



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DOMÉSTICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS



**PREVISÃO DO TEOR DE PROTEÍNAS E LIPÍDIOS DO QUEIJO DE COALHO  
UTILIZANDO A ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO E  
CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA**

KELIANE OLIVEIRA DE LIMA

Recife

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DOMÉSTICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS

KELIANE OLIVEIRA DE LIMA

**PREVISÃO DO TEOR DE PROTEÍNAS E LIPÍDIOS DO QUEIJO DE COALHO  
UTILIZANDO A ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO E  
CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito para obtenção do Grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

ORIENTADOR/A: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> SAMARA ALVACHIAN CARDOSO ANDRADE

CO-ORIENTADORAS: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> FERNANDA ARAÚJO HONORATO

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> NEILA MELLO DOS SANTOS CORTEZ

Recife

2016

Ficha catalográfica

L732p Lima, Keliane Oliveira de  
Previsão do teor de proteínas e lipídios do queijo de coalho utilizando a espectroscopia no infravermelho próximo e calibração multivariada / Keliane Oliveira de Lima. – Recife, 2016.  
81 p. : il.

Orientadora: Samara Alvachian Cardoso Andrade.  
Coorientadores: Fernanda Araújo Honorato e Neila Mello dos Santos Cortez.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Ciências Domésticas, Recife, 2016.

Referências.

1. Queijo de coalho 2. Lipídios 3. Proteínas 4. Infravermelho próximo; 5. Calibração multivariada I. Andrade, Samara Alvachian Cardoso , orientadora II. Honorato, Fernanda Araújo, coorientadora III. Cortez, Neila Mello dos Santos, coorientadora Título

CDD 664

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DOMÉSTICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS

**PREVISÃO DO TEOR DE PROTEÍNAS E LIPÍDIOS DO QUEIJO DE COALHO  
UTILIZANDO A ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO E  
CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA**

**Por Keliane Oliveira de Lima**

Esta dissertação foi julgada para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos e aprovada em \_\_/\_\_/\_\_ pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimento em sua forma final.

Banca Examinadora:

---

Prof/a Dr<sup>a</sup> Celiane Gomes Maia da Silva  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

---

Prof/a Dr<sup>a</sup> Andreлина Maria Pinheiro dos Santos  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

---

Prof/a Dr<sup>a</sup> Maria Fernanda Pimentel Avelar  
Universidade Federal de Pernambuco

## DEDICATÓRIA

A vitória da minha conquista dedico com todo meu amor a Deus, pois sem Ele nada seria possível.

Dedico, especialmente, a Eduardo e Maria Auta, meus pais, pelo amor incondicional e por despertar em mim o prazer por estudar.

Aos meus irmãos, Klealdo e Kleybson que estiveram ao meu lado nesta longa caminhada.

A você, meu grande amor Gabriel, companheiro no amor, na vida e nos sonhos! Agradeço pela enorme compreensão, dedicação, paciência e, sobretudo por lutarmos juntos na vida!

À minha avó, Auta Maria, *in memoriam*, exemplo de caráter, dignidade e simplicidade que estará sempre em meu coração.

## AGRADECIMENTOS

“Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha, é porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra! Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha e não nos deixa só porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso.”

Charles Chaplin

Meu infinito agradecimento a Deus, pois Ele colocou pessoas tão especiais ao meu lado, sem as quais não teria conseguido. Além de me conceder sabedoria nas escolhas dos melhores caminhos, coragem para acreditar, força para não desistir e proteção para me amparar.

Aos meus pais, Maria Auta Oliveira de Lima e Eduardo Sebastião de Lima que, muitas vezes, renunciaram seus sonhos para que eu pudesse realizar o meu. Por ter despertado em mim o prazer pelos estudos e, sobretudo por me ensinar o verdadeiro sentido da vida.

Aos meus irmãos, Kleodoaldo Lima e Kleybson Lima, pelo apoio incondicional, força e amizade. Sem vocês nada seria possível, pois são minha fonte de inspiração!

Ao meu grande amor, Gabriel Santos, meu noivo, que através do seu amor, companheirismo, paciência, compreensão e pelas incontáveis horas me acompanhando no laboratório, este trabalho pôde ser concretizado. Obrigada por ter feito do meu sonho o nosso sonho!

A minha orientadora, a professora Dr<sup>a</sup> Samara Alvachian e co-orientadora Dr<sup>a</sup> Fernanda Honorato pela orientação prestada e conhecimento transmitido ao longo do mestrado. Muito obrigada!

A todos os professores que compõe o corpo docente do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos – UFRPE, pelo incentivo ao aprofundamento das reflexões na área de alimentos.

À Dr<sup>a</sup> Neila Cortez, meu agradecimento, pois poucas pessoas são privilegiadas como eu por ter tido a sorte de conviver com uma profissional tão dedicada, eficiente e inteligente. Cada minuto que tive a oportunidade de encontrá-la aprendi muito, aprendi a ser uma profissional mais preparada, assim como, um ser humano melhor. Muito obrigada pelo incentivo e sábias sugestões! A você, Neila Cortez serei eternamente grata!

À Dr<sup>a</sup> Jenyffer Medeiros Campos, profissional de extrema competência, agradeço pelo incentivo que foi muito importante para a conclusão desta dissertação.

A toda a equipe do Laboratório de Análise de Combustíveis - UFPE e Laboratório de Engenharia de Alimentos - UFPE, pelo apoio técnico e profissional colaborando para a realização das análises químicas e especialmente a técnica de laboratório de Engenharia de Alimentos Márcia Monteiro, a engenheira química Graciliane Ximenes e a estagiária do meu projeto Ariadne Morais pelo constante apoio e incentivo que foram muito importantes para a conclusão deste trabalho.

Ao doutorando Vitor Hugo do DEQ-UFPE que me ajudou a compreender o tratamento de dados multivariado.

Aos funcionários do Programa de pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos - UFRPE, em especial, a secretária Ana pela sua dedicação. Com muito carinho agradeço a técnica do laboratório de análise físico-química Jaqueline pela sua competência, dedicação e pelas inúmeras horas no laboratório me auxiliando nas análises, a qual sem dúvida foi mais que uma técnica, foi uma grande amiga.

A todos os meus colegas do mestrado, em especial Jocelane, Juliana, Helen, Érika, Regina, Maria e Marília, pelos momentos vividos juntas, tornando-se verdadeiras amigas, compartilhando alegrias e dividindo dificuldades.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudo.

As minhas amigas, Juliana Lourenço (Juli), Edkarlla Dantas (Karllinha), Kairy Lima (Kika), Alice Soares, Helânia Dantas, Shirley Simões e Desirré Duda, pelo inesquecível apoio na vida. Vocês me incentivaram a fazer o mestrado e seguir a trilha do conhecimento. Os meus mais sinceros agradecimentos!

A dona Carmem (tia Cal) pelas orações! Muito obrigada!

A uma pessoa muito especial, Severina (dona Biu), quase uma mãe para mim, que através de seus sábios conselhos me ajuda a tomar a direção certa na vida! Muito Obrigada!

É muito difícil transformar sentimentos em palavras, mas serei eternamente grata a vocês, pessoas imprescindíveis para a realização e conclusão deste trabalho! Acredito que ninguém vence sozinho, obrigada a todos!

## EPÍGRAFE

“Entrega o teu caminho ao Senhor; confia Nele, e Ele o fará.”  
Salmo 37: 5

## RESUMO

O queijo de coalho é uma iguaria definitivamente incorporada no cardápio dos brasileiros. É um alimento expressivo de uma identidade territorial, constituindo um bem cultural, enraizado na alimentação principalmente do Nordeste do país. A tecnologia empregada na produção do queijo de coalho é simples, ocorre geralmente em pequenas queijarias. Os métodos convencionais para análise de alimentos demandam tempo, equipamentos específicos, mão de obra especializada e geram resíduos. O desenvolvimento de técnicas instrumentais de análise permitiu a criação de métodos rápidos, não destrutivos e que permitem estimar a composição de alimentos. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi prever teor de proteínas e lipídios, utilizando a espectroscopia na região do infravermelho próximo associada à calibração multivariada. Para tanto, 80 amostras de queijo de coalho foram adquiridas em comércio local para as quais foram realizadas as análises pelos métodos convencionais (Kjeldahl para proteínas e Gerber para lipídios) e espectroscópicas. Os espectros NIR foram obtidos na região  $10000 - 4000 \text{ cm}^{-1}$  no modo reflectância difusa, com resolução de  $8 \text{ cm}^{-1}$  e média de 16 varreduras. Para melhor condicionamento da matriz de dados, diferentes pré-processamentos foram testados, sendo a 1ª Derivada com filtro Savitzky - Golay utilizando janela de 19 pontos e polinômio de 2º grau o mais efetivo. O método de calibração utilizado foi a regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) com seleção de variáveis utilizando o algoritmo PLS por intervalos (iPLS). De maneira geral, foi possível verificar que o erro médio quadrático de previsão – RMSEP para o modelo escolhido para o teor lipídios em queijo de coalho foi 1,39%. Em relação a variável proteínas obteve um RMSEP de 2,73%. A espectroscopia no infravermelho próximo evidenciou imprecisão para predição de proteínas em queijos de coalho, embora para outras variedades de queijo, a metodologia tenha se aplicado com sucesso. Para o teor de lipídios demonstrou potencial do modelo multivariado utilizado na determinação de gorduras em amostras com matrizes complexas como é o caso do queijo de coalho, evidenciando as vantagens de associação entre NIR-PLS.

**Palavras - chave:** queijo de coalho; lipídios; proteínas; infravermelho próximo; calibração multivariada

## ABSTRACT

The “coalho” cheese is a delicacy incorporated into the menu of Brazilians. It is a significant food from a territorial identity, constituting a cultural food from Northeast Brazil. The technology employed in cheese production is simple, usually occurs in small dairies. Conventional methods for food analysis takes time, equipment, specific labors and generate wastes. Development of instrumental analysis techniques allowed the creation of rapid, nondestructive technology that allow to estimate the composition of food. Thus, the objective of this study was to provide content of proteins and lipids of “coalho” cheese, using spectroscopy in the near infrared region associated with multivariate calibration. Therefore, 80 samples of “coalho” cheese were purchased in local shops to which were performed the analysis by conventional methods (Kjeldahl for protein and Gerber to lipids) and NIR spectroscopy. Spectroscopic analyzes were performed in the near infrared region (10000 - 4000  $\text{cm}^{-1}$ ) in the diffuse reflectance mode with resolution of 8  $\text{cm}^{-1}$ , and average of 16 scans. For a better conditioning of the matrix data, different pre-processing were tested, and the 1st derivative with filter Savitzky - Golay using window 19 points and 2nd degree polynomial of the most effective. The calibration method was partial least squares regression (PLS) with variable selection variables using the algorithm interval PLS (iPLS). Overall, we found that the mean square error of prediction - RMSEP for the chosen model for -the lipid content was 1.39%. Regarding the variable proteins a RMSEP value of 2.73% was obtained. The near infrared spectroscopy showed imprecision for protein prediction, although for other cheese varieties, the methodology has been successfully applied. For the lipid content the determination of fat in samples with complex matrices such as “coalho” cheese showed the advantages of association between NIR-PLS.

**Key - words:** “coalho” cheese; lipids; proteins; near infrared; multivariate calibration

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABIQ - Associação Brasileira das Indústrias de Queijos

ACQP - Associação de Certificação do Queijo Coalho da Região do Agreste de Pernambuco

ADAGRO - Agência de Defesa e Fiscalização Agropecuária de Pernambuco

A.O.A.C - *Association of Official Analytical Chemists*

ITEP - Instituto de Tecnologia de Pernambuco

iPLS – Regressão em mínimos quadrados parciais por intervalo

IV - Infravermelho

KSXY - Algoritmo Kennard-Stone XY (*Sample set Partitioning based on joint X-y distances*)

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MIR – Infravermelho Médio (*Middle infrared*)

MLR - Regressão Linear Múltipla

MSC - Correção do efeito multiplicativo (*Multiplicative scatter Correction*)

NIR – Infravermelho Próximo (*Near infrared*)

NIRS - Espectroscopia no Infravermelho Próximo (*Near infrared spectroscopy*)

PCA –Análises de Componentes Principais (*Principal components analysis*)

PCR –Regressão de Componentes Principais (*Principal components regression*)

PLS - Regressão por mínimos quadrados parciais (*Partial least squares*)

RIISPOA - Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal

RMSE - raiz quadrada do erro médio quadrático (*Root mean square error*)

RMSEC –raiz quadrada do erro médio quadrático de calibração (*Root mean square error of calibration*)

RMSECV –raiz quadrada do erro médio quadrático de validação cruzada (*Root mean square error of cross- validation*)

RMSEP - raiz quadrada do erro médio quadrático de previsão (*Root mean square error of prediction*)

SEBRAE - Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas

SNV - Variação normal padrão (*Standard normal variate*)

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1 - Fluxograma do processamento de queijo de coalho tipo A.....	23
Figura 2 - Fluxograma do processamento de queijo coalho tipo B no Estado de Pernambuco.....	26
Figura 3 - Modos de medida utilizando a região NIR: (a) transmitância, (b) transfectância, (c) reflectância difusa, (d) interactância, (e) transmitância através do meio de dispersão. ....	32
Figura 4 - Representação gráfica da centralização dos dados na média.....	35
Figura 5 - Representação das matrizes de dados (X e y) para calibração multivariada.....	37
Figura 6 - Representação dos escores no novo sistema de eixos definido pelas PC's.....	38

### ARTIGO: PREVISÃO DO TEOR DE PROTEÍNAS E LIPÍDIOS DO QUEIJO DE COALHO UTILIZANDO A ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO E CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA

Figura 1 - Espectros brutos NIR das 80 amostras de queijo tipo coalho.....	68
Figura 2 - Gráfico dos escores de todas as amostras de queijo de coalho nas duas primeiras componentes PC1 e PC2.....	69
Figura 3 - Gráfico dos pesos PC1 x PC2.....	69
Figura 4 - Resíduo versus Influência.....	70
Figura 5 - Espectros pré-processados por MSC.....	71
Figura 6 - Espectros pré-processados por MSC seguida de Suavização Savitzky-Golay com janelas de 7 pontos.....	71
Figura 7 - Espectros pré-processados por SNV.....	71
Figura 8 - Espectros pré-processados por SNV seguida de Suavização Savitzky-Golay com janelas de 7 pontos.....	72
Figura 9 - Espectros pré-processados por 1°Derivada com filtro Savitzky-Golay (janelas de 15 pontos e polinômio de 2° grau).....	72
Figura 10 - Espectros pré-processados por 1°Derivada com filtro Savitzky-Golay (janelas de 17 pontos e polinômio de 2° grau).....	72

Figura 11 - Espectros pré-processados por Derivadas com filtro Savitzky- Golay (janelas de 19 pontos e polinômio de 2° grau) .....	73
--	----

## LISTA DE TABELAS

### REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1 - Intervalos das regiões do infravermelho.....	30
---	----

### ARTIGO: PREVISÃO DO TEOR DE PROTEÍNAS E LIPÍDIOS DO QUEIJO DE COALHO UTILIZANDO A ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO E CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA

Tabela 1 - Média do teor de proteínas das amostras de queijo de coalho .....	64
Tabela 2 - Média do teor de proteínas do queijo de coalho tipo A e B.....	64
Tabela 3 - Média do teor de lipídios do queijo de coalho .....	66
Tabela 4 - Média do teor de proteínas do queijo de coalho tipo A e B.....	66
Tabela 5 - Valores de RMSECV, RMSEP, Coeficiente de determinação e Variáveis latentes obtidos pelo modelo PLS nos espectros NIR pré-processados para determinação de proteínas em queijo de coalho.....	73
Tabela 6 - Valores de RMSECV, RMSEP, Coeficiente de determinação e Variáveis latentes obtidos pelo modelo PLS nos espectros NIR pré-processados para determinação de lipídios em queijo de coalho .....	74
Tabela 7 - Parâmetros dos modelos de calibração multivariada para determinação de proteínas .....	75
Tabela 8 - Parâmetros dos modelos de calibração multivariada para determinação de lipídios .....	76

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>2. PROBLEMA DE PESQUISA .....</b>	<b>18</b>
<b>3. HIPÓTESE .....</b>	<b>19</b>
<b>4. REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>20</b>
4.1 Queijo de coalho .....	20
4.1.1 Processos de fabricação do queijo de coalho artesanal e industrial.....	22
4.1.1.1 Descrição do processamento tipo A.....	23
4.1.1.2 Descrição do processamento tipo B.....	25
4.1.2 Características nutricionais.....	27
4.1.3 Parâmetros de qualidade do queijo de coalho.....	28
4.2 Espectroscopia de Absorção no Infravermelho (IV).....	30
4.3 Quimiometria .....	33
4.3.1 Pré-tratamento de dados espectrais .....	33
4.3.1.1 Correção do Efeito Multiplicativo (MSC).....	33
4.3.1.2 Variação Normal Padrão (SNV).....	34
4.3.1.3 Centrar os dados na média .....	34
4.3.1.4 Derivadas .....	35
4.3.2 Calibração Multivariada .....	36
4.3.2.1 Análise de Componentes Principais (PCA).....	37
4.3.2.2 Regressão por Componentes Principais (PCR).....	39
4.3.2.3 Regressão Linear Múltipla (MLR) .....	39
4.3.2.4 Regressão por Mínimos quadrados parciais (PLS) .....	39
4.4 Seleção de amostras.....	41
4.5 Parâmetros de avaliação dos modelos de calibração .....	42
4.6 Espectroscopia NIR para qualidade de queijos .....	43
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>48</b>

**6.RESULTADOS.....54**

ARTIGO: PREVISÃO DO TEOR DE PROTEÍNAS E LIPÍDIOS DO QUEIJO DE  
COALHO UTILIZANDO A ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO E  
CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA .....54

## 1. INTRODUÇÃO

O queijo é um alimento definitivamente incorporado no cardápio dos brasileiros (CHALITA et al.,2009). Segundo os dados divulgados pela Associação Brasileira das Indústrias de Queijos (ABIQ), em 2011 o país produziu 867 mil toneladas, aumentando a produção em 9,4% com relação a 2010 e ocupa a sexta posição no ranking mundial de produção de queijo (ABIQ, 2015).

No Nordeste brasileiro, destaca-se o queijo de coalho considerado uma iguaria de expressivo consumo, constituindo-se como um bem cultural (MENEZES, 2011).

A tecnologia empregada na produção de queijo de coalho é simples, e ocorre em grande parte em pequenas queijarias. No Brasil, o queijo de coalho é produzido a partir do leite de vaca cru ou pasteurizado. A falta de critérios de qualidade para a matéria-prima e para as técnicas de processamento permitem que produtos de baixa qualidade, tanto do ponto de vista higiênico-sanitário como em relação aos valores nutricionais cheguem ao mercado, desvalorizando o produto final (CAVALCANTE et al.,2007).

O Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade, constante da Instrução Normativa N°30 de 2001 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), estabelece os requisitos mínimos de qualidade que deverão ser cumpridos para que o queijo de coalho possa ser destinado ao consumo humano (BRASIL, 2001).

O controle de qualidade de alimentos é importante, e atua em vários segmentos, desde a matéria-prima, durante o processamento e fabricação até a estocagem do alimento processado. A análise de alimentos conta com métodos convencionais e instrumentais. Os métodos convencionais têm como base os conceitos analíticos clássicos de gravimetria e volumetria. Já os métodos instrumentais são realizados em equipamentos mais sofisticados, com capacidade para gerar uma quantidade relativamente grande de dados analíticos (CECHI,2003).

Entre as técnicas instrumentais destaca-se o uso da espectroscopia na região do infravermelho próximo que aliada à calibração multivariada de dados permite relacionar a informação espectral com parâmetros que traduzem a

composição do alimento (SUBRAMANIAN et al., 2009). Além disso, estes métodos possuem várias vantagens, como custo relativamente reduzido, não utilizam reagentes ou solventes, não geram resíduos, não necessitam de nenhum ou quase nenhum pré-tratamento das amostras, sendo então uma alternativa aos métodos convencionais (CHEN et al.,2009; SUBRAMANIAN et al., 2009; ANDUEZA et al.,2013; GONZALEZ-MARTIN et al.,2014). Nos últimos anos, o uso da espectroscopia na região do infravermelho próximo aliada à calibração multivariada vem sido utilizada com sucesso na determinação de diversos parâmetros, como determinação de umidade, lipídios e proteínas em alguns tipos de queijos, por exemplo, Mussarela (BOTELHO et al., 2013), Emental (KAROUI et al.,2006), queijo Minas (BOTELHO et al., 2013) e queijo ricota (MADALOZZO et al., 2015).

