



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

Área de Concentração: Ciência de Alimentos

**VERIFICAÇÃO DE AUTENTICIDADE EM LEITE E MUÇARELA DE BÚFALA POR
MEIO DE FTIR E MEDIDAS ANALÍTICAS ASSOCIADAS A QUIMIOMETRIA**

ITAPETINGA
BAHIA- BRASIL
2019

BEN-HUR RAMOS FERREIRA GONÇALVES

**VERIFICAÇÃO DE AUTENTICIDADE EM LEITE E MUÇARELA DE BÚFALA POR
MEIO DE FTIR E MEDIDAS ANALÍTICAS ASSOCIADAS A QUIMIOMETRIA**

Tese apresentada à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Área de Concentração em Ciência de Alimentos, Linha de Pesquisa em Química e Bioquímica de Alimentos e Subprodutos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sibelli Passini Barbosa Ferrão

Co-Orientador: Prof. Dr. Antonio Silvio do Egito

Co-Orientador: Prof. Dr. Leandro Soares Santos

**ITAPETINGA
BAHIA - BRASIL
2019**

637.30287 Gonçalves, Ben-Hur Ramos Ferreira.
G624v Verificação de autenticidade em leite e muçarela de búfala por meio de FTIR e medidas analíticas associadas a quimiometria. / Ben-Hur Ramos Ferreira Gonçalves. – Itapetinga-BA: UESB, 2019.

86f.

Tese apresentada à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Área de Concentração em Ciência de Alimentos, Linha de Pesquisa em Química e Bioquímica de Alimentos e Subprodutos. Sob a orientação da Prof^a. D. Sc. Sibelli Passini Barbosa Ferrão e coorientação do Prof. D. Sc. Antonio Silvio do Egito e Prof. D. Sc. Leandro Soares Santos.

1. Queijo muçarela de búfala – Espectroscopia – Autenticidade. 2. Leite de búfala - Análise multivariada. 3. Queijo - Adultrações. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - Programa de Pós-Graduação de Doutorado em Engenharia e Ciências de Alimentos, *Campus* de Itapetinga. II. Ferrão, Sibelli Passini Barbosa. III. Egito, Antonio Silvio do. IV. Santos, Leandro Soares. V. Título.

CDD(21): 637.30287

Catálogo na Fonte:

Adalice Gustavo da Silva – CRB 535-5^a Região
Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para desdobramentos por Assunto:

1. Queijo muçarela de búfala – Espectroscopia – Autenticidade
2. Leite de búfala - Análise multivariada
3. Queijo - Adultrações



Áreas de Concentração: Engenharia de Alimentos
Ciência de Alimentos

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Título: VERIFICAÇÃO DE AUTENTICIDADE EM LEITE E MUÇARELA DE BÚFALA POR MEIO DE FTIR E MEDIDAS ANALÍTICAS ASSOCIADAS A QUIMIOMETRIA.

Autor (a): BEN-HUR RAMOS FERREIRA GONÇALVES

Orientador (a): Prof.ª Dr.ª Sibelli Passini Barbosa Ferrão

Coorientador (a): Prof. Dr. Antonio Silvio do Egito

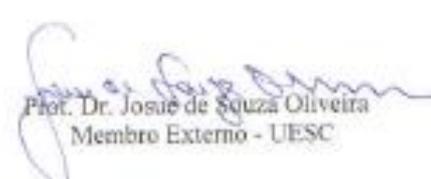
Prof. Dr. Leandro Soares Santos

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de **DOUTOR EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CIÊNCIA DE ALIMENTOS**, pela Banca Examinadora.


Prof. Dr. Leandro Soares Santos
UESB


Prof.ª Dr.ª Renata Cristina Ferreira Botelho
UESB


Prof.ª Dr.ª Gabrielle Cardoso Reis Fontan
UESB


Prof. Dr. Josue de Souza Oliveira
Membro Externo - UESB


Prof.ª Dr.ª Sibelli Passini Barbosa Ferrão
Orientadora - UESB
Presidente da Banca

Itapetinga-BA, 26 de julho de 2019.

“Grandes descobertas científicas são realizadas a partir de um olhar profundo sobre aquilo que se parece óbvio à primeira vista.”

Autor desconhecido

À Deus
Aos meus pais
Aos meus irmãos
À Grazielly

Dedico!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida, pela proteção, oportunidades e por me conceder saúde e sabedoria para conquistar meus objetivos.

Aos meus pais Francisco e Áurea, pelo amor, por sempre me incentivarem a estudar e por constituírem a base da minha educação e valores, pois sem eles, certamente, eu não alcançaria essa vitória. Foi por vocês!

Aos meus irmãos Gabriel e Rafael, que sempre estiveram ao meu lado em toda minha vida, sempre me apoiando e dividindo todos os momentos. Amo vocês!

À minha namorada Grazielly, pelo amor, carinho e companheirismo demonstrado, me acalmando nos momentos difíceis e vivendo comigo intensamente em busca desta conquista. Te amo!

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), pela estrutura de laboratórios e pelos servidores que possibilitaram o desenvolvimento deste trabalho.

À minha orientadora, professora Dr^a. Sibelli Ferrão, pela orientação e contribuição intelectual e, principalmente, pela confiança depositada em mim. Agradeço também pela compreensão durante o último ano do Doutorado.

Aos meus co-orientadores, professor Dr. Leandro Soares e Dr. Antonio Silvio do Egito, pela contribuição, ampliando meus conhecimentos e enriquecendo esta pesquisa.

Aos membros da banca examinadora por aceitarem fazer parte da avaliação deste trabalho.

Ao Grupo de Estudos em Leite (GEL), em especial Jô e Dani, pelos muitos auxílios prestados nos momentos de necessidade.

À Capes pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Laticínio EN, produtos Pytty, em especial Seu Elias, Donas Nilzete e Hudson, pela concessão da matéria-prima utilizada nesta pesquisa.

