	

<b>Autor</b>	<b>Ano</b>	<b>Revista</b>	<b>Número</b>	<b>Página</b>	<b>Tipo de carne</b>	<b>Tipo de Fraude</b>	<b>Adulterantes</b>	<b>Técnica Analítica</b>	<b>Método Quimiométrico</b>
Jakes, W.; Gerdova, A.; Defernez, M.; Watson, A.D.; McCallum, C.; Limer, E.; Colquhoun, I.J.; Williamson, D.C.; Kemsle, E.K.	2015	<b>Food Chemistry</b>	175	1-9	Boi e cavalo	Substituição		RMN	
Oliveira, Gislene B.; Alewijn, Martin; Boerrigter- Eenling, Rita; van Ruth, Saskia M.	2015	<b>Foods</b>	4	359-375	Porco	Origem		FAME	
Nunes, K. M.; Andrade, M. V. O.; Santos Filho, A. M.; Lasmar, M. C.; Sena, M. M.	2016	<b>Food Chemistry</b>	205	14-22	Boi	Adição	NaCl, TPFS, colágeno, Maltodextrina e carragena	FTIR	PLS-DA/Data fusion
Kamruzzaman, Mohammed; Makino, Yoshio; Oshita, Seiichi	2016	<b>- Food Science and Technology</b>	66	685-691	Boi	Substituição		Análise hiperespectral	
Balog, Julia; Perenyi, Dora; Guallar-Hoyas, Cristina; Egri, Attila; Pringle, Steven D.; Stead, Sara; Chevallier, Olivier P.; Elliott, Chris T.; Takats, Zoltan	2016	<b>Journal of Agricultural and Food Chemistry</b>	64	4793-4800	Cavalo e ovelha	Substituição		DESI	

<b>Autor</b>	<b>Ano</b>	<b>Revista</b>	<b>Número</b>	<b>Página</b>	<b>Tipo de carne</b>	<b>Tipo de Fraude</b>	<b>Adulterantes</b>	<b>Técnica Analítica</b>	<b>Método Quimiométrico</b>
Rees, Gareth; Kelly, Simon D.; Cairns, Paul; Ueckermann, Henriette; Hoelzl, Stephan; Rossmann, Andrea; Scotter, Michael J.	2016	<b>Food Control</b>	67	144-154	Frango	Origem		SITE	
Alamprese, Cristina; Amigo, José Manuel; Casiraghi, Ernestina; Engelsen, Søren Balling	2016	<b>Meat Science</b>	121	175-181	Boi e peru	Substituição		FT-NIR	PLS/PLS-DA
Barbon, Ana Paula A.C.; Barbon Jr., Sylvio; Mantovani, Rafael Gomes; Fuzyi, Estefânia Mayumi; Peres, Louise Manha; Bridi, Ana Maria	2016	<b>Computers and Electronics in Agriculture</b>	127	368-375	Porco	Substituição		pH, WHC	
Hoffmann, B.; Munch, S.; Schwagele, F.; Neusub, C.; Jira, W.	2017	<b>Food Control</b>	71	200-209	Salsicha	Adição	Proteína de soja	HPLC-MS/MS	
Hossain, M. A. M. ; Ali, M. E.; Hamid, S. B. A.; Asing; Mustafa, S.; Desa, M. N. M.; Zaidul, I. S. M.	2017	<b>Food Control.</b>	73	175-184	Boi, porco e búfalo	Substituição		PCR	

<b>Autor</b>	<b>Ano</b>	<b>Revista</b>	<b>Número</b>	<b>Página</b>	<b>Tipo de carne</b>	<b>Tipo de Fraude</b>	<b>Adulterantes</b>	<b>Técnica Analítica</b>	<b>Método Quimiométrico</b>
Orduna, A. R.; Husby, E.; Yang, C. T.; Ghosh, D.; Beaudry, F.	2017	<b>Food Additives and Contaminants Part A-Chemistry Analysis Control Exposure &amp; Risk Assessment</b>	34	1110-1120	Porco e cavalo	Substituição		HPLC-MS/MS	
Prandi, B.; Lambertini, F.; Faccini, A.; Suman, M.; Leporati, A.; Tedeschi, T.; Sforza, S.	2017	<b>Food Control</b>	74	61-69	Boi e porco	Substituição		LC-MS/MS	
Ropodi, A. I.; Panagou, E. Z.; Nychas, G. E.	2017	<b>Food Control</b>	73	57-63	Boi e cavalo	Substituição		MSI	PCA
Kim, Jae Sung; Hwang, In Min; Lee, Ga Hyun; Park, Yu Min; Choi, Ji Yeon; Jamila, Nargis; Khan, Nae;e; Kim, Kyong Su	2017	<b>Meat Science</b>	123	13-20	Porco	Origem		ICO-OES/ICP- MS	LDA
Amaral, Joana S.; Santos, Graciete; Oliveira, M. Beatriz P.P.; Mafra, Isabel	2017	<b>Food control</b>	72	53-61	Boi e porco	Substituição		PCR	