O estudo em questão foi realizado com o objetivo de avaliar a composição de queijo de coalho através dos teores de proteínas e lipídios previstos a partir de modelos obtidos utilizando a Espectroscopia na Região do Infravermelho Próximo associada à calibração multivariada.

## **2. PROBLEMA DE PESQUISA**

Para obter o padrão de identidade e qualidade do queijo de coalho, as análises de lipídios e proteínas são de extrema importância. As mesmas são realizadas, rotineiramente, por métodos convencionais. Essas técnicas demandam tempo na preparação das amostras e na obtenção dos resultados, além de utilizarem diversos reagentes químicos, gerando gastos e resíduos ambientais. O desenvolvimento de uma metodologia robusta, como a Espectroscopia de Infravermelho Próximo aliada à Calibração multivariada poderá ser uma alternativa para otimizar o tempo de execução de análises, além de contribuir na redução de reagentes químicos minimizando os impactos ambientais?

### **3.HIPÓTESE**

Espera-se desenvolver uma metodologia para avaliar a composição do queijo de coalho com relação a parâmetros de caráter nutricional. Considerando que análises de referência apresentam alguns inconvenientes, pretende-se a partir de uma técnica analítica bem estabelecida no controle de qualidade de alimentos (espectroscopia NIR) associada à calibração multivariada, prever o teor de proteínas e lipídios do queijo de coalho.

## 4. REVISÃO DA LITERATURA

### 4.1 Queijo de coalho

O queijo tipo coalho é de origem brasileira, mais especificamente do Nordeste, onde a tecnologia artesanal utiliza leite cru. Com o decorrer do tempo sua fabricação obteve melhoramentos tecnológicos, por questão de higiene o leite passou a ser pasteurizado, sem que fossem comprometidas suas características intrínsecas e funcionais. Atualmente, esse queijo está difundido em todo o país e é encontrado com facilidade em vários estabelecimentos comerciais, tais como, supermercados e feiras (ABIQ, 2015).

Ao reportar sobre a expansão da produção de queijo tipo coalho no Nordeste, Menezes (2011) aponta que foi motivada pelo aumento na produção de leite. Essa produção é beneficiada por indústrias e informalmente pelas pequenas queijarias. Em determinados territórios, esses dois tipos de unidade produtiva apresentam-se lado a lado na disputa do leite.

A produção de queijo tipo coalho tem participação considerável na economia, sendo significativo na renda dos fornecedores de leite (SILVA et al., 2012). Trata-se de um produto de grande valor comercial, devido principalmente a simplicidade da tecnologia de fabricação e elevado rendimento do processo. Sua produção realizada, principalmente por pequenos e médios produtores e propriedades do segmento da agricultura familiar, tem contribuído para o crescimento socioeconômico principalmente do Nordeste do Brasil (SILVA et al., 2010).

De acordo com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo de Coalho constante da Instrução Normativa N°30 de 2001 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), define como “o queijo que se obtém por coagulação do leite por meio do coalho ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não pela ação de bactérias lácteas selecionadas e comercializado normalmente com até dez dias de fabricação”. É também classificado como um queijo de média à alta umidade, de massa semi-cozida ou cozida e apresentando teor de gordura nos sólidos totais variável entre 35% e 60%. Deve apresentar, ainda, as seguintes características sensoriais: consistência elástica, textura compacta e macia, cor branco-amarelado uniforme,

sabor brando, ligeiramente ácido, podendo ser salgado, odor ligeiramente ácido, crosta fina e sem trinca, não sendo usual a formação de casca bem definida e presença de algumas olhaduras pequenas ou sem olhaduras.

Segundo Menezes (2011), a comercialização de queijos de coalho artesanais é realizada de modo informal, por não estar o produto legalizado de acordo com as normas vigentes. O cumprimento das normativas vigentes - Lei 1.283/1950 que dispõe sobre a inspeção industrial e sanitária dos produtos de origem animal - torna-se incompatível aos pequenos produtores, tendo em vista as discordâncias de modelos impostos ao referido grupo. No que se refere à elaboração dessa lei, a política do Estado mirou-se no setor agroexportador, norteadada principalmente pelas exigências do mercado norte-americano não reconhecendo, dessa maneira, a pequena produção. A respeito das exigências dessas normativas, Prezotto (2005) esclarece:

*“O modelo de inspeção previsto nesta legislação convencional segue uma filosofia de controle de qualidade vinculada essencialmente à grande estrutura física dos estabelecimentos. Neste sentido, ela atua com um caráter rigoroso em relação às exigências em grandes instalações e equipamentos, o que implica ‘pesados’ investimentos para implantação de agroindústrias”.*

No fim da década de 1990, despertou-se a necessidade da legalização de queijos de coalho artesanais, devido às vendas expressivas na comercialização destes produtos visando à garantia da segurança alimentar (MORENO, 2013).

Alguns Estados do país criaram legislações estaduais originadas por iniciativa do poder político e, ou como consequência de pressões sociais, principalmente das organizações dos agricultores familiares. Esse movimento ocorreu visto que o queijo disputa o mercado e mantém uma imagem territorial, alimentando os vínculos em nível simbólico das características e de práticas culturais e regionais (MENEZES, 2011).

Na região Nordeste, destaca-se o caso de Pernambuco, em 19 de dezembro de 2007, a Assembleia Legislativa do Estado de Pernambuco aprovou a Lei nº13.376 que dispõe sobre o processo de produção de queijo tipo coalho. Este regulamento permite que seja produzido queijo coalho utilizando leite cru, sendo sua qualidade assegurada por meio do Certificado de Registro do Estabelecimento e Registro do Produto, emitida pela Agência de Defesa e Fiscalização Agropecuária de Pernambuco – ADAGRO (PERNAMBUCO, 2007).

No dia 21 de dezembro de 2015 foi aprovada a Lei nº15.695, a qual altera o artigo 1º da Lei anterior, tendo como definição do queijo artesanal “É considerado queijo de coalho artesanal o queijo produzido no Estado de Pernambuco, a partir do leite cru integral fresco, obtido da ordenha sem interrupção de bovinos, bubalinos ou caprinos descansados, bem nutridos e com saúde, beneficiado em propriedade de origem ou de grupo de propriedades com mesmo nível higiênico-sanitário, seguindo o processo de fabricação tradicional” (PERNAMBUCO, 2015).

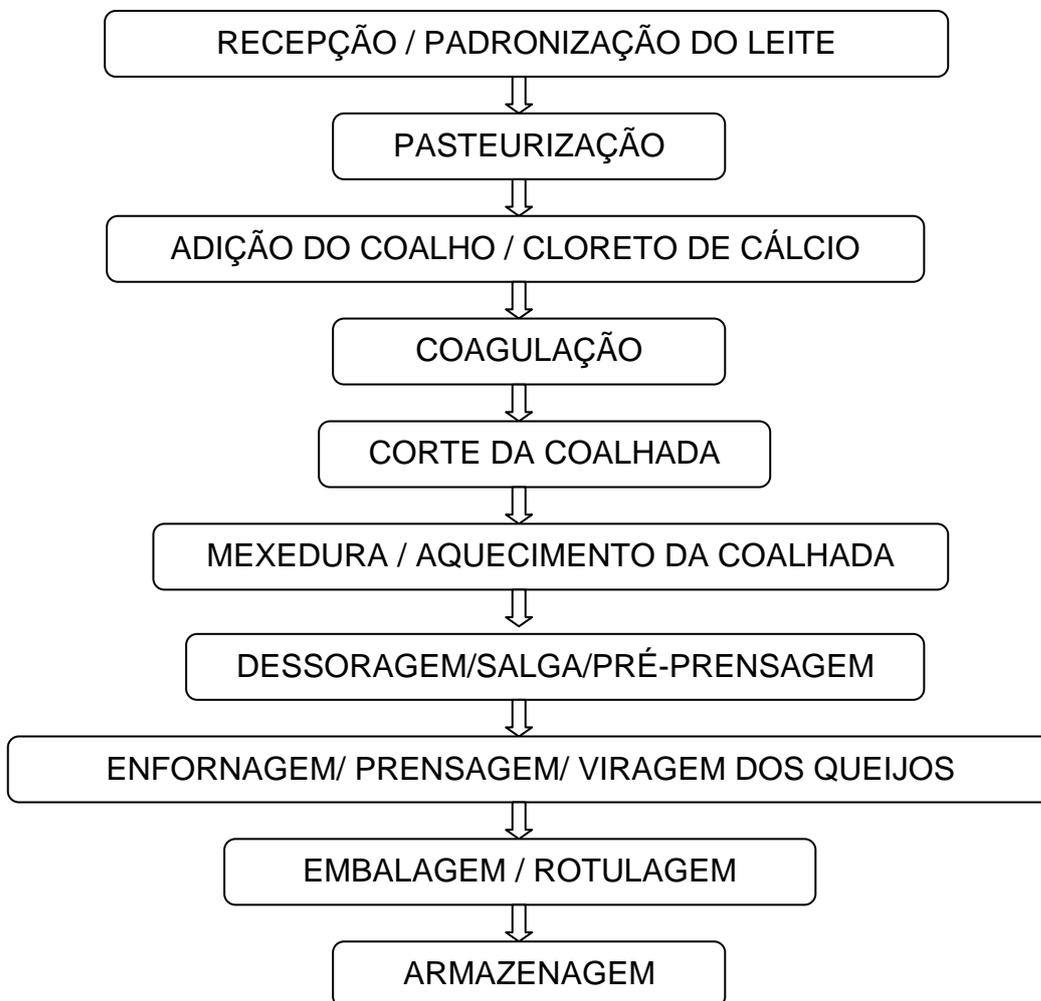
A legislação sobre Inspeção e Fiscalização Agropecuária classifica o queijo artesanal como tipo B: produzido com leite cru, integral ou desnatado, massa crua prensada ou não, maturado; o tipo A: produzido com leite pasteurizado, integral ou desnatado, massa crua prensada (PERNAMBUCO, 1999).

#### 4.1.1 Processos de fabricação do queijo de coalho artesanal e industrial

O processo de fabricação do queijo de coalho é relativamente fácil e de baixo custo. Nas Figuras 1 e 2 pode-se observar as etapas de processamento do queijo de coalho tipo A e B, respectivamente.

#### 4.1.1.1 Descrição do processamento tipo A

**Figura 1** - Fluxograma do processamento de queijo de coalho tipo A



FONTE: SILVA et al., 2012

- Recepção e padronização do leite: o leite deverá ser padronizado para um teor de gordura entre 2,8 e 3,0%. Deverá apresentar acidez máxima de 17°Dornic (0,1grama de ácido láctico por Litro de leite) a fim de avaliar a resistência térmica do leite, visto que em desequilíbrio de pH pode reduzir a estabilidade das micelas da caseína, provocando coagulação e formação de grumos no leite, alterando a consistência do produto final.

- Pasteurização: O tipo de pasteurização utilizada pelos laticínios na fabricação desse produto pode ser rápida ou lenta. Em seguida, o leite deverá ser mantido à

temperatura de 35 a 36°C para que ocorra adição dos ingredientes.

- Adição do coalho e cloreto de cálcio: o coalho deverá ser adicionado na quantidade recomendada pelo fabricante, dissolvido em água. O cloreto de cálcio em solução a 50%, na quantidade de 40 a 50 mL para cada 100 litros de leite. O mesmo deverá ser dissolvido em água não clorada.

- Coagulação: decorrido o período de 40 a 50 minutos da adição dos ingredientes, observa-se o ponto da coalhada que deverá se apresentar com aspecto firme e brilhante. Para isso, realiza-se o teste que consiste em introduzir uma espátula na coalhada (massa coagulada), ao retirá-la, ela deverá estar limpa, momento em que se observa uma fina película de soro sobre a coalhada.

- Corte da coalhada: deverá ser realizado lentamente com o uso de liras, cortando no sentido horizontal e vertical, o que deixa a coalhada em forma de cubos com tamanho médio de 1,5 a 2,0 cm. Essa etapa é muito importante na textura e no rendimento do queijo.

- Mexedura e aquecimento da coalhada: após o corte, um soro límpido vai sendo liberado, neste momento inicia-se a mexedura da massa com o auxílio dos mexedores (paletas ou espátulas) em movimentos lentos, aumentando o ritmo gradativamente para evitar ao máximo a quebra dos “cubos da coalhada”. A duração da mexedura se dá por um período de 10 a 15 minutos com intervalos a cada 5 minutos, durante esse procedimento observa-se que o soro vai subindo e cobrindo a coalhada.

- Dessoragem, salga e pré-prensagem: a dessoragem consiste na separação do soro e da coalhada, agora chamada de massa do queijo. Para isso, é necessário que se retire 90% do soro até a massa aparecer na superfície. Nesse momento, pode ser realizada a salga da massa. A quantidade de sal recomendada a ser adicionada é de 1,2 a 1,5% de sal sob o volume de leite inicial. O preparo da salga consiste em diluir o sal em uma parte do soro retirada durante a dessoragem ou em água e depois aquecer essa mistura a uma temperatura de 75°C. Em seguida, deixa-se a massa em salga por um período de 15 minutos e após esse tempo retira-se o excesso de soro para depois realizar a pré-

prensagem. A pré-prensagem consiste em direcionar a massa para o lado contrário à abertura do tanque (saída) para o escoamento do soro.

- Enfornagem, prensagem e viragem do queijo: após a pré-prensagem, realizam-se cortes na massa em formato retangulares no tamanho das fôrmas que serão utilizadas. A seguir, coloca-se a massa nas fôrmas que podem ser de material à base de polietileno ou inox. Forradas com um tecido de *nylon* (dessoradores) que auxiliam no processo da saída do soro retido na massa que serão empilhadas na prensa pneumática, em filas de até 12 fôrmas sobrepostas. Quando a prensa é manual (empilhar até 12 fôrmas sobrepostas), coloca-se um peso de aproximadamente 15 kg na última fôrma e deixa prensando por volta de 2 a 3 horas. Vale salientar que durante o período de prensagem é realizada uma viragem da massa do queijo na própria forma onde está sendo prensada.

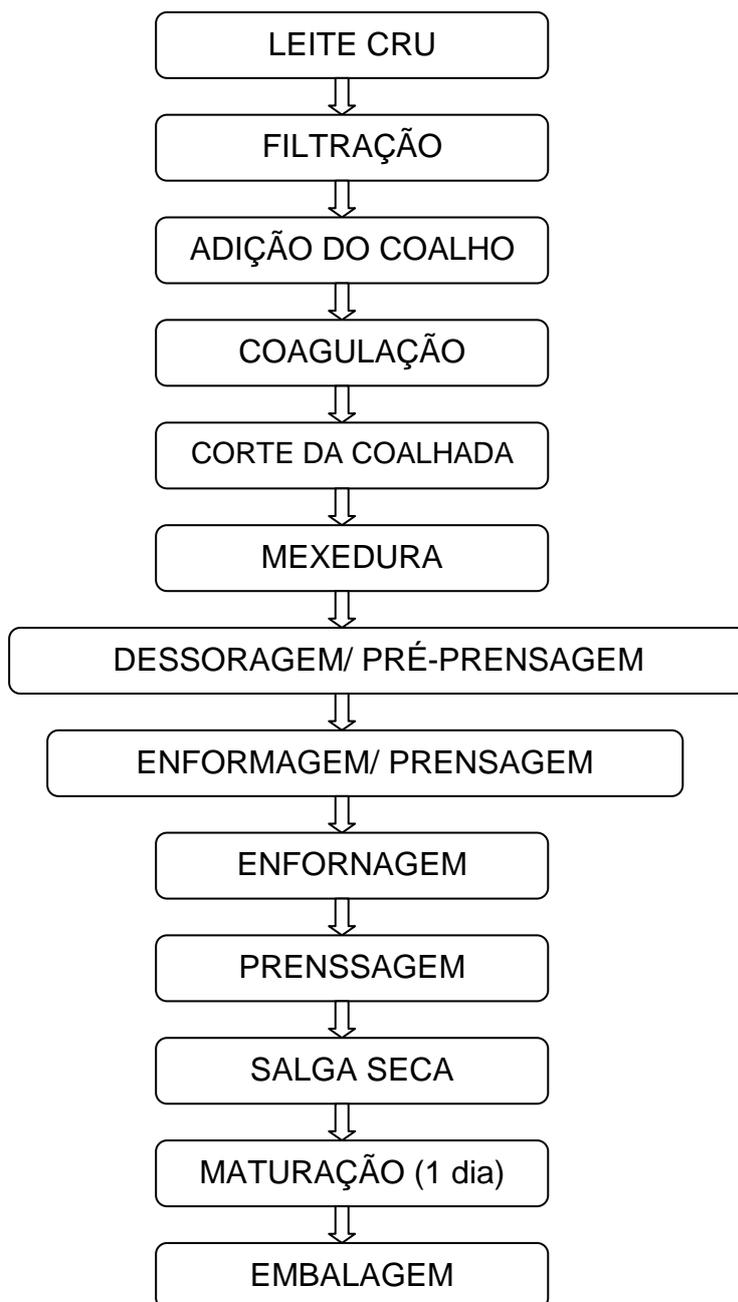
- Embalagem, rotulagem e armazenamento: decorrido o período de prensagem, os queijos são desenformados. Em seguida, realiza-se a toailete, processo que consiste em corrigir os defeitos de formato, ele é realizado apenas com o uso de faca. Após essa etapa, o queijo deve ser embalado à vácuo, rotulado e pesado. A embalagem deve conter data de fabricação, validade, indicação no rótulo dos ingredientes usados no produto, nome do laticínio, dados cadastrais junto à receita federal e selo de inspeção federal ou municipal. Esse produto deve ser conduzido para a câmara fria e mantido à uma temperatura de 7 a 10°C por 24 horas, tempo necessário para maturação. Passado esse período de maturação, o queijo já pode ser distribuído ao comércio, onde terá uma vida de prateleira de 25 a 30 dias sob temperatura de 7 a 10°C (SILVA et al., 2012). .

#### 4.1.1.2 Descrição do processamento tipo B

A produção do queijo coalho artesanal em Pernambuco deve ser feita em queijaria núcleo, que receba o leite dos produtores e fique responsável pelo controle sanitário de seus rebanhos, bem como pelas análises exigidas na Lei nº 14.933/2013 e nos demais regulamentos pertinentes. A queijaria deve ter capacidade de armazenamento e dispor de água para as condições higiênico-sanitárias específicas, necessárias ao processamento da matéria-prima, limpeza

e higienização de utensílios, equipamentos e instalações. São obrigatórios, para comercialização do queijo de coalho artesanal em Pernambuco, o certificado do registro do estabelecimento e o certificado do registro do produto fornecido pela ADAGRO (PERNAMBUCO, 2013).

**Figura 2** - Fluxograma do processamento de queijo coalho tipo B no Estado de Pernambuco



FONTE: Legislação estadual nº 14.933/2013; CAVALCANTE,2005

- Matéria-prima: devem ser utilizados como ingrediente obrigatório o leite cru integral fresco ou leite desnatado (PERNAMBUCO, 2013).
- Filtração: realizada em tecido de pano limpo, submetido à desinfecção por calor (água fervente) (CAVALCANTE, 2005).
- Adição do coalho: deve ser utilizado como ingrediente obrigatório permitido em ato normativo da Gerência Geral da Agência de Defesa e Fiscalização Agropecuária de Pernambuco – ADAGRO (PERNAMBUCO, 2013).
- Coagulação: período de 40 a 60 minutos, observa-se o ponto da coalhada que deverá se apresentar com aspecto firme e brilhante.
- Corte da coalhada: ao atingir o ponto de massa é mexida lentamente com auxílio de liras, cortando no sentido horizontal e vertical.
- Mexedura: se dá por um período de 10 a 15 minutos com intervalos a cada 5 minutos, durante esse procedimento observa-se que o soro vai subindo e cobrindo a coalhada ).
- Dessoragem: consiste na separação do soro da coalhada (chamada de massa).
- Enformagem: são utilizadas fôrmas retangulares ou cilíndricas preferencialmente revestidas de material plástico.
- Prensagem: é efetuada com o objetivo de liberar soro da massa.
- Salga seca: acréscimo de sal.
- Maturação: deve ser realizada em local limpo, fresco com proteção contra insetos. Normalmente, é realizada em temperatura ambiente por um dia, enquanto ocorre a liberação de soro do queijo
- Embalagem: deve conter data de fabricação, validade, nome do laticínio, dados cadastrais junto à receita federal e selo de inspeção federal ou municipal. A embalagem deve ser de material plástico (polietileno) (CAVALCANTE, 2005).