Aos meus familiares e a minha cunhada Olga pela preocupação e torcida durante este período.

Aos mais novos colegas da UFSB, em especial ao Dr. Marcelo Santos e Dr. Fernando Soares, pela compreensão durante este período.

A todos aqueles que por ventura não tenham sido citados, mas que com certeza contribuíram de forma significativa para a realização deste trabalho.

Muito Obrigado!

SUMÁRIO

CAPÍTULO I: REFERENCIAL TEÓRICO

1. Introdução.....	17
2. Revisão Bibliográfica.....	18
2.1. Leite de búfala.....	18
2.2. Muçarela de búfala.....	19
2.3. Adulterações em muçarela de búfala.....	20
2.4. Espectroscopia no infravermelho médio com transformada de Fourier (FTIR).....	22
2.5. Quimiometria aplicada na detecção de adulterações em alimentos.....	26
2.5.1. Análise de componentes principais (ACP).....	27
2.5.2. Análise discriminante (AD).....	28
2.5.3. Regressão linear múltipla (RLM).....	29
2.5.4. Regressão por mínimos quadrados parciais (PLS).....	30
2.5.5. Redes neurais artificiais (RNA).....	30
3. Referências.....	33

CAPÍTULO II: OBJETIVO

1.1. Objetivo Geral.....	41
1.2. Objetivos Específicos.....	41

CAPÍTULO III: Espectroscopia no infravermelho médio, composição química e características físico-químicas associadas com análises multivariadas para quantificação de leite de vaca em leite de búfala

Resumo Gráfico.....	43
Resumo.....	45
Introdução.....	46
Experimental.....	47
Obtenção das amostras e elaboração das formulações.....	47
Composição química, características físico-químicas e obtenção dos espectros na região do infravermelho médio (FTIR).....	48

Quimiometria.....	48
Análise de componentes principais (ACP).....	48
Regressão linear múltipla (RLM).....	49
Regressão por mínimos quadrados parciais (PLS).....	49
Resultados e Discussão.....	50
Composição química e características físico-químicas.....	50
Espectros na região do infravermelho médio (FTIR) das amostras de leite.....	51
Quimiometria.....	53
Análise de componentes principais (ACP).....	53
Regressão linear múltipla (RLM).....	58
Regressão por mínimos quadrados parciais (PLS).....	59
Conclusões.....	61
Agradecimentos.....	61
Referências.....	61

CAPÍTULO IV: Avaliação proteômica por FTIR-ATR, composição química e características físico-químicas combinadas com quimiometria para verificação de autenticidade em muçarela de búfala

Destaques.....	65
Resumo.....	65
Abreviações.....	66
1. Introdução	67
2. Material e métodos.....	68
2.1. Obtenção do leite e produção dos queijos muçarela	68
2.2. Composição química e características físico-químicas	69
2.3. Extração dos peptídeos solúveis em água (PSA)	69
2.4. Obtenção dos espectros na região do infravermelho médio (FTIR-ATR).....	69
2.5. Análises estatísticas multivariadas.....	70
3. Resultados e discussão.....	71
3.1. Composição química e características físico-químicas.....	71
3.2. Espectros (FTIR-ATR) dos queijos e PSA.....	73
3.3. Análises estatísticas multivariadas.....	75
3.3.1. Composição química e características físico-químicas.....	75

3.3.2. FTIR-ATR dos queijos e PSA.....	79
3.3.3. Verificação da qualidade e autenticidade de amostras comerciais de muçarela de búfala.....	81
4. Conclusões.....	82
Agradecimentos.....	83
Financiamento.....	83
Referências.....	83

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I: REFERENCIAL TEÓRICO

Tabela 1: Composição média dos leites de vaca e búfala 18

Tabela 2: Números de onda de alguns tipos de ligações químicas 23

CAPÍTULO III: Espectroscopia no infravermelho médio, composição química e características físico-químicas associadas com análises multivariadas para quantificação de leite de vaca em leite de búfala

Tabela 1: Valores mínimos e máximos, média e desvio padrão das variáveis utilizadas para construção da matriz A_1 (amostras de leite bubalino, adulteradas e bovino)..... 50

CAPÍTULO IV: Avaliação proteômica por FTIR-ATR, composição química e características físico-químicas combinadas com quimiometria para verificação de autenticidade em muçarela de búfala

Tabela 1: Valores mínimos e máximos, média e desvio padrão das variáveis dos queijos muçarela (0% a 100%)..... 72

Tabela 2: Número de observações em relação a composição química e características físico-químicas dos queijos e percentuais de classificação por grupo no treinamento (T) e validação (V)..... 78

Tabela 3: Arquitetura das redes para os dados espectrais (FTIR-ATR) dos queijos e PSA..... 80

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I: REFERENCIAL TEÓRICO

Figura 1: Princípio de funcionamento do FTIR..... 24

CAPÍTULO III: Espectroscopia no infravermelho médio, composição química e características físico-químicas associadas com análises multivariadas para quantificação de leite de vaca em leite de búfala

Figura 1: Espectros de FTIR das amostras de leite de búfala e vaca..... 52

Figura 2: Espectros de FTIR nas regiões entre 3000 cm^{-1} e 2800 cm^{-1} e entre 1800 cm^{-1} e 1000 cm^{-1} 53

Figura 3: Gráficos bidimensionais de dispersão das amostras de búfala e vaca: (a) composição química e características físico-químicas (matriz A_1); (b) absorvância dos picos dos espectros (matriz A_2)..... 54

Figura 4: ACP das amostras de leite adulteradas (10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% e 90%), bubalinas e bovinas em relação à composição química e características físico-químicas..... 56

Figura 5: ACP das amostras de leite adulteradas (10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% e 90%), bubalinas e bovinas em relação aos picos dos espectros (FTIR)..... 57

Figura 6: (a) Coeficientes de β da equação de regressão; (b) correlação entre valores reais e preditos..... 58

