

Utilização da Espectroscopia de Infravermelho Médio Como Método Rápido Para Identificação da Presença de Patógenos em Pimenta do Reino Associado a Ferramentas Quimiométricas

Jéssica Souza Coqueiro¹, Marcelo Silva Rocha¹, Thinara de Freitas Oliveira¹, Josane Cardim de Jesus², Sibelli Passini Barbosa Ferrão¹, Leandro Soares Santos¹

¹Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, Brasil,
(je.coqueiro98@gmail.com)

²Universidade Federal de Lavras, Lavras, Brasil

Resumo: A pimenta-do-reino é uma das especiarias mais consumidas mundialmente, sendo suscetível à contaminação por diversos microrganismos patogênicos como a *Salmonella* spp. e micotoxinas ao longo da cadeia de produção. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo desenvolver e avaliar métodos rápidos e não destrutivos para a identificação da presença de microrganismos patogênicos pertencentes à família das Enterobacteriaceae, como a *Salmonella* em amostras de pimenta-do-reino, utilizando espectroscopia no Infravermelho Médio (MIR) associada a ferramentas quimiométricas. As amostras de pimenta foram previamente caracterizadas por método microbiológico convencional e, posteriormente, submetidas às análises espectroscópicas de MIR. Os dados espectrais obtidos foram tratados e analisados por meio de técnicas multivariadas. Os resultados evidenciaram diferenças relevantes entre as amostras com ausência e presença de *Salmonella*. As análises exploratórias demonstram tendência de separação entre as classes, embora com certa sobreposição, possivelmente relacionadas a complexidade da matriz. De modo geral, os resultados indicaram que a espectroscopia NIR e MIR, associada a métodos quimiométricos, apresentam elevado potencial para a identificação rápida da presença de microrganismos patogênicos presentes na pimenta-do-reino. Além disso, a abordagem proposta mostra-se promissora para aplicação na detecção dessas bactérias, contribuindo para o desenvolvimento de metodologias alternativas às técnicas convencionais.

Palavras-chave: Análise espectral; Infravermelho médio; *Salmonella*; Análise multivariada; Investigação exploratória.

INTRODUÇÃO

A pimenta-do-reino (*Piper nigrum*), pertencente à família Piperaceae, é uma das especiarias mais antigas e amplamente comercializadas no mundo, com relevância histórica, econômica e tecnológica. Embora seu uso inicial tenha sido associado às propriedades sensoriais, especialmente pungência e aroma, diversos estudos evidenciam os seus efeitos biológicos, relacionados à presença de metabólitos secundários bioativos, com destaque para a piperina (Silva et al., 2021).

A piperina é considerada como principal alcaloide presente na pimenta-do-reino, além de outros compostos fenólicos e terpenoides existentes na espécie que exibem atividades antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana e moduladora de vias metabólicas, sendo investigados quanto ao potencial quimiopreventivo e neuroprotetor (Mayr et al., 2021).

O Brasil ocupa posição de destaque na produção dessa especiaria, sendo um dos principais países produtores e exportadores considerando o cenário global. De acordo com dados da Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO, 2025), o Brasil é o segundo maior produtor mundial de pimenta-do-reino, ficando atrás apenas do Vietnã, o que evidencia a relevância dessa cultura para o agronegócio brasileiro.

A produção de pimenta-do-reino é realizada por sistemas de agricultura familiar, exercendo importante função socioeconômica ao contribuir para a permanência da mão de obra no meio rural e para a geração de renda nas comunidades produtoras. No entanto, a cadeia produtiva dessa especiaria ainda apresenta limitações relacionadas à padronização das etapas de produção, abrangendo desde a colheita, debulha e secagem até o beneficiamento, armazenamento e distribuição. Essa falta de uniformidade favorece a ocorrência de variações nas



características físico-químicas e microbiológicas do produto final (Vinha et al., 2025).

A contaminação microbiológica de especiarias, como a pimenta-do-reino, constitui uma preocupação constante para os órgãos reguladores e para a indústria de alimentos. Entre os principais microrganismos de importância sanitária relatados nesse produto destacam-se *Salmonella* spp., *Bacillus cereus*, bactérias do grupo dos coliformes e *Escherichia coli*, cuja presença pode comprometer a segurança microbiológica e a qualidade do alimento.