<b>Autor</b>	<b>Ano</b>	<b>Revista</b>	<b>Número</b>	<b>Página</b>	<b>Tipo de carne</b>	<b>Tipo de Fraude</b>	<b>Adulterantes</b>	<b>Técnica Analítica</b>	<b>Método Quimiométrico</b>
Beltramo, Chiara; Riina, Maria Vittoria; Colussi, Silvia; Campia, Valentina; Maniaci, Maria Grazi; Biolatti, Cristina; Trisorio, Silvia; Modesto, Paol; Peletto, Simone; Acutis, Pier Luigi	2017	<b>Food Control</b>	78	366-373	17 espécies	Substituição		Low Cost and Density (LCD) Array	
Lubis, Hamadah; Salihah, Nur Thaqifah; Hossain, Mohammad Mosharraf; Ahmed, Minhaz Uddin	2017	<b>LWT - Food Science and Technology</b>	84	686-692	9 espécies	Substituição		PCR	
Kodogiannis, Vassilis S.	2017	<b>Food Bioprocess Technology</b>	10	730-749	Boi	Processamento		Electronic Nose	PCA
Kuswandia, Bambang; Gania, Agus Abdul; Ahmad, Musa	2017	<b>Food Bioscience</b>	19	1-6	Boi e porco	Substituição		Imunosensor	
Judge, M. M.; Kelleher, M. M.; Kearney, J. F.; Sleator, R. D; Berry, D. P.	2017	<b>Animal</b>	11	938-947	Boi	Origem		Ultra-low-density genotype	
Montowska, Magdalena; Forna, Emilia	2017	<b>Food Chemistry</b>	237	1092-1100	Frango, boi e porco	Substituição		nano-LC-QTOF-MS/MS	
Torelli, Emanuela; Manzano, Marisa; Marks, Robert S.	2017	<b>Sensors and Actuators</b>	247	868-874	Porco	Origem		Optical fibre genosensor	

<b>Autor</b>	<b>Ano</b>	<b>Revista</b>	<b>Número</b>	<b>Página</b>	<b>Tipo de carne</b>	<b>Tipo de Fraude</b>	<b>Adulterantes</b>	<b>Técnica Analítica</b>	<b>Método Quimiométrico</b>
Gao, Fei; Xu, Lingzhi; Zhang, Yuejing; Yang, Zengling; Han,Lujia; Liu, Xian	2018	<b>Food Chemistry</b>	240	989-996	Frango, boi, porco, peixe e caprinos	Origem		GC e FT-Raman	PCA e PLS-DA
Moreira, Maria João Pinho; Silva, Ana C.; Almeida, José M.M.M. de; Saraiva, Cristina	2018	<b>Food Packaging and Shelf Life</b>	15	169-180	Boi	Substituição		FTIR, pH, oxidação lipídica, análise microbiológica, cor e análise sensorial	PCA, LDA, PLS-R
Rady, Ahmed; Adedeji, Akinbode	2018	<b>Meat Science</b>	136	59-67	Frango, boi e porco	Substituição, adição	Proteína vegetal, soja e gluten	Vísivel-NIR, NIR	PLSR
Rahayu, W.S.; Martono, S.; Sudjadi; Rohman, Abdul	2018	<b>Journal of Advanced Veterinary and Animal Research</b>	5	307-314	Frango, boi, porco e cachorro	Substituição		FTIR	PCA, PLSR
Santos, Poliana M.; Colnago, Luiz Alberto	2018	<b>Food Analytical Methods</b>	11	2029-2034	Presunto	Substituição		MIR, NIR, FF- RMN	PCA, PLSR
Al-Sarayreh, Mahmoud; Reis, Marlon M.; Yan, Wei Qi; Klette, Reinhard	2018	<b>Journal of imaging</b>	4	1-20	Boi, porco e cordeiro	Substituição	Gordura	Análise hiperespectral	SVM,CNN

<b>Autor</b>	<b>Ano</b>	<b>Revista</b>	<b>Número</b>	<b>Página</b>	<b>Tipo de carne</b>	<b>Tipo de Fraude</b>	<b>Adulterantes</b>	<b>Técnica Analítica</b>	<b>Método Quimiométrico</b>
Wang, Wenxiu; Peng, Yankun; Sun, Hongwei; Zheng, Xiaochun; Wei, Wensong	2018	<b>Food Analytical Methods</b>	11	2707-2730	Boi, porco e cordeiro	Substituição		NIR, Análise Hiperespectral e Raman	PCA, PLSR
Kosek, Vít; Uttl, Leoš; Jírů, Monika; Black, Connor; Chevallier, Olivier; Tomaniová, Monika; Elliott, Christopher T.; Hajšlová, Jana	2019	<b>Food Control</b>	104	50-56	Frango e porco	Substituição		Rapid Evaporative Mass Spectrometry (REIMS)	
López-Maestresalas, Ainara; Insausti, Kizkitza; Jarén, Carme; Pérez-Roncal, Claudia; Urrutia, Olaia; Beriain, Mari Jose; Arazuri, Silvia	2019	<b>Food Control</b>	98	465-473	Porco	Substituição		NIR	PCA, PLS-DA
Zhenga, Xiaochun; Li, Yongy; Wei, Wensong; Peng, Yankun	2019	<b>Meat Science</b>	149	52-62	Pato e cordeiro	Substituição		Análise hiperespectral	PLSR
Nunes, Karen M.; Andrade, Marcus Vinícius O.; Almeida, Mariana R.; Fantini, Cristiano; Sena, Marcelo M.	2019	<b>Microchemical Journal</b>	147	582-589	Boi	Adição	NaCl, TPFS e carragena	FT-Raman	PLS-DA