Figura 7: Correlação entre valores reais e preditos gerados pelo modelo de PLS..... 59

CAPÍTULO IV: Avaliação proteômica por FTIR-ATR, composição química e características físico-químicas combinadas com quimiometria para verificação de autenticidade em muçarela de búfala

Figura 1: (a) Espectros obtidos em FTIR-ATR das amostras de queijo muçarela de búfala e vaca. (b) Regiões selecionadas entre 3600 cm^{-1} e 3100 cm^{-1} e 1700 cm^{-1} e 950 cm^{-1} para classificação entre amostras de búfala, adulteradas (10% a 90%) e vaca..... 73

Figura 2: (a) Espectros obtidos em FTIR-ATR de PSA extraídos de queijos muçarela de búfala e vaca. (b) Espectros (FTIR-ATR) em faixa selecionada entre 1720 cm^{-1} e 680 cm^{-1} de PSA extraídos dos queijos muçarela de búfala, adulteradas (10% a 90%) e muçarela de vaca..... 74

Figura 3: ACP dos queijos muçarela de búfala e vaca em relação à composição química e características físico-químicas..... 76

Figura 4: ACP das amostras de queijo adulteradas (10% a 90%), bubalinas e bovinas em relação à composição química e características físico-químicas..... 77

Figura 5: (a) Coeficientes de β da equação de RLM para os dados de composição química e características físico-químicas. (b) Correlação entre valores reais e preditos gerada pelo modelo de RLM..... 79

Figura 6: RMSET e RMSEV em função do número de ciclos nas etapas de treinamento e validação das redes de melhores arquiteturas testadas. (a) queijos muçarela. (b) PSA..... 80

RESUMO

GONÇALVES, B. R. F. **Verificação de autenticidade em leite e muçarela de búfala por meio de FTIR e medidas analíticas associadas a quimiometria.** Itapetinga – BA: UESB, 2019. 86 p. (Tese – Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos).*

A sazonalidade na produção de leite bubalino associada ao preço elevado quando comparado ao leite de vaca são causas que proporcionam possibilidades de adulterações em muçarela de búfala. Objetivou-se utilizar avaliação proteômica e medidas analíticas associadas à quimiometria para detectar a presença de leite de vaca em muçarela de búfala. Foram produzidos queijos muçarela exclusivamente com leite de búfala e vaca e com inclusões crescentes de leite bovino ao bubalino (10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% e 90%), em 15 repetições de cada formulação, totalizando 165 amostras de queijos que foram congeladas com 20 dias após a data de fabricação para padronização de reações proteolíticas. Foram coletados 11 queijos comerciais de muçarela de búfala. Peptídeos solúveis em água foram extraídos das amostras de queijo muçarela e avaliados por espectroscopia no infravermelho médio. Amostras de leite e queijo foram avaliadas em relação à composição química (teores de água, gordura, proteína, lactose (em amostras de leite), sólidos totais, sólidos desengordurados, pH e espectroscopia no infravermelho médio) e características físico-químicas (acidez e cor instrumental (em amostras de queijos)). Os dados obtidos foram analisados por quimiometria (análise de componentes principais, análise discriminante, regressão linear múltipla, regressão por mínimos quadrados parciais e redes neurais artificiais) para separação/classificação de amostras em grupos característicos, diferenciação entre as formulações e predições das quantidades de leite de vaca. Foram gerados gráficos de dispersão, modelos matemáticos de discriminação, regressão linear múltipla e regressão por mínimos quadrados parciais, além de redes neurais que, em conjunto, foram capazes de detectar a presença de leite de vaca em amostras de leite e queijo muçarela, classificando-as em adulteradas ou não adulteradas. Os resultados desta pesquisa mostraram-se importantes para auxiliar na detecção de adulterações por adição de leite de vaca em leite e queijo muçarela de búfala a partir da aplicação de espectroscopia no infravermelho médio associado à quimiometria.

Palavras-chave: adulterações; análise multivariada; espectroscopia; FTIR; queijo.

* Orientadora: Sibelli Passini Barbosa Ferrão, Dra., UESB. Co-orientador: Antonio Silvio do Egito, Dr., EMBRAPA. Co-orientador: Leandro Soares Santos, Dr., UESB.

ABSTRACT

GONÇALVES, B. R. F. **Verification of authenticity in milk and buffalo mozzarella by FTIR and analytical measures associated with chemometrics.** Itapetinga – BA: UESB, 2019. 86 p. (Thesis – Doctorate Degree in Food Engineering and Science).*

The seasonality in the production of buffalo milk associated with the high price when compared to cow's milk are causes that offer possibilities of adulterations in buffalo mozzarella. The objective was to use proteomic evaluation and analytical measures associated with chemometrics to detect the presence of cow's milk in buffalo mozzarella. Cheeses were exclusively produced with buffalo and cow's milk and with bovine milk (10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% and 90%) 15 replicates of each formulation, totaling 165 cheese samples that were frozen with 20 days after the date of manufacture for standardization of proteolytic reactions. Eleven commercial buffalo cheeses were collected. Water-soluble peptides were extracted from the cheese samples and evaluated by mid-infrared spectroscopy. Milk and cheese samples were evaluated for chemical composition (water, fat, protein, lactose (in milk samples), total solids, defatted solids, pH and medium infrared spectroscopy) and physico-chemical characteristics (acidity and instrumental color (in cheese samples)). The data obtained were analyzed by chemometrics (principal components analysis, discriminant analysis, multiple linear regression, partial least squares regression and artificial neural networks) for separation / classification of samples in characteristic groups, differentiation between formulations and predictions of milk quantities of cow. Scatter plots, mathematical models of discrimination, multiple linear regression and partial least squares regression were generated, as well as neural networks that together were able to detect the presence of cow's milk in milk and cheese samples, classifying - adulterated or unadulterated. The results of this research were important to aid in the detection of adulterations by addition of cow's milk in buffalo milk and cheese from the application of medium-infrared spectroscopy associated with chemometrics.