#### 4.1.2 Características nutricionais

Do ponto de vista nutricional, o queijo coalho é um concentrado lácteo constituído de proteínas, lipídios, sais minerais, principalmente cálcio, fósforo e vitaminas, entre elas A e Complexo B (PERRY, 2004).

A composição nutricional do queijo depende, em grande parte, do leite e da tecnologia empregada e do tipo do queijo. Na Europa, a concentração de lipídios é colocada com destaque no rótulo, por se tratar de um indicativo de qualidade, sendo que alguns tipos de queijo são obrigados a apresentarem um teor mínimo de gordura, pois a sua retirada afeta muito o sabor, o aroma e a consistência do queijo. A maioria dos queijos destaca-se pelo teor relevante de proteínas (26%), gorduras (33%), sais minerais (1,0%), principalmente cálcio, fósforo, sódio, potássio e vitaminas B2, B6, B12, D e, principalmente, vitamina A (LEANDRO, 2008).

Segundo Pereda (2005), o teor de aminoácidos essenciais associado às proteínas do queijo de coalho confere um alto valor biológico, ou seja, as proteínas são consideradas completas, contendo os aminoácidos essenciais. Além disso, o queijo é uma excelente fonte de cálcio, no entanto o teor de cálcio depende da umidade e da técnica de fabricação do queijo. O queijo fresco tem teores mais baixos. A absorção do cálcio a partir da ingestão do queijo é semelhante a do leite, aproximadamente 33%.

Silva e colaboradores (2012) avaliaram o queijo de coalho como alimento funcional a partir dos perfis peptídicos e antioxidantes. Os peptídeos tiveram alta atividade no que se refere às propriedades bioativas analisadas. Embora seja difícil comparar a capacidade antioxidante com os dados da literatura, devido à diversidade de metodologias utilizadas, o estudo concluiu que se trata de uma fonte potencial de peptídeos antioxidantes podendo então ser considerado um alimento funcional.

#### 4.1.3 Parâmetros de qualidade do queijo de coalho

O controle de qualidade físico-químico de queijos envolve a determinação de macroconstituintes, como gorduras e proteínas, utilizando-se metodologias padrão, reconhecidas pela Instrução Normativa N° 68/2006. Esta Normativa indica para determinação de lipídios em queijos, o Método Butirométrico de Gerber e para determinação de Nitrogênio total, o Método de Kjeldahl. Tais determinações fazem parte do monitoramento rotineiro em indústrias de produtos lácteos,

principalmente para assegurar o cumprimento de padrões relacionados com a identidade e qualidade do referido produto (BRASIL, 2006).

A determinação de nitrogênio total pelo Método de Kjeldhal, de acordo com Association of Official Analytical Chemists (A.O.A.C, 1995), fundamenta-se na conversão do nitrogênio da amostra em sulfato de amônio, através da digestão com ácido sulfúrico. O nitrogênio presente na solução ácida é determinado por destilação por arraste de vapor, seguida de titulação. Para expressar os resultados em percentual de proteínas, multiplica-se a porcentagem do nitrogênio total por um fator de conversão, que no caso de produtos lácteos o fator é 6,38.

O teor de lipídios pelo Método de Gerber, segundo procedimentos descritos na Instrução Normativa nº68 de 2006, baseia-se no tratamento da amostra com ácido sulfúrico e álcool isoamílico. O ácido digere as proteínas ligadas à gordura, diminuindo a viscosidade do meio, aumentando a densidade da fase aquosa e fundindo a gordura devido à liberação do calor proveniente da reação, favorecendo, portanto, a separação do lipídio pelo álcool isoamílico. A mistura é submetida à centrifugação por 10 minutos a uma rotação de 1200 rpm. A leitura (em porcentagem) é feita na escala graduada do butirômetro de Van Gulik específico para queijos (BRASIL, 2006).

Santos e colaboradores (2011) pesquisaram a caracterização físico-química e sensorial do queijo de coalho produzido com mistura de leite de vaca e cabra e fizeram uso dos métodos de Gerber para determinação de lipídios e Kjeldahl para nitrogênio total de acordo com a Normativa N° 68/2006.

De maneira geral, observa-se que os métodos oficiais apresentam diversos inconvenientes tais como, o uso de reagentes, geração de resíduos e procedimentos demorados de análises que a exemplo da determinação de nitrogênio total pelo método kjeldahl, envolve várias etapas elevando o tempo de análises(GELADI, 2003).

Exigências de qualidade nos alimentos têm levado a indústria alimentícia a optar por técnicas de análises robustas capazes de realizar análises quantitativas de alimentos, possibilitando o monitoramento em tempo real de processos e produtos. A Espectroscopia de infravermelho próximo é uma das mais favorecidas técnicas para o monitoramento da qualidade industrial devido a atuação em análises quantitativas e geração de resultados confiáveis. Neste sentido, a

espectroscopia de infravermelho próximo tem sido aplicada com êxito em diversos estudos referentes a análises quantitativas em alimentos, como por exemplo, a determinação de proteínas e gordura em queijo ricota (MADALOZZO et al., 2015).

#### 4.2 Espectroscopia de Absorção no Infravermelho (IV)

A radiação infravermelha foi descoberta em 1800 por William Herchel, um astrônomo inglês de origem alemã. Herschel colocou um termômetro de mercúrio no espectro obtido por um prisma de cristal com o a finalidade de medir o calor emitido por cada cor. Constatou que a temperatura continuava aumentando além do espectro vermelho da luz visível, referindo-se a esta região como "raios caloríficos". Esta região foi posteriormente denominada de infravermelho (PASQUINI, 2003).

A espectroscopia no infravermelho é um tipo de espectroscopia vibracional que emprega radiação eletromagnética na faixa de  $12.800\text{ cm}^{-1}$  a  $10\text{ cm}^{-1}$ , que em comprimentos de onda corresponde à região entre 780 e 1.000.000 nm. Esta parte do espectro está situada entre o visível e as micro-ondas e, em geral é dividido em três regiões denominadas Infravermelho próximo (Near Infrared - NIR), infravermelho médio (Middle infrared – MIR) e infravermelho distante (Far Infrared – FAR), (SKOOG, et al.,2009). Os intervalos estão apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1** - Intervalos das regiões do infravermelho

Região	Comprimento de onda ( $\lambda$ ) nm	Número de onda ( $\nu$ ) $\text{cm}^{-1}$
NIR	780 -2.500	12.800-4.000
MIR	2.500-50.000	4.000-200
FAR	50.000-1.000.000	200-10

FONTE: SKOOG, et al.,2009

A energia do fóton incidente deve ser idêntica à diferença de energia entre dois níveis vibracionais para que ocorra absorção da radiação IV. Entretanto, este critério não é suficiente, é também necessário que o campo elétrico oscilante da radiação incidente possa interagir com a molécula. Isto só pode acontecer se o deslocamento dos átomos na vibração produzir uma mudança no momento de

dipolo da molécula (SOUZA et al.,2013). Dessa forma, moléculas homonucleares ( $O_2$ ,  $N_2$ ,  $Cl_2$ ) não absorvem radiação IV, diferente das heteronucleares (HCl, CO) que são ativas na região IV (SKOOG *et al.* 2009).

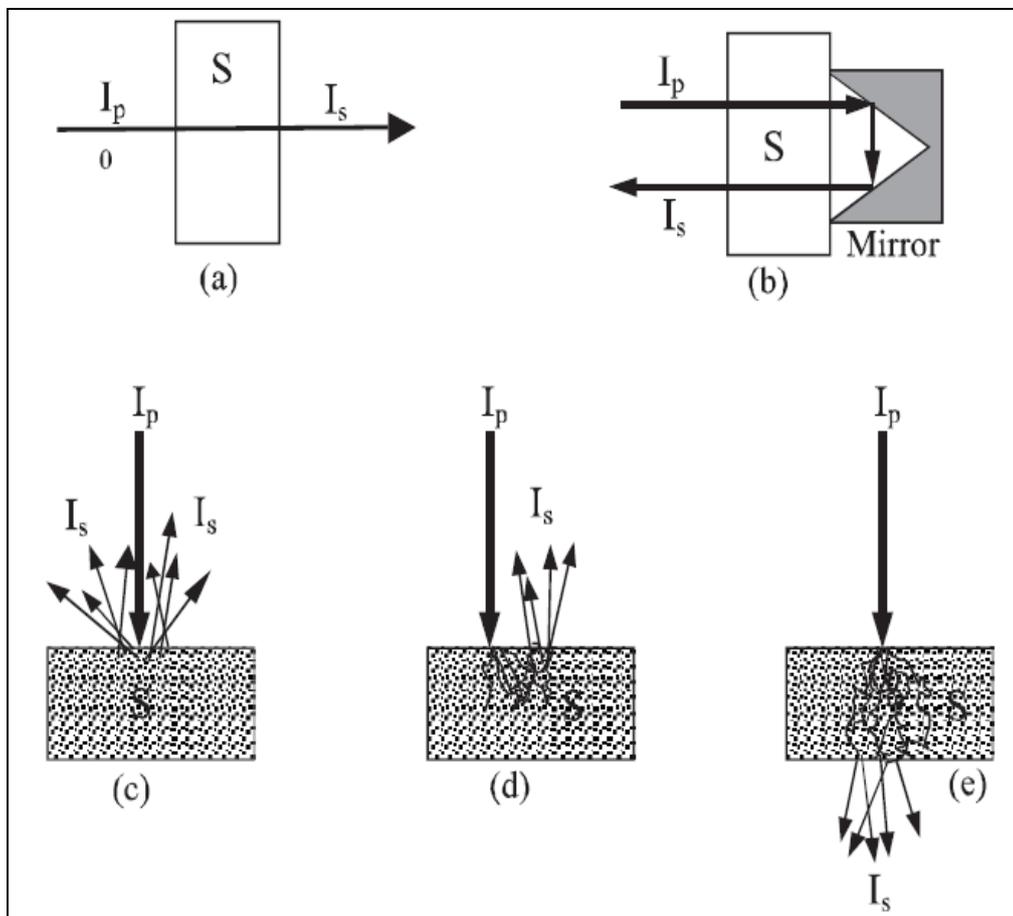
A região do infravermelho médio (MIR) é muito utilizada na química orgânica e na bioquímica para análise qualitativa. Nesta região as bandas intensas, devidas a transições vibracionais fundamentais são bem definidas permitem a interpretação dos espectros e a elucidação de estruturas químicas (SKOOG *et al.* 2009).

Na região espectral do infravermelho próximo (NIR), as bandas de absorção são em geral devido a sobretons ou combinações de vibrações fundamentais. Envolvem normalmente as ligações C-H, N-H, O-H e S-H com bandas menos intensas e mais sobrepostas que na região MIR. A espectroscopia NIR também é usada em determinações quantitativas para espécies como água, proteínas, hidrocarbonetos de baixo peso molecular e gorduras em produtos agrícolas e alimentícios, além de várias aplicações nas indústrias petroquímicas e químicas (SKOOG *et al.* 2009).

A instrumentação necessária para medidas na região NIR são, em geral, de menor custo e robusta que na região MIR, e muitas vezes sem partes móveis e com fontes de radiação simples, semelhante à utilizada na espectroscopia de absorção UV-Vis. De acordo com a tecnologia utilizada na seleção de comprimentos de onda, podemos classificar em instrumentos portáteis que utilizam LED's como fonte de radiação, dispersivos e interferométricos (Transformada de Fourier). Os espectrômetros com Transformada de Fourier apresentam como vantagem maior reprodutibilidade no comprimento de onda e razão sinal/ruído (PASQUINI, 2003).

As medidas podem ser obtidas por transmitância, transflectância, reflectância difusa, interactância e transmitância através de um meio com espalhamento, sendo as três últimas utilizadas na análise de sólidos como mostra a Figura 3 (PASQUINI, 2003).

**Figura 3** - Modos de medida utilizando a região NIR: (a) transmitância, (b) transfectância, (c) reflectância difusa, (d) interactância, (e) transmitância através de um meio com espalhamento.



FONTE: PASQUINI, 2003

As medidas de amostras sólidas por reflectância difusa são comuns em muitas aplicações. Quando uma amostra é irradiada, a radiação penetra na camada superficial das partículas, excita os modos vibracionais da molécula e é espalhada em todas as direções. O espectro de reflectância assim produzido depende da composição da amostra. Em geral é utilizado o logaritmo do inverso da reflectância  $R$ , sendo  $R$  a relação entre as intensidades de radiação refletida pela amostra e por um padrão de referência, o qual se pode assumir que apresenta comportamento linear com a concentração da substância em análise (SKOOG *et al*, 2009).

### 4.3 Quimiometria

O sucesso da espectroscopia NIR em especial para determinações quantitativas se deve ao uso de métodos quimiométricos. A quimiometria envolve a aplicação de métodos matemáticos e estatísticos a fim de interpretar, classificar e fazer previsão de conjuntos de dados de interesse químico. Dentre as diversas subáreas da quimiometria pode-se destacar a calibração multivariada (SOUSA;POPPI, 2012). Dentro da quimiometria, a calibração multivariada ganhou ênfase para o tratamento de dados espectrais, para tanto estes dados devem pré-tratados, pois sofrem várias interferências. À medida que aumenta a complexidade do sistema em estudo (composição, heterogeneidade das amostras, etc) os espectros NIR são influenciados por efeitos que não podem ser facilmente quantificados (SIESLER et al., 2002), dentre os quais pode-se citar as variações sistemáticas que não estão relacionadas com as variáveis a modelar como por exemplo, a dispersão de luz em amostras sólidas e deslocamento de linha de base dos espectros. Diante disso, tem-se a necessidade de realizar um pré-tratamento de dados espectrais (SOTELO, 2006).

#### 4.3.1 Pré-tratamento de dados espectrais

O pré-processamento de dados espectrais é uma etapa fundamental para o sucesso da análise multivariada. As diferentes técnicas permitem eliminar informações que não são importantes do ponto de vista químico e permitem tornar a matriz de dados melhor condicionada para análise posterior (RINNAN et al., 2009). Entre os principais pré-tratamentos de dados, pode-se citar a Correção do Efeito Multiplicativo (MSC), Variação Normal Padrão (SNV), Centralização na média e Derivadas.

##### 4.3.1.1 Correção do Efeito Multiplicativo (MSC)

Em medidas de reflectância os efeitos físicos são frequentes promovendo deslocamentos da linha de base, sendo necessário pré-processar para eliminá-los. Um dos mais utilizados é a correção do efeito multiplicativo (Multiplicative

Scatter Correction - MSC) que admite que cada espectro é determinado pelas características químicas da amostra somadas às características físicas indesejadas, sendo possível separar estes dois sinais. Este método tenta remover o efeito do espalhamento pela linearização de cada espectro por um espectro ideal. Para efeito de cálculo, em geral se considera o espectro ideal como sendo o espectro médio do conjunto de dados onde se deseja realizar a correção da linha base. Em seguida, utiliza-se uma regressão linear para calcular o coeficiente angular e linear do gráfico entre o espectro ideal e o espectro que vai ser corrigido (BEEBE et al,1998;; SOUSA; POPPI, 2009; RINNAN et al., 2009), conforme a Equação 1 (FERRÃO, 2000).

$$\bar{x}_i = \beta_0 + \beta_1 x_i \quad (1)$$

Em que  $\bar{x}_i$  significa espectro médio,  $x_i$  cada espectro e,  $\beta_0$  e  $\beta_1$  são os coeficientes de regressão da reta. Os coeficientes obtidos através da Equação 1, serão utilizados para corrigir todos os espectros, conforme Equação 2.

$$X \text{ corrigido} = \beta_0 + \beta_1 x_i \quad (2)$$

#### 4.3.1.2 Variação Normal Padrão (SNV)

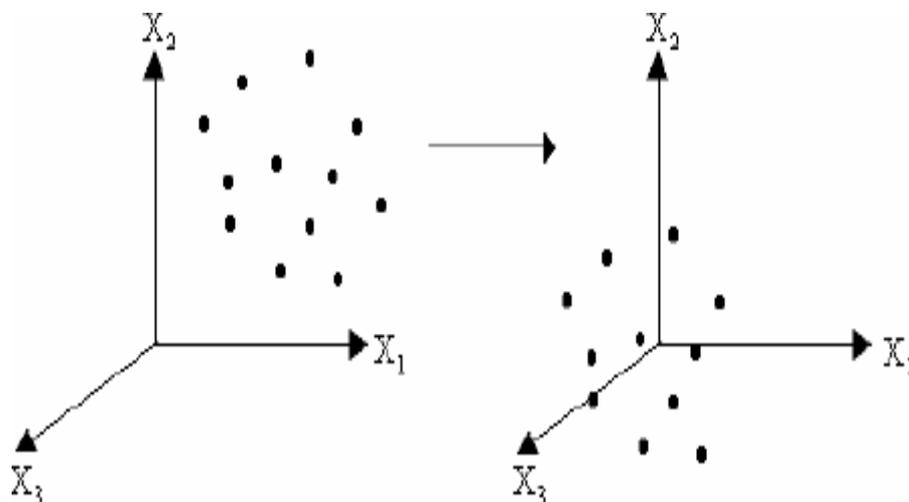
Com o mesmo propósito que MSC, a variação normal padrão (Standard Normal Variate - SNV) opera em cada espectro isoladamente, sem utilizar nenhuma referência associada ao conjunto de dados. Inicialmente para cada espectro, a sua média é subtraída de todos os valores, ou seja, a técnica realiza, inicialmente, uma centralização dos valores de cada espectro. Em seguida, cada um dos valores espectrais centrados é dividido pelo desvio padrão dos valores de seu respectivo espectro (BEEBE et al,1998). Esse método, portanto, padroniza cada espectro utilizando apenas os dados de cada espectro.

#### 4.3.1.3 Centrar os dados na média

Consiste em calcular para cada comprimento de onda da matrix **X** seu valor médio **e** subtrair cada intensidade do valor médio calculado. A partir disso, ocorre mudança do sistema de coordenadas para o centro dos dados (MORGANO,

2005). Na Figura 4 é possível observar uma representação gráfica do efeito da centralização na média sobre um conjunto de dados com 3 variáveis.

**Figura 4** - Representação gráfica da centralização dos dados na média



FONTE: BORIN, 2003

A centralização na média tem como objetivo prevenir que os pontos mais distantes do centro dos dados tenham maior influência que os mais próximos, dando ênfase não a intensidade, mas sim a sua distância do valor médio (TOMAS,1994).

#### 4.3.1.4 Derivadas

A primeira derivada tem como finalidade remover deslocamentos de linha de base e a segunda derivada elimina uma variação linear de linha de base, normalmente devido a efeito de espalhamento (HONORATO, 2007). Um dos métodos mais utilizados foi desenvolvido por Savitzky – Golay que, da mesma forma da Suavização, aplica regressões polinomiais para o cálculo de derivadas de primeira ou segunda ordem. Também é necessário selecionar uma janela de pontos nos quais será aplicada a derivada. Contudo, a principal desvantagem desse processo é que o ruído uma vez presente nos espectros originais pode se tornar acentuado, diminuindo a relação sinal/ruído, por este motivo quando os espectros apresentam regiões ruidosas deve-se realizar algum tipo de

suavização, sendo o mais utilizado para este fim o Savitzky – Golay, como já mencionado (PEDRO, 2004).