Tratando-se dos métodos de detecção, para a *Salmonella* e outras bactérias pertencentes a família das Enterobacteriaceae, técnicas tradicionais se baseiam majoritariamente em métodos microbiológicos, devido à sua capacidade de identificar células viáveis do patógeno após etapas sequenciais de enriquecimento e isolamento em meios seletivos. Estes métodos, frequentemente padronizados por normas como a ISO 6579-1 (ISO, 2017), permanecem obrigatórios em muitos programas de vigilância sanitária apesar do maior tempo de análise e necessidade de infraestrutura especializada, o que tem motivado a adoção de abordagens que possam reduzir o tempo de resposta

A espectroscopia no infravermelho MIR destaca-se como uma abordagem promissora, para a detecção de contaminantes como a *Salmonella* spp. e micotoxinas, uma vez que possibilita a identificação indireta desses contaminantes por meio das alterações bioquímicas e estruturais provocadas na matriz alimentar. A presença de microrganismos ou metabólitos fúngicos pode modificar o perfil molecular do alimento, refletindo variações nas bandas espectrais associadas principalmente a proteínas, lipídios, carboidratos e outros constituintes químicos.

Técnicas vibracionais, como a espectroscopia baseadas no MIR, quando integradas a ferramentas quimiométricas e modelos multivariados, permitem a extração de padrões espectrais complexos e a construção de modelos discriminatórios capazes de identificar a presença de *Salmonella* ou micotoxinas com rapidez e sem necessidade de preparo extensivo da amostra. Essas técnicas, além de não serem destrutivas, apresentam potencial para aplicação em sistemas de triagem rápida, monitoramento em linha e controle de qualidade, configurando-se como uma alternativa estratégica aos métodos de análise convencionais, baseados em cultura microbiológica ou cromatografia (Moreirinha et al., 2018).

Nesse sentido, o presente estudo tem como objetivo avaliar a utilização da espectroscopia MIR, através de ferramentas quimiométricas para identificação de patógenos presentes na pimenta-do-reino, com foco na detecção da presença de *Salmonella*.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram adquiridas 20 amostras de pimenta-do-reino (*Piper nigrum*). Para realização das análises 50g das amostras foram moídas, em moedor de grãos (Bene Casa, Santa Catarina, Brasil) por aproximadamente 30 segundos, com o objetivo de promover a homogeneização da matriz. Entre o processamento de cada amostra, o equipamento era devidamente higienizado e submetido à sanitização com solução de álcool 70%, a fim de evitar contaminação cruzada entre as amostras.

A pesquisa da presença ou ausência da *Salmonella* spp., foi realizada através da ISO 6579-1 (ISO, 2017), por meio do método enzimático cromogênico Compact Dry SL® (Shimadzu Diagnostics Corporation, Tokyo, Japão).

Os resultados obtidos foram expressos de forma qualitativa, quanto à presença ou ausência do agente. A presença do microrganismo foi indicada pelo desenvolvimento de colônias com coloração variando de preto a esverdeado, podendo apresentar-se isoladas ou fundidas, além da formação de halo amarelado no meio ao redor das colônias, características sugestivas de *Salmonella*. Em contrapartida, resultados negativos foram caracterizados pela ausência de alteração na coloração do meio de cultura ou observação da ocorrência de colônias roxas, vermelhas ou avermelhadas, não sugestivas da presença do patógeno.

Através da análise microbiológica foram obtidos resultados utilizados como método de referência para a classificação das amostras, servindo como base para o desenvolvimento e avaliação dos modelos quimiométricos aplicados aos dados espectroscópicos obtidos por MIR.

Os espectros de MIR foram obtidos usando espectroscopia de infravermelho médio de reflexão total atenuada por transformada de Fourier MIR-ATR (Cary 630 FTIR, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, Califórnia, Estados Unidos) no modo absorvância, usando uma faixa espectral de 4000 a 650 cm^{-1} , com uma resolução de 4 cm^{-1} e 64 varreduras. A leitura foi realizada em um cristal de diamante com uma superfície de amostragem de 1mm de diâmetro, onde aproximadamente 0,1g das amostras foram colocadas no cristal de ATR, cada espectro foi obtido em aproximadamente 30 segundos, em duplicata. Entre cada coleta, o cristal foi limpo com álcool isopropílico (Merck, Darmstadt, Alemanha).