Key-words: adulterations; spectroscopy; FTIR; cheese; chemometric.

* Advisor (a): Sibelli Passini Barbosa Ferrão, Dra., UESB. Co-advisor: Antonio Silvio do Egito, Dr., EMBRAPA. Co-advisor: Leandro Soares Santos, Dr., UESB.

Capítulo I

Referencial Teórico

1. INTRODUÇÃO

Por conta de suas características nutricionais, sensoriais e tecnológicas, o leite de búfala é uma boa alternativa de matéria-prima para a fabricação de derivados lácteos, em especial o queijo muçarela (SANTOS et al., 2013). No Brasil, em virtude da sazonalidade em sua produção, com maiores ofertas em determinada época do ano, geralmente no outono-inverno, associada ao preço elevado quando comparado ao leite de vaca, podem ocorrer misturas de leites das espécies bovina e bubalina para produção dos derivados, o que consiste em fraude alimentar por adulteração quando não existir a presença da informação da mistura na embalagem dos produtos (CZERWENKA et al., 2010).

Boa parte da população preza pela confiança de que está adquirindo alimentos com as reais características que são especificadas em seus rótulos. Nas embalagens, a origem, quantidade e qualidade das matérias-primas devem ser relatadas, pois a adição não mencionada de leite de vaca em leite de búfala fere os direitos dos consumidores e a legislação em vigor (BRASIL, 2017). Nesse contexto, torna-se necessário utilizar técnicas laboratoriais existentes objetivando detectar com maior facilidade, precisão e rapidez tais adulterações (JAISWAL et al., 2015; LOHUMI et al., 2015).

A busca por autenticidade em muçarela de búfala geralmente baseia-se em metodologias que estudam as características proteômicas, tais como proteínas e suas frações, peptídeos e aminoácidos. Diferentes métodos podem ser aplicados para identificar leite de vaca em leite de búfala e/ou muçarela de búfala, com destaques para ensaios eletroforéticos (VELOSO et al., 2002; MAYER, 2005; GONÇALVES et al., 2016), cromatográficos (ENNE et al., 2005; GONÇALVES et al., 2016) e espectrometria de massas (COZZOLINO et al., 2001, 2002).

Apesar de possuírem boa sensibilidade, precisão e confiabilidade nos resultados, estes métodos proteômicos podem ser complementados para utilização em análises de autenticidade de alimentos em indústrias e/ou laboratórios, principalmente por conta de infraestrutura, custos operacionais, dificuldades no preparo de amostras e reagentes e demora na obtenção dos resultados. Nesse aspecto, a Espectroscopia no Infravermelho Médio por Transformada de Fourier (FTIR) pode ser utilizada gerando respostas rápidas, precisas e com pouca preparação das amostras (NICOLAOU et al., 2010; SANTOS et al., 2013; CONCEIÇÃO et al., 2019).

Medidas analíticas quando combinadas com a quimiometria podem permitir o desenvolvimento de modelos estatísticos e matemáticos com boas performances para detectar de maneira rápida a presença de leite de vaca em muçarela de búfala (DOMINGO, 2014).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Leite de búfala

Entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de vacas saudáveis, bem alimentadas e descansadas. O leite de outros animais deve denominar-se segundo a espécie de que procede (BRASIL, 2017), devendo o leite de bubalinos ser denominado como leite de búfala.

O leite de búfala é o segundo mais produzido no mundo, representando cerca de 14% da produção global, ficando atrás somente do leite bovino que é responsável por 83% (FAOSTAT, 2018). O rebanho bubalino no Brasil tem aumentado em torno de 12,7% ao ano, enquanto a produção brasileira de leite de búfala cresce, em média, 25% ao ano desde 2001, com quantidades superiores a 92 milhões de litros por ano, indicando ser uma boa atividade no setor de lácteos nacional (IBGE, 2018). Um dos principais fatores que está impulsionando a bubalinocultura é o aproveitamento do leite como matéria-prima para a produção de derivados, proporcionando maior rendimento industrial associado com boas características de qualidade nutricional e sensorial (SHAKERIAN et al., 2016).

A composição química e características físico-químicas do leite (Tabela 1) são influenciadas por diversos fatores, como espécie, raça, lactação, idade, manejo, alimentação e sanidade dos animais, condições climáticas e período do ano (CZERWENKA et al., 2010), o que justifica a grande variação dos valores divulgados pelos pesquisadores.

Tabela 1: Composição média dos leites de vaca e búfala.

Tipo de leite	Teor de água (%)	Proteína (%)	Gordura (%)	Lactose (%)	ST ¹ (%)	SD ² (%)	Acidez (°Dornic)
Vaca	87,00	3,50	3,80	4,80	13,00	9,20	14-18
Búfala	82,00	4,10	7,50	5,20	18,00	11,50	14-23

FONTE: Adaptado de Pignata et al. (2014). ¹Sólidos Totais. ²Sólidos Desengordurados.

Quando comparado ao leite bovino, o leite de búfala tem gosto doce mais acentuado e coloração mais branca ocasionada pela presença de pequenas quantidades de caroteno (HUSSAIN et al., 2012). Geralmente apresenta maiores teores de proteína, gordura, lactose, sólidos totais (ST), sólidos desengordurados (SD), vitaminas e minerais (PIGNATA et al., 2014; MANUELIAN et al., 2017), tendo seus constituintes mais concentrados, o que proporciona vantagens em relação ao rendimento industrial, sendo que o seu aproveitamento pode superar o leite bovino em até 40% (BUZI et al., 2009).