#### 4.3.2 Calibração Multivariada

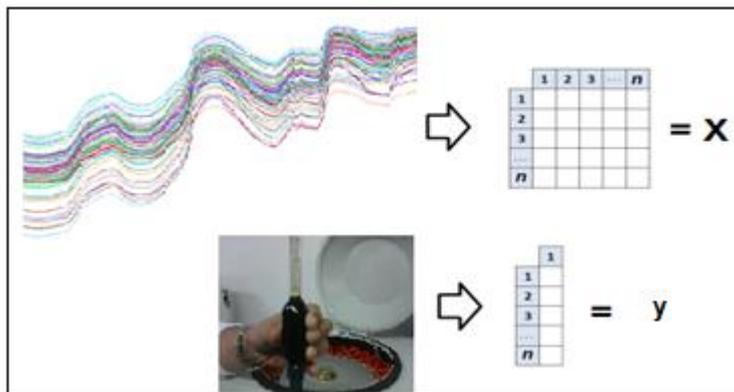
Nas últimas décadas, a calibração multivariada tornou-se um instrumento analítico de grande relevância em diversas áreas de aplicação, especialmente na química dos alimentos, análise farmacêutica e química analítica (FORINA;CASALE; 2007).

Em análises químicas o objetivo em geral é quantificar uma espécie de interesse em determinada amostra, como por exemplo, o teor de lipídios em queijo. Os instrumentos não indicam diretamente o valor da propriedade de interesse como resposta. Neste caso, é necessário estabelecer uma relação matemática que produza o valor da propriedade a partir da resposta instrumental. A esse processo dá-se o nome de Calibração. Uma vez estabelecida essa relação matemática, ela poderá ser utilizada para prever a propriedade de interesse em amostras de composição desconhecida a partir apenas da resposta instrumental. Quando a relação é estabelecida a partir de uma única variável resposta instrumental a calibração é dita univariada, e quando se utiliza mais de uma variável ela é dita multivariada. A calibração multivariada tem como princípio básico a utilização simultânea de muitas variáveis  $x_1, x_2, \dots, x_n$  (como valores de absorvância a vários comprimentos de onda), para quantificar alguma outra variável de interesse  $y$  como concentração (SENA et al., 2000).

A calibração é uma parte do processo analítico de fundamental importância, pois afeta a aplicabilidade, a precisão, a exatidão e o custo global de uma análise (PIMENTEL; NETO, 1996).

O processo de calibração pode ser dividido em três etapas: calibração, validação e previsão. Na calibração multivariada os dados espectrais são organizados na forma de matriz  $\mathbf{X}$ , com dimensão  $n \times m$ , de forma que as linhas representam as amostras e as colunas representam as variáveis (comprimentos ou número de onda no caso de análises espectrais). A propriedade de interesse é representada pelo vetor  $\mathbf{y}$  e possui dimensão  $n$ , conforme Figura 5 (FERREIRA et al, 1999).

**Figura 5** - Representação das matrizes de dados (**X** e **y**) para calibração multivariada



FONTE: AUTOR, 2016

Na etapa de validação, o modelo de calibração desenvolvido é aplicado a um conjunto de amostras que não participaram do desenvolvimento do modelo, sendo os resultados avaliados através de ferramentas estatísticas de diagnóstico. Este procedimento pode ser feito utilizando um conjunto de validação externa ou um conjunto de validação interna (validação cruzada).

Na última etapa, o modelo é aplicado para prever as propriedades de amostras desconhecidas que contenham as mesmas características das amostras do conjunto de calibração. Diferentes modelos de calibração multivariada foram desenvolvidos sendo os mais utilizados a Regressão Linear Múltipla (*Multiple Linear Regression* - MLR), Regressão por Componentes Principais (*Principal Component Regression* - PCR) e Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (*Partial Least Square Regression* – PLS (BEEBE et al., 1998).

#### 4.3.2.1 Análise de Componentes Principais (PCA)

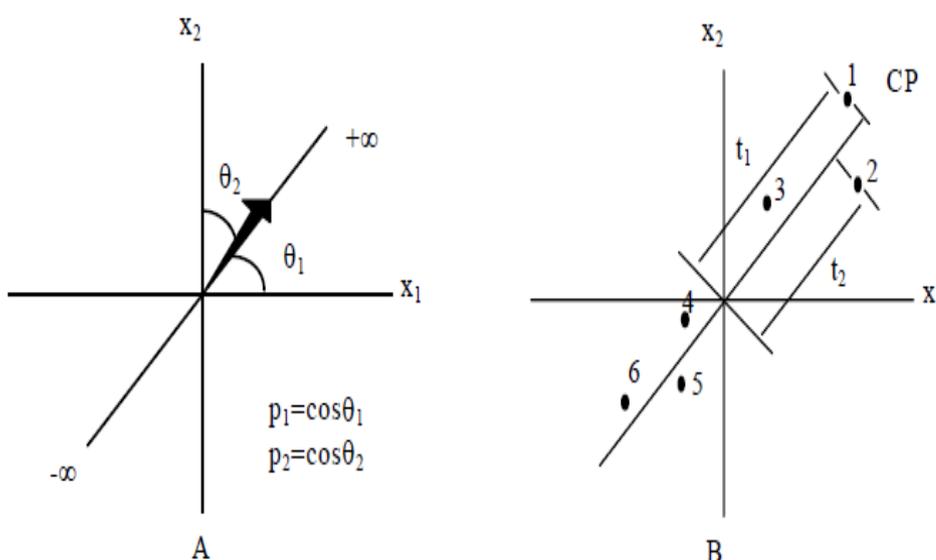
A PCA permite uma redução da dimensionalidade através da representação do conjunto de dados em um novo sistema de eixos, denominados componentes principais (PC), o que permite a visualização da natureza multivariada dos dados em poucas dimensões. Se no espaço original as amostras são pontos localizados em um espaço com  $n$  dimensões ( $n$  sendo o número de variáveis), com a redução de dimensionalidade proporcionada pela PCA, as amostras passam a ser pontos localizados em espaços de dimensões reduzidas

definidos pelas PCs. Matematicamente, na PCA, a **matriz X** é decomposta em um produto de duas matrizes, denominadas escores (T) e pesos (P), mais uma matriz de erros (E), como mostrado na Equação 3:

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP}^T + \mathbf{E} \quad (3)$$

Os escores representam as coordenadas das amostras no novo sistema de eixos formados pelas componentes principais, sendo cada componente principal composta pela combinação linear das variáveis originais, e os coeficientes da combinação são denominados pesos. A primeira componente principal é traçada na direção de maior variabilidade dos dados; a segunda (PC2) é traçada ortogonalmente à primeira, para descrever a maior porcentagem da variação não explicada pela PC1 e assim por diante (BEEBE et al,1998). Uma PCA pode ser observada na Figura 6, onde está representada por seus pesos (**p1** e **p2**), cossenos dos ângulos formados entre os eixos originais e os novos eixos (CP), e em B estão representados os escores (**t1** e **t2**).

**Figura 6** - Representação dos escores no novo sistema de eixos definido pelas PC's.



FONTE: NATALINO, 2006

#### 4.3.2.2 Regressão por Componentes Principais (PCR)

Este método consiste, basicamente em 2 etapas: primeiro, análise de PCA e segundo, regressão linear múltipla entre as variáveis dependentes e as selecionadas pelos Componentes principais, ou seja, PCR utiliza a técnica de análise de componentes principais para a redução da dimensionalidade do conjunto de dados para posterior correlação entre as variáveis, (matriz  $X$ ) e as propriedades de interesse (matriz  $Y$ ) (PANTOJA, 2010).

Como em qualquer regressão múltipla, a escolha do número de variáveis a serem incluídas no modelo é de fundamental importância a fim de evitar a perda de informações relevantes (SILVEIRA, 2014).

#### 4.3.2.3 Regressão Linear Múltipla (MLR)

Na MLR as informações contidas nas variáveis independentes correspondentes a matriz  $X$  são aplicadas diretamente na modelagem para prever a variável dependente (parâmetro de interesse). O parâmetro a ser determinado ( $y$ ) é função linear das respostas instrumentais (matriz  $X$ ), conforme a Equação 4.

$$Y = Xb + e \quad (4)$$

Onde  $b$  é o vetor dos coeficientes lineares de regressão e “e” o vetor dos resíduos.

A MLR apresenta algumas desvantagens, uma delas é que o número de amostras deve ser igual ou superior ao número de variáveis, visto que o modelo consiste na resolução de um sistema de equações lineares simultâneas (JÚNIOR, 2011). Além do mais, as variáveis não podem ser colineares. Esta desvantagem impossibilita o uso da Regressão MLR sem a realização de uma seleção prévia de variáveis a fim de contornar o problema da multicolinearidade dos dados (GOMES, 2012).

#### 4.3.2.4 Regressão por Mínimos quadrados parciais (PLS)

A regressão PLS é considerada o método de regressão mais utilizado para a construção de modelos de calibração multivariada utilizando o infravermelho.

Na regressão PLS as matrizes  $X$  e  $Y$  são decompostas de acordo com as equações 5 e 6:

$$X = T P^T + E \quad (5)$$

$$Y = U Q^T + F \quad (6)$$

Onde,  $P$  e  $Q$  são os pesos de  $X$  e  $Y$ , respectivamente;  $T$  e  $U$  são os escores de  $X$  e  $Y$ , respectivamente e  $E$  e  $F$  representam as matrizes de resíduos de  $X$  e  $Y$ , respectivamente. Matematicamente, os valores dos escores nas matrizes  $T$  e  $U$  são modificados até que o melhor modelo linear seja estabelecido entre eles, ou seja, a maior covariância entre  $X$  e  $Y$  seja alcançada. Para tanto, através de um processo iterativo, uma série de etapas são repetidas para cada componente principal estimada, o que leva a um compromisso entre a explicação da variância em  $X$  e a obtenção da maior correlação com  $Y$  (BEEBE et al,1998; SOUSA et al, 2013).

O desempenho do método depende das variáveis selecionadas para a construção do modelo de calibração. No PLS é comumente utilizado o termo “Variável latente” para designar as PCs. A construção das variáveis latentes é feita a partir das informações contidas no vetor das variáveis dependentes. O quantitativo destas variáveis pode ser determinado durante o processo de Validação Cruzada que em geral é determinado pelo método conhecido como *leave-one-out*. Neste procedimento, uma amostra (espectro) do conjunto de calibração é deixada de fora, um modelo é construído com as demais e é realizada a previsão da propriedade de interesse para esta amostra empregando um número crescente de variáveis latentes. Este processo é repetido para todas as amostras e um erro médio é calculado para cada número de variáveis latentes. O número de variáveis latentes a ser utilizado no cálculo do modelo é aquele a partir do qual não existe variação apreciável no valor do erro médio calculado (BEEBE et al,1998).

Uma estratégia que pode se adotar na calibração tem como fundamento utilizar informação relevante presente em diferentes regiões espectrais específicas. O iPLS é um algoritmo iterativo que calcula modelos de regressão PLS locais em subintervalos obtidos pela divisão da faixa espectral total em

intervalos iguais identificando as regiões mais importantes para o objetivo do modelo. A capacidade preditiva dos modelos locais em relação ao modelo global obtido considerando todo o espectro é comparada com base no valor do erro médio quadrático de validação cruzada (BEEBE et al,1998).

Diante do exposto, no desenvolvimento de um modelo de calibração multivariada a primeira etapa consiste na aquisição de respostas instrumentais para uma série de amostras ditas de calibração, no qual o valor da propriedade de interesse é conhecido, determinado previamente por um método de referência. Essas amostras devem representar a variabilidade da propriedade a ser modelada. As respostas instrumentais para as amostras de calibração e os valores de referência das propriedades de interesse são arranjadas na forma de matriz,  $X$  e  $Y$ , respectivamente, como já mencionado (BRAGA; POPPI, 2004).

#### 4.4 Seleção de amostras

Existem diferentes estratégias para seleção das amostras que irão compor os conjuntos de calibração e previsão. Um algoritmo clássico é o proposto por Kennard–Stone que, para selecionar um subconjunto de amostras representativas a partir de um conjunto contendo  $N$  amostras, consideram a distância entre elas (KENNARD e STONE, 1969). Para tanto, a seleção é feita a partir da distância Euclidiana máxima entre os vetores das respostas instrumentais ( $X$ ) das amostras selecionadas. Inicialmente, um par de amostras é selecionado pela maior distância, em seguida o algoritmo KS seleciona outra amostra que tenha a maior distância mínima em relação a uma amostra já selecionada. Para fins de calibração multivariada, o algoritmo KSXY (*Sample set Partitioning based on joint X-y distances*) (GALVÃO et al., 2005), que é uma extensão do algoritmo KS, também pode ser utilizado. Nesse caso, para a seleção das amostras de calibração e validação, o algoritmo considera tanto as diferenças em  $X$  quanto as diferenças e  $y$  (propriedade de interesse).

Com as matrizes organizadas a regressão é efetuada e um modelo de calibração é estabelecido e validado. A próxima etapa consiste em aplicar o modelo para prever as propriedades modeladas em amostras desconhecidas (ANDRADE et al., 2008).

#### 4.5 Parâmetros de avaliação dos modelos de calibração

O desempenho dos modelos multivariados pode ser avaliado a partir de diferentes parâmetros. Dentre eles, a raiz quadrada dos erros médios quadráticos (*Root Mean Square Error* - RMSE), os valores de tendência (*Bias*) e o coeficiente de determinação ( $R^2$ ).

O valor numérico da raiz quadrada dos erros médios quadráticos (RMSE) permite avaliar a dispersão média dos valores previstos com relação aos valores de referência para o parâmetro de interesse. O cálculo é feito de acordo com a Equação 7:

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum (Y_p - Y_r)^2}{N}} \quad (7)$$

Onde  $y_p$  é o valor previsto,  $y_r$  é o valor real e  $N$  é o número de graus de liberdade.

Na etapa de calibração, a raiz dos erros médios quadráticos é denominada de RMSEC (*Root Mean Square Error of Calibration*); para a etapa de validação cruzada RMSECV (*Root Mean Square Error of Cross Validation*), e para a etapa de teste com amostras desconhecidas RMSEP (*Root Mean Square Error of Prediction*) (BEEBE et al, 1998; ROCHA, 2009; SAUER, 2007).

Os valores previstos para essas amostras devem concordar com os valores de referência. Nessa condição, em um gráfico contendo estas duas grandezas, os valores das amostras devem estar próximos a uma reta com inclinação de  $45^\circ$ , intercepto próximo à zero (*Bias*) e inclinação próxima à unidade.

O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) mede a qualidade de ajuste de uma linha de regressão, ou seja, é uma medida de ajustamento de um modelo em relação aos valores observados. O valor de  $R^2$  varia entre 0 e 1 indicando o quanto o modelo consegue explicar os valores observados. Dessa forma, quanto mais próximo de 1, mais explicativo é o modelo e melhor ele se ajusta às respostas (BEEBE et al, 1998).

#### 4.6 Espectroscopia NIR para qualidade de queijos

O setor de produtos alimentícios tem se beneficiado da potencialidade da espectroscopia NIR (GORI et al.,2011). Na indústria de laticínios, tanto a espectroscopia NIR quanto a espectroscopia na região do infravermelho médio (MIR) foram testados com o objetivo de determinar o seu potencial na aquisição de informações sobre o monitoramento do processo, determinação de qualidade e adulteração de produtos lácteos tais como o leite, manteiga e queijo. O foco está na análise de macromoléculas, porém recentemente, características sensoriais tem sido o centro de investigação para prever a qualidade do queijo para o uso prático na indústria de laticínios (KRAGGERUD et al.,2014). Apesar da baixa sensibilidade é possível utilizar os sinais para determinar a concentração dos principais constituintes de produtos lácteos, como água e os macronutrientes: proteínas, lipídios e carboidratos. Em especial, NIRS é mais usada do que a Espectroscopia MIR na determinação da composição do queijo (OCA et al.,2012).

As características sensoriais do queijo também são muito importantes e dependem de vários fatores como, por exemplo, composição do leite, processo de fabricação de queijos e processos bioquímicos tais como proteólise, glicólise e lipólise . A Espectroscopia NIR associada à calibração multivariada também tem sido utilizada para avaliar diferentes atributos sensoriais de queijo (KRAGGERUD et al., 2014; GONZÁLEZ-MARTIN et al., 2014).

Karoui e colaboradores (2006) avaliaram o potencial do NIRS para a predição dos teores de lipídios, proteínas, cloreto de sódio e pH em queijos Emental produzidos na Europa, sendo 85 amostras de cinco países Europeus (Áustria, Finlândia, Alemanha, Suíça e França). Para cada amostra 3 espectros foram registrados com resolução espectral de 2,5 nm e modo reflectância difusa. Os espectros passaram pelo pré-processamento de Normalização e primeira Derivada Savitzky-Golay para proteínas e pH e Normalização e Suavização para gorduras e Cloreto de Sódio. Encontraram valores de RMSEP de 3,93%, 0,54% e 2,27% para lipídios, proteínas e cloreto de sódio, respectivamente. Os coeficientes de determinação para o conjunto de validação foram de 0,94; 0,86 e 0,50. Em relação ao cloreto de sódio e pH não foi possível obter um modelo de calibração multivariado adequado, isso pode ser explicado pelo fato da determinação de pH

e Cloreto de Sódio serem medições indiretas e , portanto nenhuma absorção específica de bandas podem ser reconhecidas na região do infravermelho próximo. Em relação a proteínas e lipídios obtiveram resultados que forneceram precisão no uso da espectroscopia NIR na determinação desses parâmetros.

Sauer-Leal e colaboradores (2008) desenvolveram uma metodologia analítica orientada ao controle de qualidade do queijo prato utilizando espectroscopia no infravermelho e Regressão por Mínimos Quadrados Parciais. Foram utilizadas 25 amostras de marcas diferentes. Encontraram valores de RMSEP de 0,48%, 0,55%, 0,65%, 0,13% e 0,11% para proteínas, lipídios, umidade, cinzas e pH, respectivamente. Neste estudo, Sauer-Leal e colaboradores obtiveram resultados que demonstraram a capacidade das ferramentas de calibração multivariada no desenvolvimento de metodologias espectroscópicas orientadas à determinação da composição físico-químicas de queijo prato permitindo a determinação dos parâmetros de interesse com exatidão e precisão, utilizando-se informações espectrais no infravermelho próximo (gorduras, proteínas, umidade, e cinzas) e infravermelho médio para (pH).

Em outro estudo, Subramanian e colaboradores (2009), estudaram a composição do queijo cheddar (gordura, umidade e cloreto de sódio) e a qualidade do sabor deste queijo utilizando a espectroscopia de infravermelho associada à calibração multivariada. Um total de 12 amostras foram analisadas. Encontraram valores de RMSECV de 0,15%, 0,21%, 0,19% para umidade, lipídios e proteínas, respectivamente. A avaliação da qualidade do sabor do queijo cheddar foi classificada numa escala de 1 a 10 (sendo 10 o maior valor da classificação de qualidade). A qualidade do sabor expressos em pontuações e os espectros de IV, também exibiram RMSECV de 0,39. Isto indica que é possível prever o índice de qualidade sabor dentro de um erro de apenas 0,39 evidenciando o potencial da espectroscopia de infravermelho associada à calibração multivariada.

González-Martin e colaboradores (2011) avaliaram a composição mineral de Cálcio, Fósforo, Magnésio, Potássio e Sódio em queijos preparados com leite de vaca, ovelha e cabra usando NIR. Para realização deste trabalho 227 queijos foram produzidos em laboratório, os quais foram realizadas as medidas dos espectros com uso de um sonda de fibra óptica. Os espectros foram registrados

em um intervalo de 2 nm, 32 varreduras e em triplicatas. A regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) foi utilizada para obter os modelos para todos os parâmetros estudados. A capacidade de previsão do modelo obtido foi avaliada através da Relação de desempenho de desvio (RPD) um parâmetro de capacidade, que é definida como a relação entre o desvio padrão do método de referência e RMSEP. Se o valor RPD é maior do que 2,5 o modelo é considerado adequado. Neste estudo foi possível verificar que os valores obtidos para os parâmetros foram compreendidos entre 3,8 para o sódio e 1,8 para o fósforo. Os autores deste estudo ressaltam que a capacidade de previsão para potássio e sódio neste trabalho foram mais elevados comparados com cálcio e magnésio, fato explicado pela heterogeneidade dos queijos produzidos.