As informações foram organizadas com dimensão $m \times n$ (linhas $\times$ colunas), em que m corresponde aos tratamentos e n às variáveis de interesse (máximos de absorvância). Antes da análise, os dados originais passaram por pré-processamento com o filtro de Savitzky-Golay (janela de 50 pontos) (Savitzky;

Golay, 1964) a fim de reduzir variações sistemáticas resultantes, por exemplo, de características dos instrumentos ou de fatores ambientais.

A Análise de Componentes Principais (ACP) foi realizada como método exploratório para encontrar as principais fontes de variabilidade nos dados, detectar valores discrepantes. Para construir os modelos, foram utilizadas cerca de 20 absorvâncias associadas a comprimentos de onda entre 696 cm^{-1} a 3291 cm^{-1} considerando dados MIR. Essas absorvâncias foram usadas como variáveis de classe para amostras com presença e ausência da *Salmonella*.

Já para identificar padrões de similaridade entre as amostras de pimenta-do-reino com ausência e presença de *Salmonella*, foi empregada a Análise de Agrupamento Hierárquico (*Hierarchical Cluster Analysis* - HCA) como técnica exploratória. Essa abordagem permitiu avaliar as relações de similaridade e dissimilaridade entre as amostras analisadas, possibilitando a visualização da formação de grupos com características espectrais semelhantes por meio do dendrograma.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Considerando os resultados obtidos pela análise microbiológica de referência para identificação de *Salmonella* spp., apenas 3 dentre as 20 amostras de pimenta-do-reino analisadas foram negativas para a presença de microrganismos indicando uma elevada frequência de contaminação no conjunto analisado.

Os resultados encontrados estão em acordo com demais estudos que também relatam a ocorrência de *Salmonella* em pimenta-do-reino e outras especiarias, embora com ocorrências geralmente inferiores às observadas aqui, a exemplo, de estudo desenvolvido por Tang (2025), ao realizarem uma análise abrangente dos riscos microbiológicos em especiarias, onde avaliaram produtos amplamente utilizados como a pimenta-do-reino, pimenta-vermelha (chili), cúrcuma, cominho e canela. Os autores observaram a presença de microrganismos patogênicos, incluindo *Salmonella* nessas matrizes, destacando que essas especiarias, mesmo apresentando baixo teor de água, podem atuar como veículos de contaminação e representar uma preocupação relevante para a segurança alimentar em diversos mercados.

Os espectros MIR obtidos para as 20 amostras de pimenta-do-reino são apresentados através da Figura 1. A variabilidade espectral indica a heterogeneidade entre as amostras analisadas, com elevada similaridade entre os grupos e algumas diferenças sutis de intensidade, fator indicado pela presença de muitas regiões contendo picos com sobreposições, dificultando a diferenciação visual entre amostras com ausência e presença da *Salmonella*.

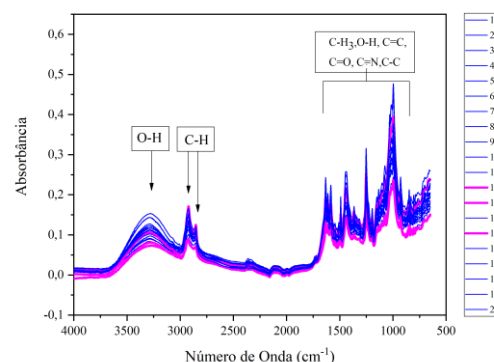


Figura 1. Espectros de absorvância MIR das amostras de pimenta-do-reino com ausência e presença de *Salmonella*.