As proteínas do leite de búfala são constituídas por cerca de 77% - 79% de caseínas e 21% - 23% de proteínas do soro (SHAKERIAN et al., 2016). Para a produção de queijos o leite de búfala

retém menos água e é coagulado mais rapidamente, além de apresentar maior rendimento quando comparado ao leite de vaca. Muitas vezes é necessário correlacionar o teor de proteína com subprodutos gerados a partir de reações de proteólise, tais como, peptídeos e aminoácidos, pois podem auxiliar na verificação da autenticidade de leites e/ou queijos das espécies em estudo (MOORE et al., 2012).

A gordura do leite é o constituinte mais variável e um dos mais importantes economicamente, com valores entre 5,5% e 8,0% para o leite de búfala e 3,0% e 5,0% para o leite de vaca, a depender de fatores como raça, alimentação e estágio de lactação dos animais e região, clima e vegetação da localidade onde se encontram. Os lipídios podem ser extraídos do leite sem promover grandes modificações nos demais constituintes. Esta etapa do processo visa, de certa forma, além de padronizar o teor de gordura do leite e obter matéria-prima para fabricação de outros derivados lácteos, promover a minimização das diferenças quantitativas entre os leites das duas espécies para a produção dos queijos (WALSTRA et al., 2001).

A lactose é o carboidrato característico do leite, sendo um dissacarídeo composto por glicose e galactose. Possui importância nos processos tecnológicos de acidificação do leite e derivados, por meio da fermentação láctica, sendo importante nas etapas de fabricação de iogurtes, manteigas e queijos (SAMEEN et al., 2008). Em rebanhos de bubalinos criados no estado da Bahia, os teores de lactose variam de 4,7% a 5,5%, enquanto o leite de vaca apresenta teores variando de 4,0% a 4,8% (PIGNATA et al., 2014).

A acidez do leite é quantificada de acordo com a presença de ácidos, caseínas, fosfatos, albumina, dióxido de carbono e citratos. A elevação da acidez é causada pela hidrólise da lactose por enzimas microbianas, resultando na formação de ácido láctico. Para o leite bubalino, os valores de acidez geralmente são elevados quando comparados com o leite bovino, devido à caseína, que por conter aminoácidos com características anfóteras, agem como ácidos na titulação (AHMAD et al., 2008).

Por conta de suas características nutricionais, sensoriais e tecnológicas, o leite de búfala é uma boa alternativa de matéria-prima para a fabricação de queijos, manteiga, iogurtes, entre outros derivados lácteos (HAN et al., 2007; AHMAD et al., 2008).

2.2. Muçarela de búfala

A maior parte do leite de búfala industrializado é utilizado como matéria-prima para produção do queijo muçarela, embora em muitas localidades também é direcionado, em menores quantidades, para fabricação de alguns queijos frescos e/ou maturados, variando de acordo com a região e os hábitos alimentares (CORREDDU et al., 2017).

O queijo muçarela foi originado no Sul da Itália, nas regiões de Campânia, Lazio, Apúlia e Molise, sendo essas localidades as únicas no mundo que possuem o selo da autêntica “*Mozzarella*”, que é uma Denominação de Origem Protegida (DOP) regulamentada por Leis da União Europeia (CZERWENKA et al., 2010). De acordo com as Regulamentações, a verdadeira muçarela deve ser produzida exclusivamente com leite de búfalas italianas (*Bubalus bubalis*) criadas em regiões atribuídas à especificação DOP, além de definições rigorosas de qualidade tanto em relação às características quanto à tecnologia de produção (PETRELA et al., 2015).

Caracteriza-se por ser um queijo de massa filada, onde o queijo é esticado em água com temperaturas superiores a 60°C para que ocorra a fusão da massa e alinhamento paralelo das fibras (NGUYEN et al., 2017), garantindo características próprias de aparência, textura e derretimento da muçarela, além de ser tradicionalmente produzido exclusivamente com leite de búfala integral e não pasteurizado, adicionado de culturas lácteas presentes no soro de leite do dia anterior, apresentar alto teor de gordura na matéria seca ($\geq 52\%$), massa elástica e sabor agradável (LOCCI et al., 2008; APONTE et al., 2010; AHMED et al., 2011), com algumas variações a depender do local de produção. Em relação a umidade pode ser classificado em queijo muçarela de baixa umidade (teores variando entre 45% e 52%) ou alta umidade ($\geq 52\%$) (NGUYEN et al., 2017).

O queijo muçarela de búfala é considerado importante na nutrição humana, devido aos teores relevantes de lipídeos, proteínas, vitaminas e minerais, sendo um produto de alto valor agregado, com crescente aceitação e popularidade no mercado nacional, com demandas tanto para o consumo in natura quanto para utilização na culinária. Com isso, essa demanda de mercado desperta interesse de indústrias do setor de lácteos em incorporar a tecnologia deste produto em sua linha de produção (BUZI et al., 2009).

No entanto, ao mesmo tempo em que ocorre o aumento da oferta e demanda do produto, fraudadores encontram oportunidades para cometerem práticas ilegais na fabricação deste tipo de queijo. Em diversas localidades, existem tentativas de se produzir muçarela de búfala a partir de leite de vaca, adulterando o produto e modificando suas características originais (PISANO et al., 2016).

2.3. Adultrações em muçarela de búfala

A produção do leite de búfala apresenta caráter sazonal, com maiores ofertas normalmente no outono-inverno. Por conta disso, associado ao preço elevado quando comparado ao leite de vaca, ocorrem misturas de leites entre as espécies bovina e bubalina para produção dos derivados, o que configura fraude alimentar quando não existir a presença da informação da mistura na embalagem dos produtos (CZERWENKA et al., 2010).

Adulterações em muçarela de búfala geralmente ocorrem com o objetivo de gerar ganhos financeiros significativos. A adição de leite de vaca ao leite de búfala para fabricação do queijo muçarela é realizada de maneira intencional, sendo facilitada pela falta de fiscalização por parte das autoridades responsáveis associada à inexistência de padrões legais e de uma legislação vigente dedicada ao intuito de impedir que os fraudadores continuem cometendo essas práticas ilegais (DALMASSO et al., 2011).