Botelho e colaboradores (2013) em seus estudos visaram desenvolver e validar metodologias para determinação de lipídios e umidade em queijo mussarela. Foram utilizadas 123 amostras de queijo mussarela fabricados em Minas Gerais. Para avaliar o desempenho da técnica, Figuras de Mérito foram estimadas como Veracidade e Linearidade. A Veracidade foi avaliada através de parâmetros específicos como o RMSEP, que obteve valores de 3,2% e 2,2% para lipídios e umidade, respectivamente. O RMSEP após a detecção de outliers foi de 2,7% (lipídios) e 1,7% (umidade). A Linearidade foi obtida por meio do Coeficiente de Correlação ( $r$ ) que resultou em  $r:0,9442$  e  $r:0,9702$  para lipídios e umidade, respectivamente. Ao analisar os espectros, foi possível atribuir às bandas mais intensas correspondendo ao estiramento O-H na região 1454 nm e 1936 nm. Outras bandas analisadas podem estar relacionadas ao teor de lipídios, tais como a banda centrada em 1210 nm que é atribuído ao segundo harmônico de C-H e 1730 e 1763 nm ao primeiro som harmônico de C-H. Os espectros foram pré-tratados com MSC. Com o modelo PLS foi possível identificar as regiões dos espectros que mais contribuiram para a predição de lipídios e umidade. Neste trabalho, Botelho e colaboradores, desenvolveram e validaram a metodologia para determinação de gordura e umidade em queijo mussarela, evidenciando precisão no uso da espectroscopia NIR na determinação desses parâmetros.

González-Martin e colaboradores (2014) estudaram o potencial da Espectroscopia NIR na determinação de componentes voláteis em queijos produzidos com leite de vaca, cabra e ovelha. Cem (100) amostras de queijos

foram preparadas em laboratório. A técnica utilizada foi a espectroscopia NIR, sendo uma sonda de fibra óptica aplicada diretamente nas amostras de queijos. A análise de referência foi a determinação dos compostos voláteis através do uso da Cromatografia Gasosa acoplada a um detector seletivo de massa. Os espectros foram registrados em intervalos de 2 nm e 32 varreduras. Dentre os componentes estimados estão o 1- propanol, 2-butanol, 2-pentanol, 3-metil-1-butanol que obtiveram um RMSECV respectivamente de 2,20%, 1,93%, 0,32%, 0,07%. Para avaliar a capacidade preditiva do modelo foi utilizada a Relação do Desempenho de Desvio (RPD) que obteve os respectivos valores 1,9; 2,1; 1,8; 1,7. Estes resultados demonstram que a capacidade de previsão pode ser considerado boa para os compostos voláteis: 2-butanol, 2-pentanol, 3-metil-1-butanol, indicando que a tecnologia NIRS apresenta capacidade de predição para determinação de componentes voláteis em queijos produzidos com leite de vaca, cabra e ovelha.

Em estudo recente, Madalozzo e colaboradores (2015) avaliaram uma nova possibilidade de determinação dos parâmetros de qualidade (lipídios, proteínas e umidade) em queijo ricota utilizando a espectroscopia NIR associado ao PLS. Foram utilizadas 19 amostras e espectros em duplicata obtidas na região Sudeste do Brasil. A falta de uniformidade das diferentes marcas de queijo ricota foi observada através dos valores de coeficiente de variação encontrados nos teores de lipídios (48,35%) e proteínas (23,61%). Madalozzo e colaboradores encontraram erro relativo médio de previsão inferior a 6,4% nos parâmetros avaliados. Os modelos construídos mostraram fortes correlações entre os valores obtidos pelo método de referência e aqueles obtidos por meio de calibração multivariada. Os coeficientes de regressão mais elevados indicam as regiões espectrais de alta importância para correlação estabelecida. No caso de lipídios, o modelo foi influenciado pelo segundo harmônico de estiramento C-H em 1190 nm e o primeiro som harmônico em 1710 nm e para proteínas a absorvância de NH em 2160 nm e umidade bandas de OH. Madalozzo e colaboradores obtiveram resultados que forneceram precisão da metodologia para os parâmetros de interesse.

Para aplicações destinadas às análises de qualidade de diferentes tipos de queijo pode-se atestar a aplicabilidade da espectroscopia NIR associada à

calibração multivariada, com vantagens como precisão, tempo de análise reduzido, pouco ou nenhum preparo de amostra, não utiliza reagentes nem gera resíduos.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIQ.Associação Brasileira das Indústrias de Queijo. Disponível em:<www.abiq.com.br>.Acessado em: 07 de janeiro de 2015.

ANDRADE,J.M;CAL-PRIETRO,M.J.,GÓMEZ-CARRACEDO,M.P. et al., A tutorial on multivariate calibration in atomic spectrometry techniques.**Journal of Analytical Atomic Spectrometry**. v.23,p.15-28. 2008.

ANDUEZA,D.; AGABRIEL,C.; CONSTANT,I. et al., Using visible or near infrared spectroscopy (NIRS) on cheese to authenticate cow feeding regimes. **Food Chemistry**.v.141,p.209-214. 2013.

BEEBE, Kenneth. **Chemometrics: a practical guide**. 1ªEd.Canadá:Wiley,1998. 348p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.Secretaria da Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal. Instrução Normativa nº68 de 12 de dezembro de 2006. **Métodos Analíticos Oficiais Físico-químicos, para controle de Leite e Produtos Lácteos**.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.Instrução Normativa nº30 de 26 de junho de 2001. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo de Coalho**.

BOGOMOLOV,A.;DEITRICH,S.;BOLDRINI,B.et al.,Quantitative determination of fat and total protein in milk based on visible light scatter. **Food Chemistry**.v.134,p.412-418. 2012.

BOTELHO,B.G.; MENDES, B.F.; SENA, M.M., Development and Analytical Validation of Robust Near-Infrared Multivariate Calibration Models for the Quality Inspection Control of Mozzarella Cheese. **Food Analytical Methods**. v.6,n.1,p.881-891. 2013.

BRAGA,J.W.B;POPPI,R.J.,Validação de modelos de calibração multivariada:uma aplicação na determinação de pureza polimórfica de carbamazepina por espectroscopia no infravermelho próximo.**Química Nova**.v.27,n.6,p.1004-11. 2004.

CAVALCANTE, José Fernando Mourão. **Sistema de apoio à decisão na produção de leite e queijo coalho com segurança alimentar**.2005.158f. Tese (doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)- curso de pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa. Minas Gerais.

CAVALCANTE, J.F.M; ANDRADE,N.J; FURTADO, M.M. et al.,Processamento do queijo coalho regional empregando leite pasteurizado e cultura 421-18,lática endógena. **Food Science and Technology**.v.27,n.1,p.205-214. 2007.

CECCHI, H.M. **Fundamentos teóricos e práticos em análises de alimentos**. 2º ed. São Paulo: UNICAMP. 2003.

CHALITA,M.A.N;SILVA, R.O.P e;PETTI,R.H.V et al.,Algumas considerações sobre a fragilidade das concepções de qualidade no mercado de queijos do Brasil.**Informações Econômicas**.v.39,p.77-88,n.6. 2009.

CHEN,G.; KOGAOGU-VURMA; HARPER,W.J et al., Application of infrared microspectroscopy and multivariate analysis for monitoring the effect of adjunct cultures during Swiss cheese ripening. **Journal Dairy Science**. v.92,n.8,p.3575-3584. 2009.

FERRÃO, Marco Flores. **Aplicação de técnicas espectroscópicas de reflexão no infravermelho no controle de qualidade da farinha de trigo**. 2000.219f.Tese (doutorado) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas.São Paulo.

FERREIRA, M. M. C.; ANTUNES, A. M.; MELGO, M. S., VOLPE, P. L. O. Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**. 22: 724, 1999.

FORINA,M.;LANTERI,S.;CASALE,M.,Multivariate calibration.**Journal of Chromatografy**. v.1158,n.1,p.61-93. 2007.

GALVÃO, R. K. H.; ARAUJO, M. C. U.; JOSÉ, G. E.; PONTES, M. J. C.; SILVA,E. C.; SALDANHA, T. C. B. A method for calibration and validation sub set partitioning. **Talanta**. 67: 736, 2005.

GELADI, P. Chemometrics in spectroscopy. Part 1. Classical Chemometrics. *Spectrochimica Acta part B*. **Atomic Spectroscopy**. . v.58,n.5,p.767-782. 2003.

GOMES, Adriano de Araújo. **Algoritmo das projeções sucessivas aplicado à seleção de variáveis em regressão PLS**. 2012. 120f. Dissertação (Mestrado em Química) – curso de pós-graduação em Química, Universidade Federal da Paraíba.Paráiba.

GORI, A.; MAGGIO,R.M.; CERRETANI,L. et al.,Discrimination of grated cheeses by Fourier transform infrared spectroscopy coupled whit chemometric techniques. **International Dairy Journal**. v.23, p.115-120. 2011.

GONZÁLEZ-MARTIN,I.; HERNÁNDEZ-HIERRO; GONZALEZ-PERES,C. et al., Potential of near infrared spectroscopy for the analysis of volatile components in cheeses. **Food Science and Technology**. v.55,p.666-673. 2014.

GONZÁLEZ-MARTIN,I.; HERNÁNDEZ-HIERRO,J.M.; REVILLA,I. et al., The mineral composition (Ca, P, Mg, K, Na) in cheeses (cow's, ewe's and goat's) with different ripening times using near infrared spectroscopy with a fibre-opticprobe. **Food Chemistry**.v.127,p.147-152. 2011.

HONORATO, F.A. **Previsão de propriedades das gasolinas do Nordeste empregando espectrofotometria NIR/MIR e transferência de calibração**. 2007. Tese (Doutorado em Química) – Curso de pós-graduação em Química, Universidade Federal de Pernambuco.Recife.

ITEP.Instituto de Tecnologia de Pernambuco. Disponível em:<www.itep.br>.Acessado em: 05 de janeiro de 2015.

JÚNIOR, Severino Granjeiro. **Aplicação de Métodos Quimiométricos em Análises de Formas Farmacêuticas Sólidas Lamivudina (3TC) + Zidovudina (AZT) Baseados na Espectrofotometria de absorção na região do Ultravioleta e do Infravermelho Próximo**. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - curso de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco. Recife.

KAROI, R; MOUAZEN, A.M.; DUFOUR,E. et al. Chemical characterisation of European Emmental cheeses by near infrared spectroscopy using chemometric tools. **International Dairy Journal**. v.16,p.1211-1217.2006.

KRAGGERUD,H.; NAES,T.; ABRAHAMSEN,R.K., Prediction of sensory quality of cheese during ripening from chemical and spectroscopy measurements. **International Dairy Journal**. v.34, p.6-18. 2014.

LEANDRO,J.J. **Queijos do campo à mesa: 10.000 anos de história e tradição**. 1º Ed.São Paulo: Melhoramentos,2008. 170p.

MADALOZZO, E.S.; SAUER, E.; NAGATA, N. Determination of fat, protein and moisture in ricota cheese by near infrared spectroscopy and multivariate calibration. **Journal Food Science Technology**. v.52,n.3,p.1649-1655. 2015.

MACHADO,G.M.;COSTA,R.G.B.;COSTA JUNIOR,L.C.G. et al., Aspectos físico-químicos de queijo de coalho fabricado com o uso de ácido láctico. **Alimentos e Nutrição**. v.22,n.3,p.421-28. 2011.

MENEZES,S.S.M.,Queijo de coalho:tradição cultural e estratégia de reprodução social na região Nordeste.**Revista de Geografia (UFPE)**. v. 28, n.1,p.40-56. 2011.

MORENO, Victor José. **Caracterização física e físico-química do queijo minas artesanal da microrregião Campo das Vertentes**. 2013.131f. Dissertação (Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados) – curso de pós-graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, Universidade Federal de Juiz de Fora. Minas Gerais.

NAES, T; ISAKSSON, T; FEARN, T. et al. **A user friendly guide to multivariate calibration and classification**. Chischester: NIR publications, 2002.

NATALINO, Ricardo. **Caracterização de açúcar mascavo aplicando análise das componentes principais a dados espectrométricos**. 2006.55f. Tese – (Magister Scientiae) - curso de pós-graduação em Agroquímica, Universidade Federal de Viçosa. Minas Gerais.

OCA, M.L.; ORTIZ, M.C.; SARABIA, L.A. et al., Prediction of Zamorano cheese quality by near-infrared spectroscopy assessing false non-compliance and false compliance at minimum permitted limits stated by designation of origin regulations. **Talanta**. . v.99, p.558- 565. 2012.

PANTOJA, Patrícia Araújo. **Caracterização do petróleo por técnicas espectroscópicas e sua utilização na avaliação e desenvolvimento de métodos de inferência em processo de refino**. 2010.162f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – curso de pós-graduação em Engenharia Química, Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. São Paulo.

PASQUINI, C., Near Infrared Spectroscopy: Fundamentals, Practical Aspect and Analytical Applications. **Journal of The Brazilian Chemical Society**. v.14, n.2, p.198-219. 2003.

PEDRO, A.M.K. **Determinação simultânea e não-destrutiva de sólidos totais e solúveis, Licopeno e Beta-caroteno em produtos de tomate por espectroscopia no infravermelho próximo utilizando calibração multivariada**. 2004. Dissertação (mestrado) , Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. Campinas, São Paulo.

PEREDA, J. A. O. **Tecnologia de Alimentos** (Vol. 2- Alimentos de origem animal). Porto Alegre: Ed. Artmed, 2005.

PERRY, K. S.P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Química Nova**. v.27, n. 2, p.293-300. 2004.

PERNAMBUCO. Secretaria de Produção Rural e Reforma Agrária do Estado de Pernambuco. **Inspeção e Fiscalização Agropecuária, 1999**.

PERNAMBUCO. Assembléia Legislativa do Estado de Pernambuco. **Lei nº13.376, de 20 de dezembro de 2007**.

PERNAMBUCO. Assembléia Legislativa do Estado de Pernambuco. **Lei nº14.933, de 04 de abril de 2013**.

PERNAMBUCO. Assembléia Legislativa do Estado de Pernambuco. **Lei nº15.695 de 21 de dezembro de 2015**.

PREZOTTO, L.L. **A sustentabilidade da agricultura familiar: implicações e perspectivas da legislação sanitária para pequenas indústrias.** São Paulo: Fundação Konrad Adenauer, 2005.

RINNAN, A.; BERG, F. V. D.; ELGELSEN, S.B. et al., Review of the most common pre-processing techniques for near infrared spectra. **Trends in Analytical Chemistry.** v.28, n.10, p.1201-1222. 2009.

ROCHA, Júlia Tristão do Carmo. **Emprego de espectroscopia no infravermelho e métodos quimiométricos para a identificação e quantificação de petróleo a partir de misturas de frações de diesel.** 2009, 104f. Dissertação (mestrado em Química) – curso de pós-graduação em Química, Universidade Federal do Espírito Santo.

SANTOS, B.M.; OLIVEIRA, M.E.G.; SOUSA, Y.R.F. et al., Caracterização físico-química e sensorial de queijo de coalho produzido com mistura de leite de cabra e de leite de vaca. **Revista Instituto Adolfo Lutz.** v.70, n.3, p.302-310. 2011.

SAUER, Elenise. **Desenvolvimento de metodologias multivariadas para análise de queijos por espectroscopia DRIFT.** 2007, 134f. (Tese – doutorado em Química) – curso de pós-graduação em Química, Universidade Federal do Paraná.

SAUER – LEAL, E. OKADA, F.M., PERALTA-ZAMORA, P. Caracterização físico-química de queijo prato por espectroscopia no infravermelho e regressão de mínimos quadrados parciais. **Química Nova.** v.31, n.7, p.1621-1625. 2008.

SENA, M.M.; POPPI, R.J.; FRIGHETTO, R.T.S. et al., Avaliação do uso de métodos quimiométricos em análise em solos. **Química Nova.** v.23, n.4, p.547-556. 2000.

SIELER, H.W.; OZAKI, Y.; KAWATA, S. **Near-infrared Spectroscopy: Principles, Instruments, Applications.** Ed. Wiley-VCH, 2002.

SILVA, R.A.; LIMA, M.S.F.; VIANA, J.B.M et al., Can artisanal “Coalho” cheese from Northeastern Brazil be used as a functional food?. **Food Chemistry.** v.135, p.1533-1538. 2012.

SILVA, M.C.D.; RAMOS, A.C.S.; MORENO, I. et al., Influência dos procedimentos de fabricação nas características físico-químicas, sensoriais e microbiológicas de queijo de coalho. **Revista Instituto Adolfo Lutz.** v.69, n.2, p.214-221. 2010.

SILVA, Gilvan; SILVA, Argélia Maria Araújo Dias; FERREIRA, Maria Presciana de Brito. **Processamento de Leite.** 1ª Ed. Recife: EDUFRPE. 2012.

SILVEIRA, Fernanda Gomes. **Abordagem geométrica do método dos quadrados mínimos parciais com uma aplicação a dados de seleção genômica.** 2014, 176f. Tese – curso de pós-graduação em Estatística e Experimentação Agropecuária, Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Princípios de Análise instrumental**, 6ª ed. Bookman: Porto Alegre. 2009.

SOTELO, Francisco Falla. **Aplicação da espectroscopia de infravermelho próximo na caracterização de petróleo: simulação de uma unidade de destilação atmosférica**. 2006, 154f. (Tese – doutorado em Engenharia Química) – curso de pós-graduação em Engenharia Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

SOUZA,A.M.;BREITFREITZ,M.C.; FILGUEIRAS,P.R., Experimento didático de quimiometria para calibração multivariada na determinação de paracetamol em comprimidos comerciais utilizando espectroscopia no infravermelho próximo: um tutorial, parte II. **Quim. Nova**. v. 36, n.7, p.1057-1065. 2013.

SOUZA,A.M.; POPPI,R.J. Experimento didático de quimiometria para análise exploratória de óleos vegetais comestíveis por espectroscopia no infravermelho médio e análise de componentes principais: um tutorial, parte I. **Quim. Nova**. v. 35, n.1, p.223-229. 2012.

SUBRAMANIAN,A.; HARPER,W.J.; RODRIGUEZ-SOANA,L.E., Rapid prediction of composition and flavor quality of cheddar cheese using ATR-FTIR spectroscopy. **Journal of Food Science**. v. 74, n.3, p.292-9.

TOMAS, E.V., **A primer on multivariate calibration**. Analytical Chemistry, 1994.

## **6.RESULTADOS**

**ARTIGO: PREVISÃO DO TEOR DE PROTEÍNAS E LIPÍDIOS DO QUEIJO DE  
COALHO UTILIZANDO A ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO  
PRÓXIMO E CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA**

## RESUMO

O queijo de coalho é um dos produtos lácteos mais tradicionais produzidos no Nordeste brasileiro. Metodologias oficiais para determinação da composição química de alimentos apresentam diversos inconvenientes, tais como tempo excessivo de análises. Diante disso, a espectroscopia na região do infravermelho próximo (NIRS) tem sido utilizada em análise de alimentos para a determinação de vários constituintes. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi prever o teor de proteínas e lipídios utilizando NIRS associada à calibração multivariada. Para tanto, 80 amostras de queijo de coalho foram submetidas às análises de referência (Kjeldahl para proteínas e Gerber para lipídios) e espectroscópicas. Espectros NIR foram obtidos na região  $10000 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ , no modo reflectância, com resolução de  $8 \text{ cm}^{-1}$  e média de 16 varreduras. O método de calibração multivariada utilizado foi a regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) com seleção de variáveis utilizando o algoritmo PLS por intervalos (iPLS). De maneira geral, foi possível verificar que o erro médio quadrático de previsão – RMSEP para o modelo escolhido para lipídios foi 1,39%. Em relação às proteínas obteve-se um RMSEP: 2,73% do modelo escolhido. O NIRS evidenciou imprecisão para predição de proteínas em queijos de coalho, embora para outras variedades de queijo a metodologia tenha se aplicado com sucesso. Para o teor de lipídios demonstrou potencial do modelo multivariado utilizado na determinação de gorduras em amostras com matrizes complexas como é o caso do queijo de coalho, evidenciando as vantagens de associação entre NIR-PLS.