Para os espectros obtidos na região do Infravermelho Médio, observa-se aproximadamente três regiões principais de absorção, associadas a diferentes grupos funcionais presentes na matriz da pimenta-do-reino. A primeira, está relacionada ao estiramento do grupo O-H, geralmente associado à presença de água, fenóis e carboidratos. A segunda região espectral corresponde ao estiramento das ligações C-H, características de compostos lipídicos e cadeias alifáticas presentes em lipídios e compostos orgânicos. Já na região entre $1700\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$, observa-se um conjunto mais complexo de bandas atribuídas a diferentes vibrações moleculares, incluindo C=O (carbonilas de ácidos orgânicos, lipídios e proteínas), C=C e C=N (compostos aromáticos e estruturas proteicas), N-H (proteínas) e C-O/C-C (álcoois, éteres e carboidratos). Essas bandas são características de compostos orgânicos presentes nas matrizes alimentares (Mendes; Duarte, 2021).

A presença da banda larga entre $3500\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$, atribuída predominantemente ao estiramento O-H, é associada à água e às interações por ligação de hidrogênio presentes na matriz. Essa faixa espectral é sensível ao estado de hidratação, refletindo diferenças entre água livre e água ligada, bem como reorganizações na rede de ligações intermoleculares. Em sistemas microbiológicos, variações nessa região têm sido relacionadas a alterações no microambiente hídrico decorrentes da presença de biomassa microbiana e/ou formação de biofilmes (Liu et al., 2020).

Considerando a região do fingerprint, as regiões entre 1700 e 1500 cm^{-1} são atribuídas predominantemente às bandas de amida, relacionada ao estiramento C=O da ligação peptídica, à deformação N-H e ao estiramento C-N. As bandas de amida são particularmente sensíveis à estrutura secundária das proteínas, refletindo variações conformacionais e diferenças na composição proteica das amostras (Baker et al., 2014).

No contexto microbiológico, alterações na intensidade ou no perfil dessas bandas podem estar associadas à contribuição de carga bacteriana, uma vez que proteínas estruturais e extracelulares compõem fração significativa das células microbianas e de possíveis biofilmes. Assim, o aumento de absorvância observado nas amostras com presença de *Salmonella* pode indicar modificações na fração proteica total (Cordovana et al., 2022).

A região entre 1200 e 900 cm^{-1} é caracterizada por vibrações associadas principalmente a ligações C-O, C-O-C e P-O, frequentemente relacionadas a polissacarídeos, fosfatos e outros constituintes estruturais. Em bactérias Gram-negativas como a *Salmonella*, essa faixa pode refletir contribuições de Lipopolissacarídeos (LPS) presentes na membrana externa, além de componentes associados a fosfolipídios, ácidos nucleicos e polissacarídeos. Diferenças nessa região podem, portanto, indicar variações estruturais e composicionais associadas à presença bacteriana ou à reorganização da matriz total (Cordovana et al., 2022).

A Figura 2 apresenta o gráfico dos componentes principais referentes às amostras pimenta-do-reino com ausência e presença da *Salmonella*.

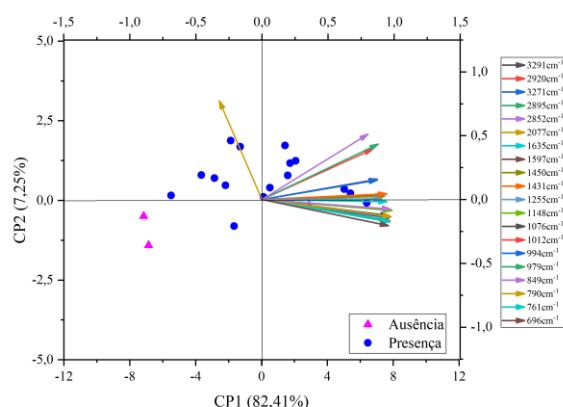


Figura 2. Dispersão dos Componentes Principais da pimenta-do-reino com ausência e presença de *Salmonella*, considerando dados do MIR.

A análise dos dados obtidos por MIR evidenciou uma tendência de separação entre as amostras com ausência e presença de microrganismos, observada principalmente ao longo do primeiro Componente Principal (CP1), responsável por 82,41% da variância total. A distribuição das amostras contaminadas ao longo desse eixo indica que CP1 concentrou as variações espectrais mais relevantes para a discriminação entre as classes.

A análise dos vetores revelou que CP1 está associado às variáveis localizadas predominantemente na região de 1500 a 900 cm^{-1} , incluindo comprimentos de onda como 1255, 1148, 1076, 1012 e 994 cm^{-1} , que

correspondem à região de impressão digital, caracterizada por vibrações associadas principalmente a ligações C-O, C-O-C, C-N e P-O, comumente relacionadas a presença dos polissacarídeos, fosfatos, frações nitrogenadas e componentes estruturais da matriz orgânica (Kaavya et al., 2020).