Uma série de métodos baseados em avaliações proteômicas foram desenvolvidos para detectar esses tipos de fraudes e garantir a autenticidade dos produtos (LOCCI et al., 2008). A focalização isoelétrica (IEF) em gel de poliacrilamida tem sido adotada pela União Europeia como o método oficial de referência para detectar γ_2 -caseína bovina, com detecção limite de 1% (v/v) de leite de vaca em outros tipos de leite (cabra, ovelha e búfala) (COMMISSION REGULATION, 2008). Resultados confiáveis, independente do grau de proteólise, podem ser obtidos na análise de queijos ovinos e caprinos, porém em queijos de búfala a conclusão é incerta, pois peptídeos semelhantes a γ_2 -caseína bovina são gerados a partir da atuação da plasmina na hidrólise do fragmento 106-209 da β -caseína (β -CN) do leite de búfala, ocasionando resultados falso-positivos quando analisados pelo método oficial europeu (PIZZANO et al., 2011).

Addeo et al. (2009), por meio de abordagens imunoquímicas, identificaram diferenças entre a γ_2 -caseína bovina e peptídeos semelhantes a esta fração nos perfis da IEF, baseado no estudo de identificação de variantes da caseína, com o uso de anticorpos que reagem com a γ_2 -caseína bovina e peptídeos gerados a partir da hidrólise da β -CN bovina pela ação da plasmina, porém não reagem com a maioria dos peptídeos resultantes da hidrólise da β -CN bubalina. A técnica apresentou sensibilidade de 0,25% (v/v) de misturas dos leites, podendo ser considerado uma alternativa ao método oficial europeu.

Diante disso, técnicas que permitam checar o tipo de leite utilizado na produção da muçarela são importantes. Vários outros métodos analíticos para detecção de misturas de leites de vaca em leite e/ou queijo bubalino foram adaptados e desenvolvidos, com destaques para eletroforese, cromatografia e espectrometria de massas (ADDEO et al., 2009; GUERREIRO et al., 2013).

Os métodos eletroforéticos oferecem informações sobre as proteínas do leite, sendo utilizados na diferenciação do leite de várias espécies. Uma das mais tradicionais técnicas de eletroforese, realizada em gel de poliacrilamida (PAGE), pode ser utilizada tanto na presença do surfactante dodecil sulfato de sódio (SDS) (SDS-PAGE) quanto de ureia (ureia-PAGE). Com a evolução da tecnologia, técnicas mais sofisticadas foram desenvolvidas, tais como a eletroforese capilar (EC), que permitem redução no tempo de análise e detecções mais precisas no caso de adulterações (EGITO et al., 2006).

Outras técnicas baseadas na análise de proteínas para a identificação do tipo de leite presente nos lácteos, tais como Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de Fase Reversa (RP-HPLC) com Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz – Tempo de Voo (MALDI-TOF) (COZZOLINO et al., 2002) podem ser aplicadas, porém são métodos caros e demorados, portanto não são comumente utilizados em análises de rotina nas indústrias ou órgãos fiscalizadores.

RP-HPLC também pode ser utilizada na separação e identificação de peptídeos em queijos, permitindo o controle de qualidade destes produtos. O estudo de peptídeos solúveis em água (PSA) extraídos das amostras de interesse pode permitir estimar o tipo de leite utilizado na produção de derivados lácteos (GONÇALVES et al., 2016).

Como alguns métodos nem sempre conseguem distinguir o leite de espécies intimamente relacionadas, a exemplo de bovinos e bubalinos, pois apresentam características proteicas semelhantes (ENNE et al., 2005), o estudo de grupos funcionais presentes nos constituintes de leites, queijos e PSA por meio da aplicação de Espectroscopia no Infravermelho Médio com Transformada de Fourier (FTIR) associada a quimiometria pode complementar e facilitar a detecção de leite de vaca em muçarela de búfala.

2.4. Espectroscopia no infravermelho médio com transformada de Fourier (FTIR)

Análise de Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) pode ser definida como uma técnica que permite obter informações sobre a estrutura molecular e ligações químicas de grupos funcionais presentes em constituintes no material em estudo (SKOOG et al., 2001).

É uma técnica de fácil execução, rápida, precisa e não destrutiva, oferecendo vantagens em relação a outras técnicas convencionais. Além do mais, é capaz de fornecer resultados sem a necessidade da utilização de reagentes químicos, evitando prejuízos aos manipuladores e ao meio ambiente, associado ao pouco ou nenhum pré-tratamento das amostras de interesse (LOHUMI et al., 2015).

A espectroscopia estuda a interação da radiação eletromagnética com a matéria, onde os compostos presentes nas amostras absorvem radiação eletromagnética na região do infravermelho, induzindo os movimentos vibracionais das moléculas (BURNS e CIURCZAK, 2008). A região do infravermelho corresponde à região espectral situada na faixa de números de ondas entre 14290 cm^{-1} e 200 cm^{-1} , englobando as regiões de infravermelho próximo, médio e distante. Entre 4000 cm^{-1} e 400 cm^{-1} passa a ser denominado de espectroscopia no infravermelho médio (MIR), uma das mais comuns para análises espectrais em alimentos (amostras sólidas, líquidas e gasosas) devido à grande

quantidade de modos vibracionais associados a grupos funcionais presentes em elementos orgânicos nesta região, tais como proteínas, lipídeos e carboidratos (SKOOG et al., 2001; PINTO, 2011).