**Palavras-chave:** queijo coalho; kjeldahl; gerber; NIRS

## ABSTRACT

The “coalho” cheese it is one of the most traditional products produced in northeastern -Brazil. Methodologies officials to determine chemical composition of food have several disadvantages such as excessive time analysis. Thus, spectroscopy in the near infrared region (NIRS) has been used in food analysis for the determination of various constituents. The aim of this study was to predict the content of proteins and lipids using NIRS associated with multivariate calibration. Therefore, 80 samples of “coalho” cheese were submitted to the reference analysis (Kjeldahl for protein and Gerber to lipids) and NIR spectroscopic. NIR spectra were obtained in the region 10000 - 4000  $\text{cm}^{-1}$ , in reflectance mode with resolution of 8  $\text{cm}^{-1}$ , and average of 16 scans. The calibration method was regression by partial least squares (PLS) with variable selection variables using the algorithm interval PLS (iPLS). Overall, we found that the mean square error of prediction - RMSEP to the model chosen on lipids was 1.39%. In relation to the protein gave a RMSEP: 2.73% was obtained. The NIRS showed imprecision for protein prediction in rennet cheeses, although for other varieties of cheese the methodology has been successfully applied. For the lipid content the determination of fat in samples with complex matrices such as “coalho” cheese showed the advantages of association between NIR-PLS.

**Keywords:** “coalho” cheese”; kjeldahl; gerber; NIRS

## 1. INTRODUÇÃO

Queijos são importantes fontes de nutrientes e apresentam-se em uma diversidade de sabores, texturas e formas, que está associado à variabilidade natural do leite, locais de produção e técnicas de processamento. O queijo de coalho é produzido há mais de um século com leite de vaca cru, comercializado como queijo coalho tipo B, ou com leite pasteurizado, denominado comercialmente como queijo coalho tipo A. É um dos produtos lácteos mais tradicionais produzidos no Nordeste brasileiro e tem sua origem relacionada com a fabricação artesanal, fato que persiste até hoje (FREITAS, et al., 2013).

A Instrução Normativa N°30 de 2001 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), define o produto como “o queijo que se obtém por coagulação do leite por meio do coalho ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não pela ação de bactérias lácteas selecionadas e comercializado normalmente com até dez dias de fabricação”. Além disso, classifica-o como um queijo de média a alta umidade, de massa semi-cozida ou cozida apresentando um teor de gordura nos sólidos totais variável entre 35% e 60%. Estabelece ainda que o queijo deve apresentar características sensoriais, tais como consistência elástica, cor branco-amarelado uniforme, sabor brando, ligeiramente ácido, podendo ser salgado, odor ligeiramente ácido, crosta fina e sem trinca, não sendo usual a formação de casca bem definida e presença de algumas olhaduras pequenas ou sem olhaduras (BRASIL, 2001).

Do ponto de vista nutricional, o queijo de coalho é um concentrado lácteo constituído de proteínas, lipídios, sais minerais, principalmente cálcio e fósforo, e vitaminas, entre elas A e Complexo B (PERRY, 2004).

Silva e colaboradores (2012) avaliaram o queijo de coalho como alimento funcional a partir dos perfis peptídicos e antioxidantes. Observaram que os peptídeos presentes no queijo de coalho tiveram alta atividade no que se referem às propriedades bioativas analisadas e peptídeos solúveis em água apresentaram atividade antioxidante. Embora seja difícil comparar a capacidade antioxidante com os dados da literatura, devido à diversidade de metodologias utilizadas, o estudo concluiu que se trata de uma fonte potencial de peptídeos antioxidantes podendo então ser considerado um alimento funcional.

O controle de qualidade de produtos lácteos é de fundamental importância para a garantia da saúde e satisfação do consumidor. A qualidade desses produtos pode ser avaliada através de determinações físicas, químicas, microbiológicas e sensoriais, sendo o conhecimento da composição química de suma importância para sua fabricação e controle de qualidade do produto (VENTUROSOSO et al., 2007).

O regulamento técnico de identidade e qualidade do queijo de coalho (MAPA, 2001) cita parâmetros de qualidade como o teor de gorduras no extrato seco (35 a 60%), umidade e características sensoriais. Entretanto, os queijos produzidos industrialmente (Tipo A) trás nos rótulos, como informação nutricional, os teores de gorduras, proteínas, carboidratos e sódio, sendo os mais expressivos gorduras e proteínas. A Instrução Normativa N° 68/2006 que dispõe sobre os métodos físico-químicos de análise para controle de leite e derivados, indica para determinação de lipídios (gorduras) em queijos o método butirométrico de Gerber, e para determinação de nitrogênio total (proteínas) o método de Kjeldahl (BRASIL, 2006).

Estas metodologias, embora oficiais, apresentam diversos inconvenientes, tais como necessidade de pré-tratamento da amostra, tempo excessivo de análise, mão de obra treinada, uso de reagentes tóxicos e geração de resíduos (VENTUROSOSO et al., 2007). Diante desses inconvenientes e com a crescente demanda de análises de qualidade, esses métodos não só inviabilizam o controle de qualidade efetivo, como também geram informações equivocadas nos rótulos dos produtos levando à desvalorização do produto final.

A espectroscopia na região do infravermelho próximo (NIRS) é uma técnica poderosa que tem sido utilizada em análise de alimentos para a determinação rápida de vários constituintes (BOTELHO et al., 2013; CEVOLI et al., 2013; GONZALEZ-MARTIN et al., 2014; KRAGGERUD et al., 2014). A espectroscopia no infravermelho é um tipo de espectroscopia vibracional que emprega radiação eletromagnética na faixa de  $12.800$  a  $10\text{ cm}^{-1}$ , que em comprimentos de onda corresponde à região entre 780 e 1.000.000 nm. Esta parte do espectro está situada entre o visível e as micro-ondas e, em geral é dividido em três regiões denominadas Infravermelho próximo (Near Infrared - NIR), infravermelho médio (Middle infrared – MIR) e infravermelho distante (Far Infrared – FAR) (SKOOG, et

al.,2009). A energia do fóton incidente deve ser idêntica à diferença de energia entre dois níveis vibracionais para que ocorra absorção da radiação IV. Entretanto, este critério não é suficiente, é também necessário que o campo elétrico oscilante da radiação incidente possa interagir com a molécula. Isto só pode acontecer se o deslocamento dos átomos na vibração produzir uma mudança no momento de dipolo da molécula (SOUZA et al.,2013).

A informação contida no espectro NIR ( $12.800 - 4.000 \text{ cm}^{-1}$ ) pode ser relacionada a propriedades de interesse a partir de um conjunto de amostras de calibração empregando a calibração multivariada (SUBRAMANIAN et al., 2009). Os métodos desenvolvidos a partir da espectroscopia NIR associada à calibração multivariada são rápidos, de baixo custo, pois não utilizam reagentes ou solventes, logo não geram resíduos e necessitam de pouco ou nenhum pré-tratamento das amostras (CHEN et al.,2009; SUBRAMANIAN et al., 2009; ANDUEZA et al.,2013; GONZALEZ-MARTIN et al.,2014).

Nos últimos anos, a espectroscopia NIR associada à calibração multivariada foi utilizada na determinação de diversos parâmetros de qualidade em produtos lácteos (determinação de lipídios, proteínas e umidade), especialmente em queijos, como o Emental (KAROUI et al., 2006), Prato (SAUER-LEAL et al.,2008), Minas (BOTELHO et al., 2013) e Ricota (MADALOZZO et al., 2015). Além disso, a referida técnica também tem sido utilizada para avaliar diferentes atributos sensoriais em queijos, podendo citar o estudo de Subramanian e colaboradores (2009) que avaliaram a composição do queijo cheddar (gordura, umidade e cloreto de sódio), assim como a qualidade do sabor deste queijo utilizando a NIRS associada à calibração multivariada. Os estudos citados mostraram a eficácia de uma técnica robusta como o uso da Espectroscopia NIR associada à calibração multivariada no controle de qualidade em derivados lácteos. Entretanto, nenhum trabalho foi encontrado na literatura que tivesse como matriz o queijo de coalho produzido no Nordeste brasileiro.

Diante disso, o presente estudo propõe-se avaliar a composição de queijo de coalho através dos teores de proteínas e lipídios previstos a partir de modelos obtidos utilizando a Espectroscopia na Região do Infravermelho Próximo associada à calibração multivariada.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Amostras

Foram adquiridas 80 amostras de 61 marcas diferentes de queijos de coalho em estabelecimentos comerciais das cidades do Recife e Jaboatão dos Guararapes (Pernambuco – Brasil), sendo 40 amostras produzidas com leite de vaca pasteurizado (queijo tipo A) e 40 com leite de vaca cru (queijo tipo B). Em seguida, as amostras foram transportadas até o laboratório e armazenadas sobre refrigeração até o momento das análises. As amostras foram fracionadas a fim de realizar as análises de referência (determinação de lipídios e nitrogênio total) e espectroscópicas. Para ambas as análises, aparas foram removidas com a finalidade de evitar a superfície externa, cuja degradação é mais provável.

### 2.2 Análises de referência

As determinações de lipídios e proteínas foram realizadas através dos métodos sugeridos pela Instrução Normativa nº68/2006 e A.O.A.C - 1995 (*Association of Official Analytical Chemists*), respectivamente.

As determinações do teor de lipídios e proteínas foram realizadas em triplicatas nos laboratórios de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Pernambuco e de Análise Físico-Química de Alimentos da Universidade Federal Rural de Pernambuco, respectivamente sendo os resultados expressos em %.

#### 2.2.1 Determinação de lipídios

Amostras de 3g de queijos de coalho foram pesadas diretamente em butirômetro de Van Gulik especial para queijos. Após a adição de 5 mL de água destilada, 10 mL de Ácido Sulfúrico com densidade de 1,820 a 20°C e 1 mL de álcool isoamílico, estes conteúdos foram agitados moderadamente e colocado em banho-maria a 65°C até dissolução da amostra. Em seguida, os butirômetros foram centrifugados por 10 minutos a 1200 rotações por minuto (rpm). O volume

de gordura foi medido diretamente na escala do butirômetro, expresso em porcentagem.

### 2.2.2 Determinação de nitrogênio Total

Empregou-se o método de Kjeldahl, compreendendo-se as fases de digestão, titulação e destilação.

Na etapa de digestão, em média 0,5g de queijo de coalho foi pesado em tubo de Kjeldahl e adicionado 0,5g do catalisador (mistura catalítica – Dióxido de Selênio, Sulfato de Cobre Pentahidratado e Sulfato de Potássio) e 10 mL de Ácido Sulfúrico concentrado. Em seguida, as amostras foram digeridas lentamente aumentando 50°C a cada 30 min até alcançar 400°C. Decorrido este tempo esfriaram-se os tubos e adicionaram-se 10mL de água destilada para iniciar a destilação.

Para destilação, o tubo de Kjeldahl com o conteúdo digerido foi adaptado ao sistema, neutralizando-se com aproximadamente 30 mL de Hidróxido de Sódio a 40%. O destilado foi recolhido em erlenmeyer de 125mL, contendo 10 mL de Ácido Bórico a 4%.

Finalmente, a titulação foi realizada com Ácido Clorídrico a 0,1 mol L<sup>-1</sup> na presença de um indicador misto (solução de Vermelho de Metila a 0,1% e solução de Verde de Bromocresol a 0,1%), até o aparecimento da coloração róseo claro. O volume gasto na titulação foi utilizado para o cálculo de percentual de Nitrogênio Total contido nas amostras de queijo de coalho e convertido em percentual de proteínas utilizando-se o fator 6,38 (fator de conversão de nitrogênio para proteínas em produtos lácteos).

### 2.3 Análise Espectroscópica (NIRS)

Os espectros NIR foram obtidos na região entre 10.000 – 4.000 cm<sup>-1</sup> no modo reflectância, utilizando o espectrômetro FT-IR Spectrum 400 (PerkinElmer) e o acessório de reflectância difusa (NIRA- Nir Reflectancy Accy), com resolução de 8 cm<sup>-1</sup> e média de 16 varreduras. Neste acessório, a amostra preenche uma placa de Petri de 9 cm de diâmetro e um sistema *Spinner*, que gira a uma

velocidade de 30 rpm, permite obter espectros em diferentes pontos da amostra, fornecendo como resultado um espectro médio desses pontos. As análises foram realizadas em temperatura controlada de  $24 \pm 1^\circ\text{C}$  e umidade relativa média de 50%.

#### 2.4 Desenvolvimento dos modelos de calibração

Os modelos de calibração foram desenvolvidos utilizando a Regressão por mínimos quadrados parciais (Partial least squares- PLS) e regressão por mínimos quadrados parciais em Intervalos (iPLS). Para isso, o espectro foi dividido em 5, 10 e 15 intervalos. As amostras foram divididas em conjuntos, os quais 70% das amostras foram destinadas para o conjunto de calibração (correspondendo a 56 amostras) e 30% para previsão (24), selecionadas pelo algoritmo KSNV utilizando rotinas desenvolvidas em ambiente matlab.

Neste estudo, diferentes pré-processamentos foram testados para eliminar efeito de espalhamento, dentre eles, Correção do efeito multiplicativo (*Multiplicative scatter Correction* – MSC), Variação normal padrão (Standard normal variate - SNV) e Derivadas por filtros Savitzky - Golay com diferentes tamanhos de janela (15, 17 e 19 pontos) com polinômios de segundo grau.

Uma análise de componentes principais (PCA) foi realizada para avaliar a distribuição das amostras e para verificar a existência de amostras anômalas através do gráfico dos resíduos versus *leverage*. Amostras que apresentem alto valor de resíduo e *leverage* são excluídas e um novo modelo é obtido e avaliado.

#### 2.5 Eficiência dos modelos

A eficiência dos modelos obtidos para proteínas e lipídios foi avaliada em termos de RMSECV (raiz quadrada do erro médio quadrático de validação cruzada), número de variáveis latentes (VL) e, na etapa de previsão pelos valores de RMSEP (raiz quadrada do erro médio quadrático de previsão) que avalia a exatidão, coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e Valores de tendência (Bias).

Um teste F, em um nível de 95% de confiança, foi aplicado para avaliar se existem diferenças significativas entre os valores de RMSEP dos modelos PLS e

iPLS desenvolvidos. Todos os cálculos foram realizados com os softwares Unscrambler® 9.7 (CAMO S.A) e Matlab® e suas rotinas.

### 3.RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Análises do teor de proteínas e lipídios do queijo de coalho por métodos convencionais

##### 3.1.1 Teor de proteínas

Os valores de proteínas das 80 amostras de queijo de coalho avaliadas variaram de 8,37 a 28,82%. Este valor de 8,37%, a partir do teste de Grubbs com 95% de confiança, foi considerado como não pertencente ao conjunto de dados e por isso descartado. Na Tabela 1 é apresentado o resultado da média geral do teor de proteínas das 80 amostras de queijos de coalho, assim como a menor e maior média apresentada nas análises experimentais.

**Tabela 1** - Média do teor de proteínas das amostras de queijo de coalho

Determinação	<u>Resultados experimentais</u>		
	Média Mínima	Média Máxima	Média geral
Proteínas (%)	11,36	28,87	20,19 ± 0,43

Na Tabela 2 são apresentados o teor médio de proteínas de queijo de coalho de acordo com a classificação em tipo A e B (queijos produzidos com leite pasteurizado e cru, respectivamente).

**Tabela 2** - Média do teor de proteínas do queijo de coalho tipo A e B

Determinação	Queijo Tipo A	Queijo Tipo B
Proteínas (%)	21,01 ± 0,32	19,34 ± 0,54

Observou-se que os queijos de coalho Tipo B apresentam em geral teores de proteína menores que 20%, diferente dos queijos tipo A. Comparando as

amostras dos queijos de coalho Tipo A e B, realizando-se um Teste T a fim de saber se há diferença significativa na proporção de proteínas do queijo de coalho dado o leite utilizado em sua fabricação foi possível observar que não há diferença estatisticamente significativa com 95% de confiança entre essas médias.

A média do teor de proteínas corrobora com o trabalho de Correia (2011), o qual estudou o delineamento do perfil fabril e caracterização físico-química do queijo de coalho no sertão Paraibano, o mesmo encontrou valor médio de  $20,14 \pm 0,13$  para queijo tipo A e  $18,92 \pm 0,92$  e  $20,46 \pm 0,20$  para queijos de coalho tipo B produzidos em Unidades Produtoras de Queijos em duas regiões do sertão paraibano.

Nassu e colaboradores (2003) em estudo realizado para caracterização físico-química de queijos de coalho produzidos no Rio Grande do Norte encontraram valores médios de  $24,87 \pm 2,25\%$  para proteínas. Entretanto, o universo de amostras utilizado era muito pequeno, apenas 11 amostras das quais 9 são queijos Tipo B. Em outro trabalho, Silva e colaboradores (2010) estudaram a influência dos procedimentos de fabricação nas características físico-químicas, sensoriais e microbiológicas de queijo de coalho produzidos no Estado de Alagoas. Observaram diferenças referentes aos percentuais de proteínas entre o queijo tipo A que obteve teor médio de proteína de 29,4% (3 amostras) e tipo B 26,93% (12 amostras).

As diferenças das médias de proteínas encontradas nos estudos acima podem ser explicadas pelo fato de que o teor de proteínas do queijo de coalho depende do leite utilizado como matéria-prima para produção do queijo que pode ser influenciado pela raça, idade, ração animal, integridade dos úberes (SILVA et al, 2012). Além disso, a legislação brasileira não estabelece padrões para os teores de proteínas, visto que ainda não existe uma padronização no processo de produção de queijo de coalho, sendo em parte produzida em pequenas queijarias de forma artesanal. Em contrapartida na literatura relata valores entre 10 a 30% de proteínas em queijos o que caracteriza dessa forma concordância com os queijos avaliados.

### 3.1.2 Teor de lipídios

Na Tabela 3 é apresentado o resultado da média geral do teor de lipídios das 80 amostras de queijos de coalho, assim como a menor e maior média referente às análises convencionais.

**Tabela 3** - Média do teor de lipídios do queijo de coalho

<b>Determinação</b>	<b><u>Resultados experimentais</u></b>		
	<b>Média</b>	<b>Mínima</b>	<b>Média Máxima Média geral</b>
Lipídios (%)	14,00		30,33 24,68 ± 0,45

Estes resultados corroboram com estudo feito por Nassu e colaboradores (2003), no qual o teor médio de lipídios em queijo de coalho encontrado é estatisticamente semelhante ao presente estudo onde se obteve  $25,61 \pm 3,81\%$ , assim como o estudo relatado por Santos e colaboradores (2006) que analisaram queijos de coalho produzidos no estado de Sergipe, encontrando valor médio de 24,4% de gordura e Santos et al.(2011) encontraram um teor médio de 24% de lipídios em queijos de coalho produzido com leite de vaca.

Já Silva et al (2010) obteve valores de 36,59 a 48,16% em amostras de queijo de coalho artesanal coletados no estado de Alagoas resultados próximos aos encontrados por Machado (2008) que constatou teor de 39,75% de lipídios em amostras de queijos de coalho produzidos no estado do Ceará.

Na Tabela 4 são apresentados o teor médio de lipídios de queijo de coalho de acordo com a classificação em tipo A e B.

**Tabela 4** - Média do teor de proteínas do queijo de coalho tipo A e B

<b>Determinação</b>	<b>Queijo Tipo A</b>	<b>Queijo Tipo B</b>
Lipídios(%)	25,06 ± 0,48	24,30 ± 0,42

Empregando-se o Teste T, a nível de 5% de significância, observou-se que não há diferença entre os queijos quando avaliados pelo leite em que foram produzidos. Esses resultados corroboram com a pesquisa de Gomes e colaboradores (2012) em queijo de coalho artesanal e industrial comercializados no município de Currais Novos no Estado do Rio Grande do Norte com teores médios de lipídios de 23,30% e 27,30%, respectivamente.