Dessa forma, a associação do CP1 com os espectros sugerem que a possível separação observada pode estar vinculada a variações estruturais e composicionais na fração de carboidratos das amostras, possivelmente relacionadas à presença microbiana, visto que a contaminação por microrganismos pode promover alterações na matriz alimentar por meio da utilização metabólica de açúcares e polissacarídeos disponíveis, além da produção de metabólitos secundários e componentes celulares bacterianos, como proteínas, lipídios e polissacarídeos da parede celular. Essas modificações podem resultar em mudanças nas vibrações associadas às ligações C-O, C-O-C e C-N, presentes na região espectral analisada, refletindo diferenças na composição química da matriz da pimenta-do-reino entre amostras contaminadas e não contaminadas.

Dessa forma, a associação do CP1 com os espectros sugerem que a possível separação observada pode estar vinculada a variações estruturais e composicionais na fração de carboidratos das amostras, possivelmente relacionadas à presença microbiana.

Para o CP2, responsável por 7,26% da variância, a contribuição mais relevante foi relacionada à região em torno de 2077 cm^{-1} , que pode estar associada a combinações vibracionais envolvendo grupos O-H e C=O (Liu et al., 2020). Essa faixa é associada a presença de água nas amostras, bem como as suas interações intermoleculares, atuando como um eixo complementar para descrição das diferenças espectrais entre a matriz analisada.

Assim, em razão da alta sensibilidade do MIR é possível obter uma maior especificidade bioquímica, permitindo interpretação molecular mais direta das alterações observadas nas amostras, de modo a atuar como uma técnica promissora para a detecção espectroscópica indireta de contaminação microbiana em alimentos (Gong; Chen; Wu, 2024).

A Figura 3 apresenta os dendrogramas obtidos por análise de Agrupamento Hierárquico (HCA) das amostras de pimenta-do-reino, construídos a partir dos dados espectroscópicos de MIR, evidenciando os padrões de similaridade entre as amostras com ausência e presença de *Salmonella*, a identificação e numeração dos grupos foi realizada a partir do lado direito do dendrograma.

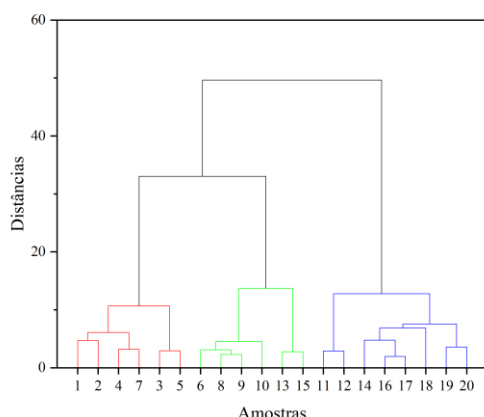


Figura 3. Dendrogramas gerados pela Análise de Agrupamento Hierárquico (HCA) a partir dos dados espectrais de MIR.

A análise de *cluster* consiste em uma técnica multivariada que busca agrupar amostras com elevado grau de similaridade entre si e maior dissimilaridade em relação aos demais grupos, com base em medidas de distância ou similaridade entre os objetos analisados. Dessa forma, possibilita a identificação de estruturas naturais nos dados, permitindo a formação de agrupamentos mais homogêneos internamente e heterogêneos entre si.

Considerando os dados utilizados os resultados foram responsáveis pela formação de três *clusters*. É possível notar que duas entre as três amostras com a ausência de patógenos, concentradas no segundo cluster, enquanto a restante foi distribuída no terceiro.

Assim, é possível observar que os dendrogramas obtidos revelaram a formação de diferentes agrupamentos, indicando a existência de perfis espectrais distintos entre as amostras analisadas. Como se trata de uma técnica exploratória e não supervisionada, os *clusters* formados refletem principalmente à similaridade química da matriz, associada às variações naturais na composição da pimenta-do-reino.