As moléculas que absorvem energia (radiação) na região do MIR são excitadas para atingirem um estado de maior energia, apresentando vibrações em uma ou mais regiões do espectro, dependendo de fatores como configuração e posição das ligações químicas entre os átomos. No MIR duas moléculas de estruturas diferentes podem absorver frequências iguais, mas os espectros serão diferentes, já que cada tipo de ligação possui sua própria frequência de vibração, originando uma impressão digital característica da amostra em estudo (PAVIA et al., 2010). Esse tipo de espectro é capaz de fornecer informações estruturais de moléculas, em que as absorções de cada tipo de ligação, por exemplo, N-H, C-H, O-H, C=O, C-C, são encontradas apenas em regiões específicas do infravermelho médio. Ou seja, o princípio baseia-se na capacidade de absorção da radiação por grupos funcionais específicos, com as bandas/picos do espectro correspondendo às frequências de vibração entre os átomos e a altura de cada pico à intensidade da frequência de vibração (KAROUI et al., 2010).

Como a eletronegatividade dos átomos presentes em grupos funcionais de compostos químicos alimentares aumenta na ordem $C < N < O$, as forças de ligação também aumentam na mesma ordem e, conseqüentemente, os números de onda dos picos presentes nos espectros devido a presença destes átomos (BARBOSA, 2007).

Para átomos iguais, ligações triplas absorvem em maiores frequências que as duplas e estas mais que as simples: $C\equiv C$ (2150 cm^{-1}); $C=C$ (1650 cm^{-1}); $C-C$ (1200 cm^{-1}). Os mesmos efeitos também são observados em casos de ligações C-H formadas por átomos de carbono com hibridizações diferentes, ou seja, orbitais com maior caráter s são mais fortes ($sp > sp^2 > sp^3$) e, portanto, absorvem em maiores regiões de números de onda: $\equiv C-H$ (3300 cm^{-1}); $=C-H$ (3080 cm^{-1}); $-C-H$ (2950 cm^{-1}) (BARBOSA, 2007). Na Tabela 2 são apresentados alguns tipos de ligações químicas e as regiões de vibração dos grupos funcionais em determinadas faixas de números de onda.

Tabela 2: Números de onda de alguns tipos de ligações químicas.

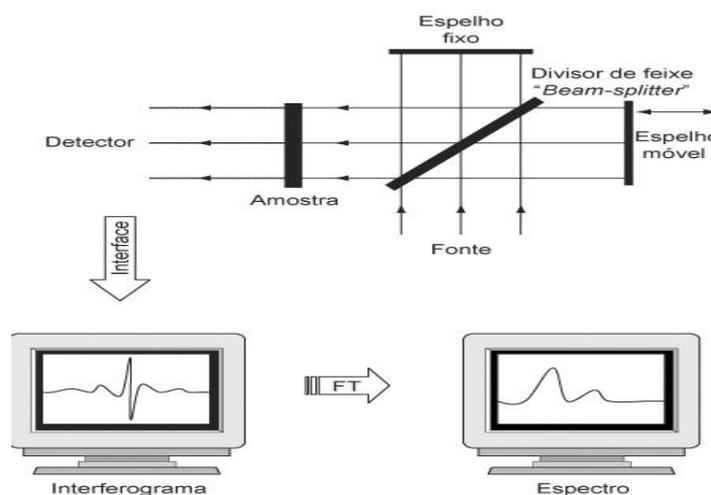
Número de onda (cm^{-1})	Tipos de ligação	Ligação
3300 – 2800	Ligação simples específica (hibridização)	C-H
2300 – 2100	Ligações triplas	$C\equiv C$ / $C\equiv N$
1800 – 1500	Ligações duplas	$C=O$ / $C=N$ / $C=C$
1500 – 900	Ligações simples	C-C

FONTE: Adaptado de PAVIA (2010).

No caso do leite e derivados, em relação à identificação do grupo funcional associado com a composição química da amostra, a esterificação dos ácidos graxos pelo glicerol durante a síntese de triacilgliceróis presentes na constituição da gordura origina a formação de uma ligação éster (O=C=O) localizada aproximadamente entre 2200 cm^{-1} e 1600 cm^{-1} e as ligações entre hidrocarbonetos (C-H) dos ácidos graxos localizada entre 3300 cm^{-1} e 2800 cm^{-1} . Bandas de absorção de amidas resultantes das ligações peptídicas entre aminoácidos na formação das proteínas estão localizadas aproximadamente entre 1750 cm^{-1} e 1300 cm^{-1} . No caso de carboidratos, em especial a lactose, um dissacarídeo originado a partir da ligação glicosídica (O-C-O) entre a glicose e a galactose, a vibração deste grupo funcional ocorre aproximadamente entre 1250 cm^{-1} e 1000 cm^{-1} (KAROUI et al., 2010; CONCEIÇÃO et al., 2019).

O funcionamento (Figura 1) dos equipamentos que utilizam a Transformada de Fourier é baseado no princípio do interferômetro de Michelson (GRIFFITHS e HASETH, 2007).

Figura 1: Princípio de funcionamento do FTIR.



FONTE: Agilent Technologies (2019).

Os interferômetros são constituídos de um divisor de feixes, um espelho fixo e um espelho móvel. A radiação proveniente da fonte passa por um espelho semi-reflexivo ou divisor de feixes, sendo dividido em duas partes, uma parte é refletida por um espelho fixo e a outra é refletida por um espelho móvel. As partes da radiação incidente divididas entre os dois espelhos voltam a se recombinar, porém houve uma diferença entre os caminhos ópticos percorridos individualmente pelas radiações. A radiação emitida, após passar pelos espelhos e se recombinarem, passa por um interferômetro antes de incidir na amostra. Em seguida, o feixe resultante entra em contato com a amostra, onde ocorrem as absorções, transmissões e/ou reflexões, prosseguindo até o detector. A radiação incide no detector, e é gerado um gráfico da intensidade em função do deslocamento do

espelho móvel, chamado de interferograma. O interferograma é detectado e armazenado, quando aplica-se a Transformada de Fourier de modo a converter os dados, transformando o interferograma em um gráfico que representa a quantidade de radiação detectada (absorbância, transmitância ou reflectância) em função da frequência da radiação (número de onda), chamado de espectro (BENETTI, 2014).