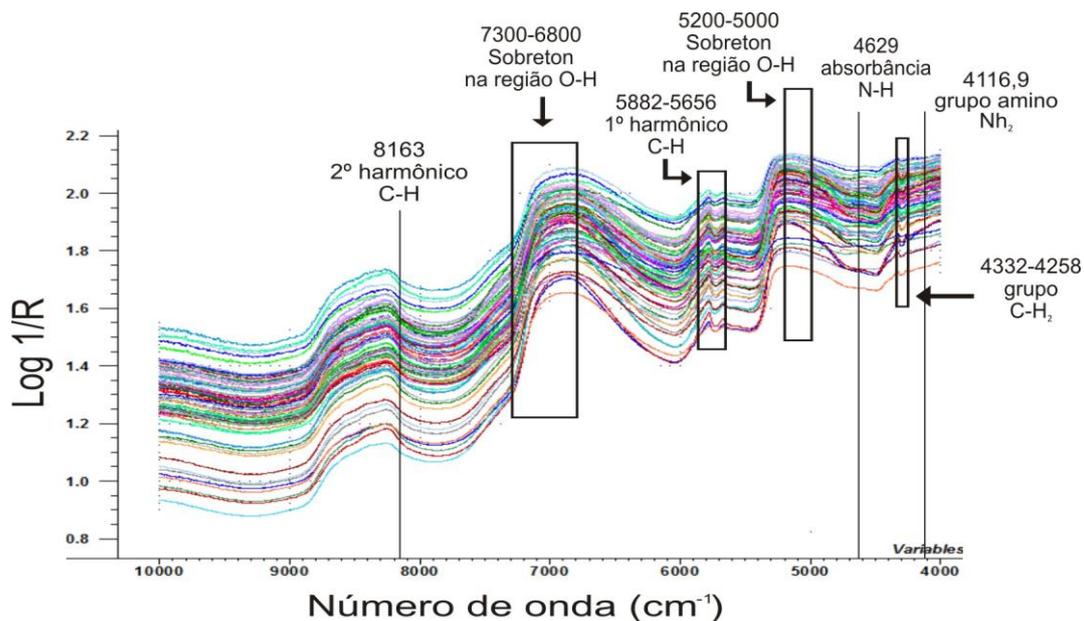
Valores superiores foram encontrados por Machado (2008) que constatou um teor médio de 39,75% de lipídios em amostras de queijo de coalho artesanais produzidos no Estado do Ceará e Mamede e Colaboradores (2010) em amostras de queijos de coalho industriais comercializados na Bahia encontraram um teor de lipídios entre 33,10 a 43,27%.

A diversificação da metodologia para manufatura pode ser constatada na produção de vários fabricantes, o processamento deste produto não se encontra bem definido o que leva a falta de padronização do processo de produção do queijo de coalho comercializado. Fato que pode contribuir para a diversificação nos parâmetros físico-químicos, segundo um boletim de pesquisa e desenvolvimento da EMBRAPA (NASSU et al.,2003). O que descreve Filho e Colaboradores (2009) de queijos de coalho coletados em seis propriedades do município Jacuti, Estado de Pernambuco, o qual os teores médios de lipídios variaram de 18,99% a 31,88%, resultados estes com uma ampla faixa de variação.

### 3.2 Espectros NIR

A Figura 1 apresenta os espectros NIR brutos de todas as 80 amostras de queijo de coalho utilizadas neste trabalho, os quais foram registrados na faixa de 10000 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ , cuja matriz de dados espectrais (X) tem dimensão 80 x 3001 (amostras x variáveis). As regiões mais informativas são referentes às combinações e sobretons das ligações O-H (água), C-H (lipídios) e N-H (proteínas) conforme indicado na figura.

**Figura 1** - Espectros brutos NIR das 80 amostras de queijo tipo coalho

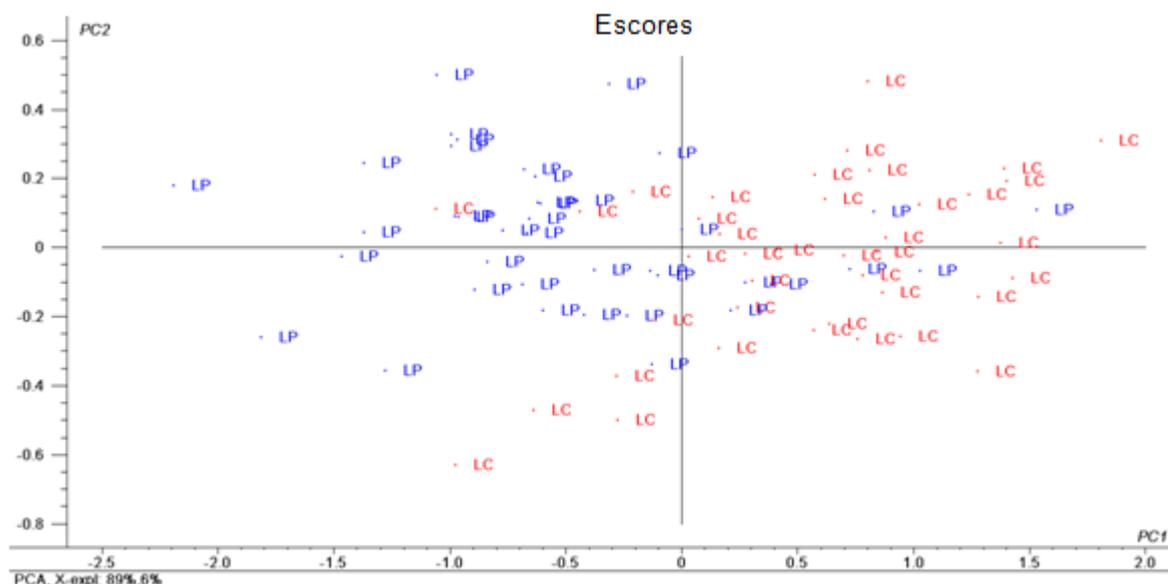


Conforme pode ser observado na Figura 1, os espectros de Infravermelho evidenciam que as amostras de queijo de coalho apresentam uma mistura complexa de componentes. Com isso, existem em seus espectros informações de diversos grupos funcionais, cujos sinais analíticos apresentam-se sobrepostos. Diante disso, buscou-se, neste estudo, obter modelos matemáticos otimizados para determinação de proteínas e lipídios e, em seguida, verificar as regiões espectrais relevantes para a construção dos modelos relacionados às atribuições de absorção de radiação das ligações químicas e grupos funcionais de proteínas e gorduras de queijo de coalho.

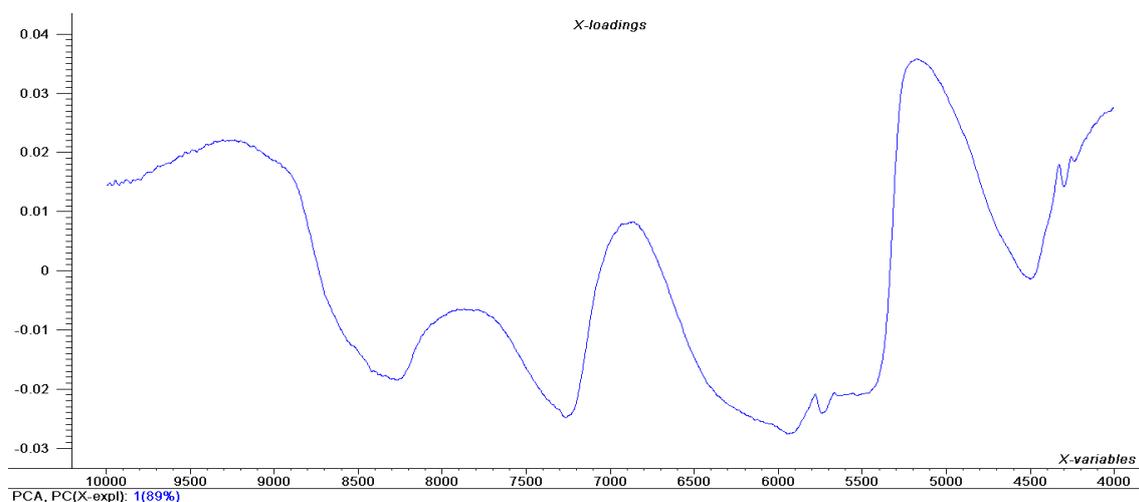
### 3.3 Análise exploratória de dados

A Figura 1 referente aos espectros brutos mostra um perfil espectral muito semelhante e sobrepostos entre as 80 amostras de queijo de coalho analisadas. Uma Análise de Componentes Principais (PCA) realizada nos dados brutos, a qual mostrou uma sobreposição das amostras de queijos produzidos com leite pasteurizado – LP (Tipo A) e leite cru – LC (Tipo B), conforme gráfico dos escores para PC1 x PC2 presentes nas Figuras 2, bem como o gráfico dos pesos na Figura 3.

**Figura 2** - Gráfico dos escores de todas as amostras de queijo de coalho nas duas primeiras componentes PC1 e PC2

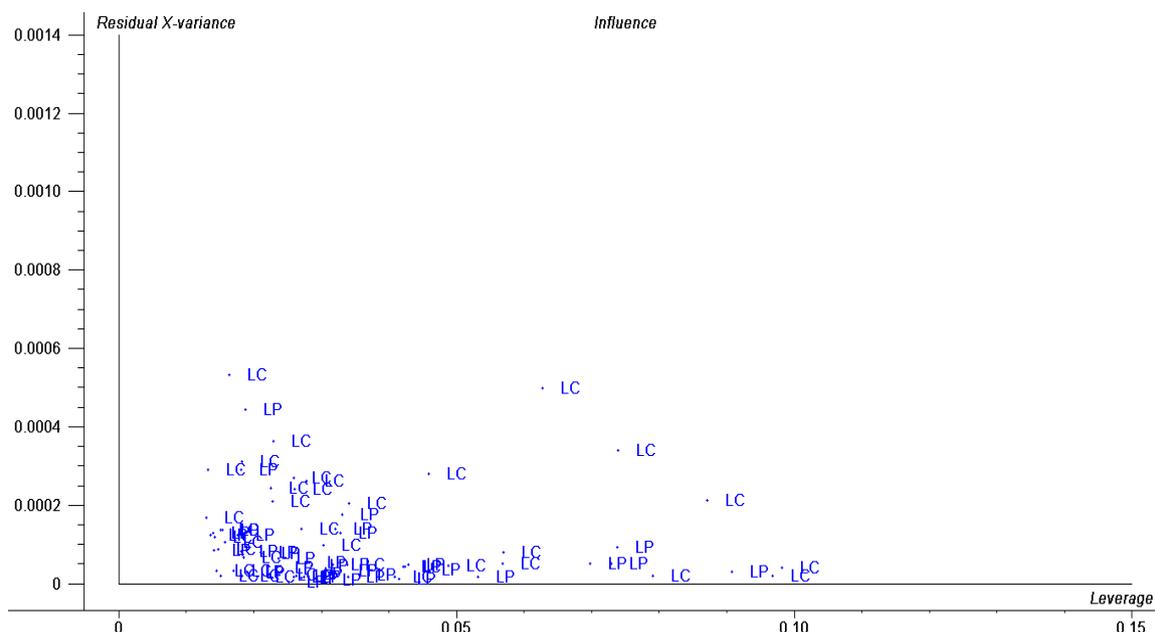


**Figura 3** - Gráfico dos pesos PC1 x PC2



A PC1 e PC2 explicam, respectivamente, 89% e 6% da variância dos dados espectrais. Entretanto, percebe-se em PC1 ocorre uma separação muito tênue entre os queijos tipo A e tipo B. Correlacionando esse perfil com as propriedades percebe-se que as amostras com escores negativos em PC1 apresentam, em geral, teores de lipídios entre 25 e 30%, ou seja, os valores mais altos da faixa, mas para proteínas não se observou nenhum padrão.

A Figura 4 apresenta o gráfico variância residual *versus* influência (leverage) avaliado em X é possível verificar que não há presença de amostras anômalas (outliers).

**Figura 4 - Resíduo versus Influência**

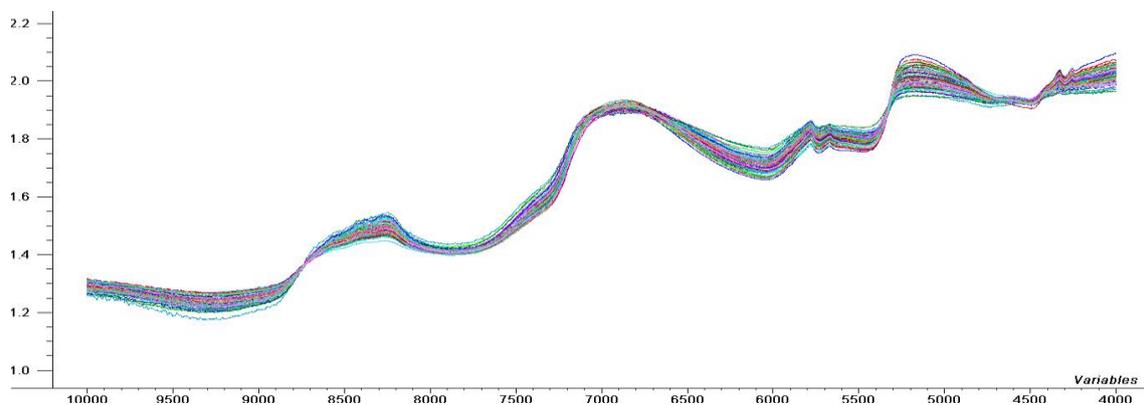
### 3.4 Desenvolvimento do modelo matemático

#### 3.4.1 Pré-tratamentos de dados

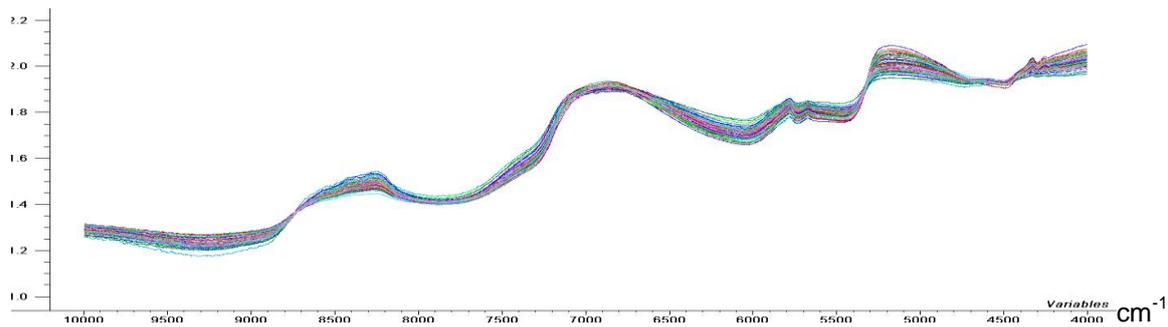
Os espectros apresentados na Figura 1 revelam um desvio de linha de base causado por espalhamento da radiação pela amostra. Para minimizar ou eliminar este efeito físico que se traduz em informação irrelevante na construção dos modelos de calibração, os seguintes pré-processamentos de dados foram testados: Correção do Espalhamento Multiplicativo (MSC), Correção do Espalhamento Multiplicativo (MSC) seguida de Suavização por Filtros Savitzky-Golay com janelas de 7 pontos, Variação Normal Padrão(SNV), Variação Normal Padrão(SNV) com Suavização por Filtros Savitzky-Golay com janelas de 7 pontos e 1ª Derivada com filtro Savitzky- Golay ( janelas de 15, 17 e 19 pontos e polinômio de 2º grau), conforme seguem as Figuras 5 a 11.

**Figura 5 - Espectros pré-processados por MSC**

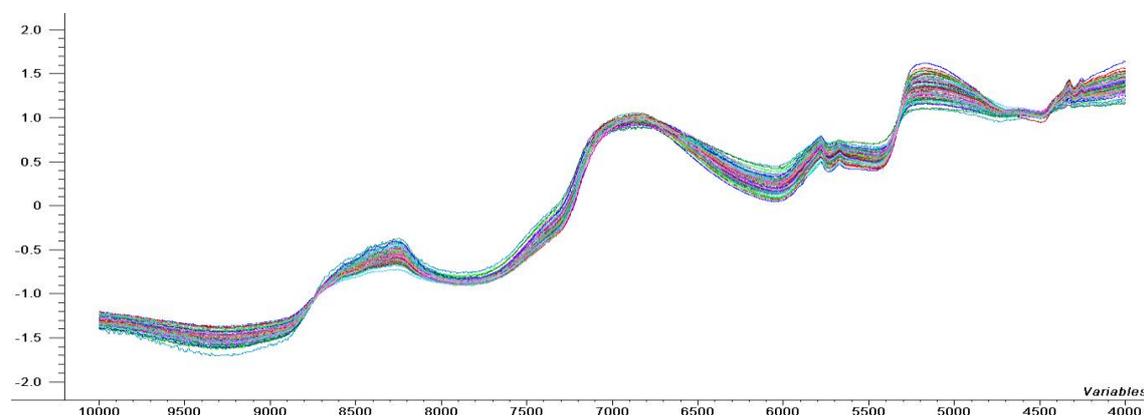
Log 1/R

 $\text{cm}^{-1}$ **Figura 6 - Espectros pré-processados por MSC seguida de Suavização Savitzky- Golay com janelas de 7 pontos**

Log 1/R

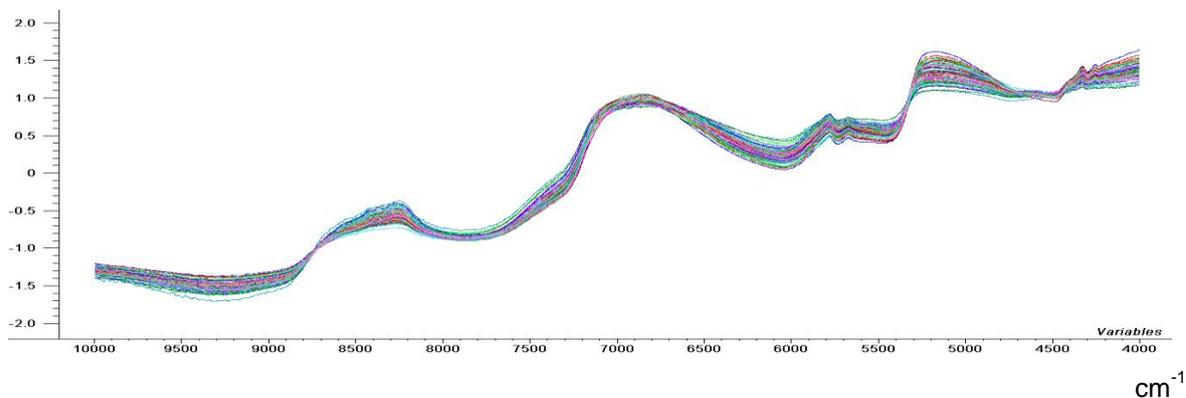
 $\text{cm}^{-1}$ **Figura 7 - Espectros pré-processados por SNV**

Log 1/R

 $\text{cm}^{-1}$

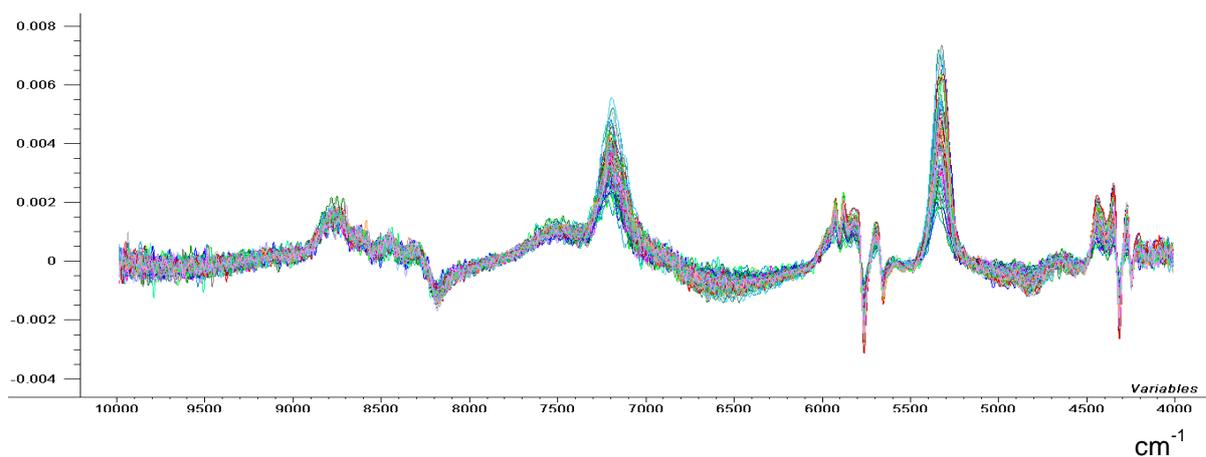
**Figura 8** - Espectros pré-processados por SNV seguida de Suavização Savitzky-Golay com janelas de 7 pontos