Dessa forma, os resultados obtidos demonstram que a técnicas espectroscópica empregada foi capaz de identificar padrões espectrais entre as amostras, contribuindo para a compreensão da variabilidade química presente no conjunto de dados analisado.

CONCLUSÃO

Este estudo destaca o potencial da técnica espectroscópicas baseadas em MIR, associadas a ferramentas quimiométricas, para a identificação da presença de microrganismos, uma vez que essas abordagens demonstraram ser capazes de captar variações na composição química da matriz alimentar relacionadas à presença do patógeno.

A aplicação de análises exploratórias, como a ACP e a HCA, permitiu a visualização de tendências de agrupamento e padrões de similaridade entre as amostras analisadas.

Assim é possível notar que os avanços das técnicas espectroscópicas demonstram seu elevado potencial para aplicações em microbiologia, permitindo a obtenção de informações químicas relevantes de forma rápida e não invasiva. A integração dessas técnicas com ferramentas quimiométricas favorecem o desenvolvimento de métodos analíticos mais robustos para a detecção e diferenciação de microrganismos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão das bolsas de doutorado, bem como ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciências de Alimentos (PPGECAL).

REFERÊNCIAS

- Silva, A. R. P., Fungaro, M. H. P., Silva, J. J., Martins, L. M., Taniwaki, M. H., Iamanaka, B. T. Ochratoxin A and related fungi in Brazilian black pepper (*Piper nigrum* L.). Food Research International, v. 142, p. 110207, 2021.
- Mayr, S., Be, K. B., Grabska, J., Schneckenreiter, E., & Huck, C. W. Near-infrared spectroscopy in quality control of *Piper nigrum*: A comparison of performance of benchtop and handheld spectrometers. Talanta, 223(121809), 1–8, 2021.
- Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database (FAO). The State of Food Security and Nutrition in the World, 2025.
- Vinha, M. B., Moro, L. B., Lima, I. de M., Nascimento, M. da S. do, Pires, G. P., de Oliveira, J. P., Cassini, S. T. A. Salmonella in black pepper (*Piper nigrum*): From farm to processing. International Journal of Food Microbiology, 426, 2024.
- Moreirinha, C., Trindade, J., Saraiva, J. A., Almeida, A., & Delgadillo, I. MIR spectroscopy as alternative method for further confirmation of foodborne pathogens *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes*. Journal of Food Science and Technology, 55(10), 3971–3978, 2018.
- ISO, Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* — Part 1: Detection of *Salmonella* spp., 2017.
- Tang, X. Risk analysis of microorganisms in common food spices. Frontiers in Microbiology, 1–8, 2025.



Mendes e Duarte, N. Mid-Infrared Spectroscopy as a Valuable Tool to Tackle Food. *Foods*, 10, 477, 2021.

Liu, Y., Hubert, J., Yamdeu, G., Gong, Y. Y., & Orfila, C. A review of postharvest approaches to reduce fungal and mycotoxin contamination of foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, November 2019, 1–40, 2020.

Baker, M. J., Trevisan, J., Bassan, P., Bhargava, R., Butler, H. J., Dorling, K. M., Fielden, P. R., Fogarty, S. W., Fullwood, N. J., Heys, K. A., Hughes, C., Lasch, P., Martin-Hirsch, P. L., Obinaju, B., Sockalingum, G. D., Sulé-Suso, J., Strong, R. J., Walsh, M. J., Wood, B. R., Martin, F. L. Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials. *Nature Protocols*, 9(8), 1771–1791, 2014.

Cordovana, M., Mauder, N., Join-Lambert, O., Gravey, F., LeHello, S., Auzou, M., Pitti, M., Zoppi, S., Buhl, M., Steinmann, J., Frickmann, H., Dekker, D., Funashima, Y., Nagasawa, Z., Soki, J., Orosz, L., Veloo, A. C., Justesen, U. S., Holt, H. M., ... Kostrzewa, M. Machine learning-based typing of *Salmonella enterica* O-serogroups by the Fourier-Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy-based IR Biotyper system. *Journal of Microbiological Methods*, 201, 2022.

Liu, Y., Hubert, J., Yamdeu, G., Gong, Y. Y., & Orfila, C. A review of postharvest approaches to reduce fungal and mycotoxin contamination of foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, November 2019, 1–40, 2020.