Log 1/R



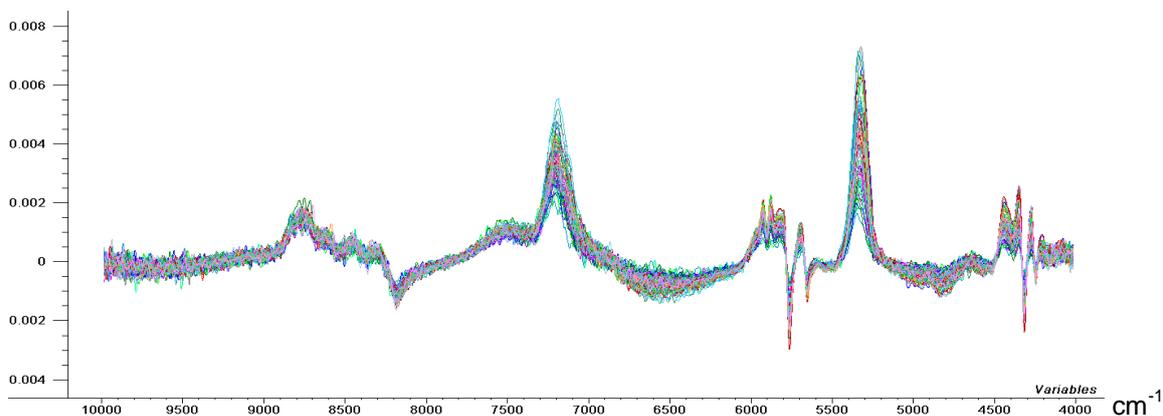
**Figura 9** - Espectros pré-processados por 1°Derivada com filtro Savitzky-Golay (janelas de 15 pontos e polinômio de 2° grau)

Log 1/R

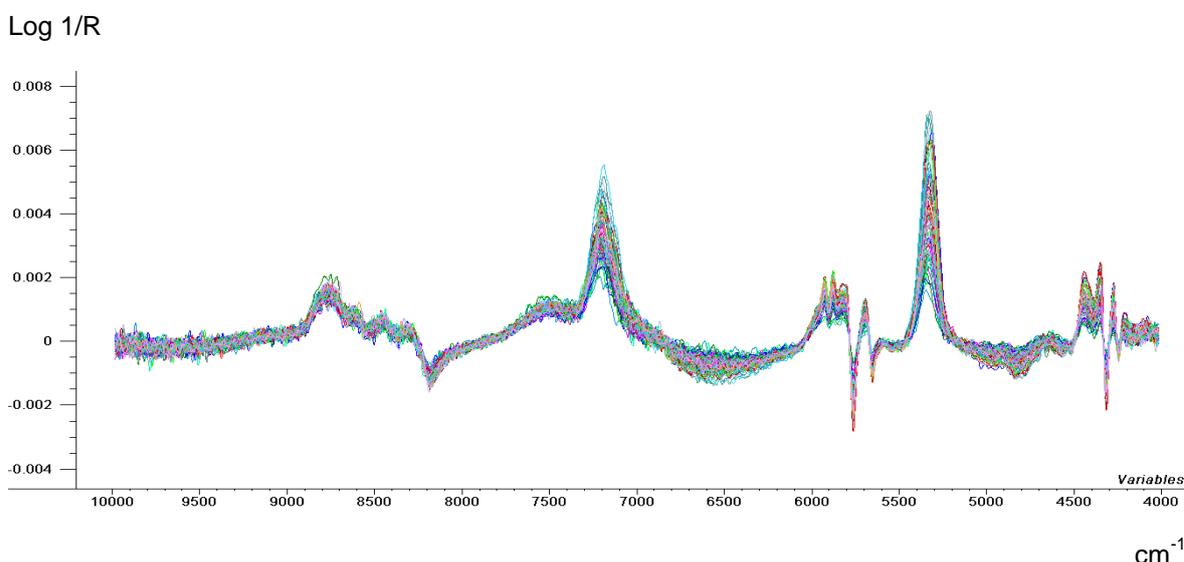


**Figura 10** - Espectros pré-processados por 1°Derivada com filtro Savitzky-Golay (janelas de 17 pontos e polinômio de 2° grau)

Log 1/R



**Figura 11** - Espectros pré-processados por Derivadas com filtro Savitzky- Golay (janelas de 19 pontos e polinômio de 2° grau)



### 3.4.2 Calibração Multivariada

Para cada pré-processamento aplicado foi construído o modelo de calibração PLS para determinação de proteínas e lipídios, conforme a Tabela 5 e 6, respectivamente.

**Tabela 5** - Valores de RMSECV, RMSEP, Coeficiente de determinação e Variáveis latentes obtidos pelo modelo PLS nos espectros NIR pré-processados para determinação de proteínas em queijo de coalho

Pré-processamentos	Calibração			Predição	
	RMSECV	R <sup>2</sup> <sub>Cal</sub>	VL	RMSEP	R <sup>2</sup> <sub>pred</sub>
MSC	2,984	0,330	1	2,519	0,159
MSC com suavização S.Golay(7pontos)	2,984	0,333	1	2,519	0,159
SNV	2,993	0,329	1	2,497	0,135
SNV com suavização S.Golay(7pontos)	2,993	0,329	1	2,497	0,135
1° Deriv. com filtro S.Golay (15 pontos)	1,265	0,325	4	2,292	0,228
1° Deriv. com filtro S.Golay (17 pontos)	1,508	0,321	4	2,311	0,184
1° Deriv. filtro S.Golay (19 pontos)	1,711	0,282	4	2,153	0,281

Analisando a Tabela 5, percebe-se que os modelos construídos com os espectros derivativos apresentaram os menores valores da raiz quadrada do erro médio quadrático de previsão (RMSEP), por outro lado, os modelos construídos por espectro pré-tratados por Correção do Efeito Multiplicativo (MSC) e MSC com suavização Savitzky-Golay (7pontos) apresentaram menor quantidade de variáveis latentes. Realizando um teste-F com intuito de avaliar a igualdade dos modelos em relação ao RMSEP indica com 95% de confiança que não existe diferença estatisticamente significativa entre os modelos ( $F_{crit}=2,3116$ ).

A Tabela 6 apresenta os valores de RMSECV, RMSEP, Coeficiente de determinação e Variáveis latentes obtidos pelo modelo PLS nos espectros NIR pré-processados para determinação de lipídios em queijo de coalho.

**Tabela 6** - Valores de RMSECV, RMSEP, Coeficiente de determinação e Variáveis latentes obtidos pelo modelo PLS nos espectros NIR pré-processados para determinação de lipídios em queijo de coalho

Pré-processamentos	Calibração			Predição	
	RMSECV	$R^2_{Cal}$	VL	RMSEP	$R^2_{pred}$
MSC	2,097	0,696	3	2,028	0,604
MSC com suav. S.Golay(7 pontos)	2,101	0,695	3	2,028	0,604
SNV	2,098	0,696	3	2,027	0,603
SNV com suav. S.Golay(7 pontos)	2,102	0,694	3	2,021	0,603
1° Deriv. filtro S.Golay (15 pontos)	1,983	0,711	4	1,619	0,611
1° Deriv. filtro S.Golay (17 pontos)	1,371	0,862	4	1,393	0,689
1° Deriv. S.Golay (19 pontos)	1,455	0,854	4	1,395	0,581

Analisando a Tabela 6, temos que os modelos construídos com os espectros derivativos apresentaram os menores valores de RMSEP e maiores valores de  $R^2_{cal}$ , por outro lado, os modelos construídos por espectro pré-tratados

por MSC, MSC seguida de suavização Savitzky-Golay (7pontos), SNV e SNV com suavização Savitzky-Golay (7pontos) apresentaram menor quantidade de variáveis latentes. Realizando um teste-F com intuito de avaliar a igualdade dos modelos em relação ao RMSEP indica com 95% de confiança que não existe diferença estatisticamente significativa entre os modelos ( $F_{crit}=2,3116$ ).

Desta forma, ao nível de 5% de significância, temos que todos os modelos são iguais quando comparados em relação aos seus RMSEP.

### 3.4.3 Calibração Multivariada usando iPLS

#### 3.4.3.1 Escolha do modelo de Calibração Multivariada para o teor de proteínas de queijo de coalho

O desempenho do iPLS foi comparado com o modelo global PLS (modelo que apresentou o menor RMSEP e maior Coeficiente de determinação para predição: os espectros pré-processados com 1° Derivada com filtro Savitzky-Golay janelas de 19 pontos e polinômio de 2° grau), por meio do teste F. Os resultados são apresentados na Tabela 7.

**Tabela 7** - Parâmetros dos modelos de calibração multivariada para determinação de proteínas

Parâmetros	PLS	iPLS_5	iPLS_10	iPLS_15
RMSECV (%)	1,711	2,421	2,834	3,049
VL	4	5	3	2
R <sup>2</sup> cal	0,282	0,579	0,423	0,333
RMSEP (%)	2,153	2,728	2,329	2,448
R <sup>2</sup> pred	0,281	0,359	0,090	0,094

Em linhas gerais, o método global PLS produziu menores erros de predição quando comparado aos modelos de seleção de variáveis (iPLS). Vale ressaltar, que o iPLS – 5 intervalos obteve maiores valores de R<sup>2</sup> cal e R<sup>2</sup> pred. Realizando

um teste-F com intuito de avaliar a igualdade dos modelos em relação ao RMSEP, ao nível de 5% de significância, temos que todos os modelos são iguais quando comparados em relação aos seus RMSEP.

Devido aos baixos valores de correlação e altos valores de RMSEP, os resultados obtidos mostram que não foi possível modelar a propriedade proteína utilizando toda a faixa (PLS) ou intervalos de variáveis (iPLS), embora a literatura reporte resultados satisfatórios desta propriedade para outros tipos de queijos (MADALOZZO et al., 2015; GONZÁLEZ-PÉREZ et al., 2008; KAROUI et al., 2006).

Os métodos validados por Madalozzo e cols (2015); Karoui e cols (2006); Sauer-Leal e cols (2008) utilizaram queijos tipo ricota, emental e prato respectivamente, queijos que possuem processo de fabricação padronizado, fato este que contribui para o estabelecimento do modelo de calibração multivariada, haja vista as amostras apresentam maiores uniformidades referentes à composição química do alimento.

Vale ressaltar que a faixa de variação do teor de proteínas, foi devido provavelmente à falta de padronização do processo produtivo do queijo de coalho.

#### 3.4.3.2 Escolha do modelo de Calibração Multivariada para o teor de lipídios de queijo de coalho

O desempenho do iPLS foi comparado com o modelo global PLS (modelo que apresentou o menor RMSEP e maior Coeficiente de determinação para predição), por meio do teste F, os resultados são apresentados na Tabela 8.

**Tabela 8** - Parâmetros dos modelos de calibração multivariada para determinação de lipídios

Parâmetros	PLS	iPLS_5	iPLS_10	iPLS_15
<b>RMSECV (%)</b>	1,371	2,613	2,553	3,023
<b>VL</b>	4	4	4	2
<b>R<sup>2</sup> cal</b>	0,862	0,527	0,555	0,368
<b>RMSEP (%)</b>	1,393	2,684	2,786	3,022
<b>R<sup>2</sup> pred</b>	0,689	0,418	0,528	0,368

Para o teor de lipídios o modelo global PLS apresentou melhores resultados com menor RMSEP e RMSECV, maiores  $R^2$  de calibração e predição.

Realizando um teste-F com intuito de avaliar a igualdade dos modelos em relação ao RMSEP, ao nível de 5% de significância, temos que todos os modelos são iguais quando comparados em relação aos seus RMSEP. Assim, o modelo PLS apresentou um  $R^2_{cal}$  e  $R^2_{pred}$  maior, sendo portanto o modelo escolhido.

Botelho e colaboradores (2013), que desenvolveram um método robusto para o controle de qualidade do queijo mussarela utilizando o NIR e calibração multivariada, obtiveram para determinação de lipídios um RMSEP de 3,2% e 7 variáveis latentes e com eliminação de outliers RMSEP 2,7% e 8 variáveis latentes, valores maiores que o encontrado neste estudo. Karoui e colaboradores (2008) analisaram a viabilidade do uso do NIR associada à calibração multivariada para determinação de parâmetros químicos em queijo emental e encontraram um RMSEP DE 3,93%, maior do que o presente neste trabalho, porém eles obtiveram um  $R^2_{cal}$  de 0,92 e  $R^2_{pred}$  de 0,94, ambos maiores que neste estudo.

Um teste t- pareado também foi utilizado para verificar a igualdade de médias entre os valores preditos e os de referência. Utilizando o nível de 5% de significância, o teste apresentou valor p de 0,8049, temos que as médias não diferem estatisticamente. Conclui-se então que as metodologias para obtenção do teor de lipídios em queijo de coalho são equivalentes.

#### **4.CONCLUSÕES**

Através dos resultados dos teores de lipídios e proteínas obtidos pela metodologia de referência, verificou-se que apresentaram concordância com vários trabalhos científicos e em contrapartida divergiram de alguns estudos, fato que pode está atribuído à diversificação da metodologia para manufatura do queijo de coalho.

Em relação ao teor de proteínas não foi possível obter um modelo de calibração multivariado adequado, embora para outras variedades de queijo, a mesma metodologia (espectros NIR e calibração PLS) tenha se aplicado com sucesso. Provavelmente, esteja relacionada com a falta de padronização da produção do queijo de coalho, haja vista a legislação brasileira não estabelece padrões para os teores de proteínas.

Para o teor de lipídios em queijos de coalho, o modelo PLS obteve resultados de previsão satisfatórios, embora para outras variedades de queijos, apresentaram-se significativamente menores. Além disso, produziu erro médio de previsão inferior ao encontrado em alguns estudos na literatura.

## 5. REFERÊNCIAS

ANDUEZA,D.; AGABRIEL,C.; CONSTANT,I. et al., Using visible or near infrared spectroscopy (NIRS) on cheese to authenticate cow feeding regimes. **Food Chemistry**.v.141,p.209-214. 2013.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of AOAC International**, 16<sup>th</sup> ed., Maryland: AOAC International, 1997.

BEZERRA, J.D.C. Avaliação da qualidade do queijo de “coalho” artesanal fabricado em Jucati-Pe. **Revista Eletrônica de Extensão**. EXTENSIO.v.6,n.8.2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº30 de 26 de junho de 2001. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo de Coalho**.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.Secretaria da Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal. Instrução Normativa nº68 de 12 de dezembro de 2006. **Métodos Analíticos Oficiais Físico-químicos, para controle de Leite e Produtos Lácteos**.

BOTELHO,B.G.; MENDES, B.F.; SENA, M.M., Development and Analytical Validation of Robust Near-Infrared Multivariate Calibration Models for the Quality Inspection Control of Mozzarella Cheese. **Food Analytical Methods**. v.6,n.1,p.881-891. 2013.

CEVOLI, C.; GORI, A.; NOCETTI, M. et al. FT-NIR and FT-MIR spectroscopy to discriminate competitors, non compliance and compliance grated Parmigiano Reggiano cheese. **Food Research International**. v.52.n.1.p.214-220. 2013.

CHEN,G.; KOGAOGU-VURMA; HARPER,W.J et al., Application of infrared microspectroscopy and multivariate analysis for monitoring the effect of adjunct cultures during Swiss cheese ripening. **Journal Dairy Science**.v.92,n.8,p.3575-3584. 2009.

CORREIA, Liz Juli Hiluey. **Diagnóstico das condições ambientais e avaliação dos riscos microbiológicos no processamento de queijo de coalho**. 2011.207f. Tese (doutorado em Engenharia de Processos) – curso de pós-graduação em Ciência e Tecnologia, Universidade Federal de Campina Grande. Paraíba.

FREITAS,W.C.; TRAVASSOS,A.E.R.; MACIEL, J.F. Characterization of lactic acid bacteria in coalho cheese and antagonism to some pathogenic food-related bacteria. . **Revista Instituto Adolfo Lutz**.v.72,n.2,p.131-137. 2013.

GALVÃO, R. K. H.; ARAUJO, M. C. U.; JOSÉ, G. E.; PONTES, M. J. C.; SILVA, E. C.; SALDANHA, T. C. B. A method for calibration and validation sub set partitioning. **Talanta**. 67: 736, 2005.

GONZÁLEZ-MARTIN, I.; GONZALEZ-PERES, C.; HERNÁNDEZ-HIERRO et al., Use of NIRS technology with a remote reflectance fibre – optic probe for predicting major components in cheese. **Talanta**. v.75,p.351-355. 2007

GONZÁLEZ-MARTIN, I.; HERNÁNDEZ-HIERRO; GONZALEZ-PERES, C. et al., Potential of near infrared spectroscopy for the analysis of volatile components in cheeses. **Food Science and Technology**. v.55,p.666-673,. 2014.

KAROUI, R.; MOUAZEN, A.M.; DUFOUR, E. et al., Chemical characterization of Emmental cheeses by near infrared spectroscopy using chemometric tools. **International Dairy Journal**. v.16,n.1,p.1211-121,. 2006.

KRAGGERUD, H.; NAES, T.; ABRAHAMSEN, R.K., Prediction of sensory quality of cheese during ripening from chemical and spectroscopy measurements. **International Dairy Journal**. v.34, p.6-18. 2014.

MADALOZZO, E.S.; SAUER, E.; NAGATA, N. Determination of fat, protein and moisture in ricota cheese by near infrared spectroscopy and multivariate calibration. **Journal Food Science Technology**. v.52,n.3,p.1649-1655. .2015.

MAMEDE, M.E.O.; VIANA, A.C.; SOUZA, A.L.C. et al. Estudo das características sensoriais e da composição química de queijo de coalho industrializado. **Revista Instituto Adolfo Lutz**.v.69,n.3,p364-370. 2010.

NASSU, R.T.; ARAÚJO, R.S.; GUEDES, C.G.M. et al., **Diagnóstico das condições de processamento e caracterização físico-química de queijos regionais e manteiga no Rio Grande do Norte**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical. 2003.

PERRY. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Química Nova**. v.27, n. 2, p.293-300. 2004.

SANTOS, B.M.; OLIVEIRA, M.E.G.; SOUSA, Y.R.F. et al., Caracterização físico-química e sensorial de queijo de coalho produzido com mistura de leite de cabra e de vaca. **Revista Instituto Adolfo Lutz**. v.70,n.3,p.302-310.2011.

SAUER – LEAL, E. OKADA, F.M., PERALTA-ZAMORA, P. Caracterização físico-química de queijo prato por espectroscopia no infravermelho e regressão de mínimos quadrados parciais. **Química Nova**.v.31,n.7.p.1621-1625. 2008.

SILVA, M.C.D.; RAMOS, A.C.S.; MORENO, I. et al., Influência dos procedimentos de fabricação nas características físico-químicas, sensoriais e microbiológicas de queijo de coalho. **Revista Instituto Adolfo Lutz**.v.69,n.2,p214-221. 2010.

SILVA, Gilvan; SILVA, Argélia Maria Araújo Dias; FERREIRA, Maria Presciliana de Brito. **Processamento de Leite**. 1ª Ed. Recife: EDUFRPE. 2012.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Princípios de Análise instrumental**, 6ª ed. Bookman: Porto Alegre. 2009.

SOUZA, A.M.; BREITFREITZ, M.C.; FILGUEIRAS, P.R., Experimento didático de quimiometria para calibração multivariada na determinação de paracetamol em comprimidos comerciais utilizando espectroscopia no infravermelho próximo: um tutorial, parte II. **Quim. Nova**. v. 36, n.7, p.1057-1065. 2013.

SUBRAMANIAN, A.; HARPER, W.J.; RODRIGUEZ-SOANA, L.E., Rapid prediction of composition and flavor quality of cheddar cheese using ATR-FTIR spectroscopy. **Journal of Food Science**. v. 74, n.3, p.292-297. 2009.

VENTUROSO, R.C.; ALMEIDA, K.E.; RODRIGUES, A.M. et al., Determinação da composição físico-química de produtos lácteos: estudo exploratório de comparação dos resultados obtidos por metodologia oficial e por ultra-som. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. . v. 43, n.4, p.601-613. 2007.