A obtenção de espectros pode ocorrer por diversas técnicas a depender do tipo de equipamento utilizado. A Reflexão Total Atenuada (ATR) é utilizada por requerer pouco ou nenhum preparo das amostras, que podem ser sólidas ou líquidas e são simplesmente colocadas em contato com a superfície superior de um cristal de alto índice de refração, geralmente de seleneto de zinco (ZnSe), germânio (Ge), diamante ou brometo-iodeto de tálio (KRS-5) (KAROUI et al., 2010).

A técnica por ATR mede a mudança na intensidade que ocorre em um feixe de radiação infravermelha internamente refletido quando entra em contato com o cristal que está em contato com a amostra (KAROUI et al., 2010). A técnica consiste na reflexão de um feixe que incide em um ângulo crítico, passando de um meio mais denso (um cristal) para um meio menos denso (amostra). Assim, uma pequena parcela da radiação incidente penetra poucos micrometros no meio (amostra), podendo ser absorvida interagindo com a amostra. Com a absorção, o feixe sofre uma atenuação, sendo possível identificar as bandas de absorção da amostra e seus compostos (SKOOG et al., 2001).

A água é um tipo de composto com absorção acentuada nas regiões do infravermelho médio e, com isso, pode interferir na determinação de outros componentes presentes no alimento. Alguns alimentos, como é o caso do leite fluido, necessitam de um processo prévio de secagem antes da utilização no FTIR-ATR para que a água presente não prejudique as análises, uma vez que os modos de vibração da água no espectro sobrepõem às bandas com as reais características das amostras, sendo difícil determinar com precisão qual a contribuição de cada componente nas bandas visualizadas (BENETTI et al., 2014).

Nas últimas duas décadas os métodos espectroscópicos têm sido aplicados com o intuito de classificar, identificar, quantificar ou avaliar a qualidade de produtos lácteos como alternativa para substituir os procedimentos de referência tradicionais. Muitas vezes, a complexidade dos espectros com sinais provenientes em uma ampla faixa de números de onda exige a utilização de análises estatísticas na identificação, classificação ou quantificação dos compostos de interesse na pesquisa (DOMINGO, 2014). Quando combinada com análises multivariadas pode ser uma boa solução para detectar a presença de leite bovino em leite de búfala e/ou muçarela de búfala de maneira rápida e eficiente.

Jaiswal et al. (2015) estudaram a detecção de extrato aquoso de soja em leites de vaca e búfala consumidos na Índia e China, justificado pelas possibilidades da ocorrência deste tipo de adulteração

ocasionada pelo aumento do consumo de leite pela população. Os autores concluíram que FTIR-ATR foi capaz de gerar espectros com picos que apresentaram diferenças de intensidade (valores de absorvância) entre os extratos de soja e leites de vaca e búfala, complementada pela aplicação da análise de componentes principais (ACP) aos dados espectrais.

Nicolaou et al. (2010) propuseram a utilização de FTIR associada à técnica multivariada de regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) para detectar e quantificar a presença de leite de vaca em leites de cabra e ovelha das misturas binárias e terciárias dos leites. Os espectros detectaram características diferentes entre as amostras avaliadas e, com a aplicação de PLS, foram obtidas respostas com bons percentuais de separação para as misturas binárias e terciárias, com níveis de erros de 6,5% a 8,0% e 3,4% a 4,9%, respectivamente, demonstrando que o FTIR pode ser utilizado como método rápido de detecção e quantificação de adulterações em leites.

Santos et al. (2013) utilizaram técnicas de espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) e médio (MIR) associadas a análises estatísticas multivariadas para avaliar as diferenças entre a sensibilidade dos equipamentos utilizados e detectar adulterações em leite bovino por adições de água, soro, leite sintético, ureia, peróxido de hidrogênio e urina sintética. Os autores concluíram que a utilização de FTIR associada a PLS foi capaz de quantificar os níveis de cada adulterante, com bons coeficientes de determinação (> 92%) e baixos erros de predição. Os modelos de classificação e predição gerados pelo MIR foram superiores aos do NIR, podendo ser alternativa à utilização dos métodos tradicionais.

A aplicação de FTIR pode ser importante na detecção de adulterações em muçarela de búfala, pois a autenticidade deste alimento afeta não só os consumidores, mas também a imagem das indústrias que comercializam estes produtos adulterados. O consumo de muçarela de búfala em todo o mundo vem aumentando consideravelmente, devido a isso, produtores, transportadores e indústrias de beneficiamento encontram oportunidades para fraudar leite de búfala com mais frequência. Assim, esses problemas podem ser evitados diariamente por meio da utilização de análises rápidas e precisas para determinar a autenticidade do leite e/ou muçarela, como é o caso do FTIR associado à quimiometria (DOMINGO, 2014).

2.5. Quimiometria aplicada na detecção de adulterações em alimentos

A Sociedade Internacional de Quimiometria (ICS) define a quimiometria como sendo a ciência relacionada a medidas realizadas em um sistema ou processo químico, obtendo informações sobre o estado do sistema através da aplicação de métodos matemáticos ou estatísticos, ou seja, pode ser definida como a aplicação de métodos para planejar ou selecionar experimentos de forma otimizada

e/ou extrair o máximo de informações a partir dos dados analíticos numéricos (MASSART et al., 1998).

Um dos aspectos positivos da quimiometria consiste na análise conjunta de diversas variáveis simultaneamente, facilitando o processamento e a interpretação de dados, reduzindo a complexidade dos mesmos. Estas vantagens se devem ao aumento da capacidade de processamento dos computadores, da instrumentação analítica e da eficiência de adquirir grande quantidade de dados rapidamente (BARROS NETO et al., 2006).

Com o avanço tecnológico e, conseqüentemente, o desenvolvimento e aprimoramento de técnicas analíticas capazes de fornecer informações rápidas, precisas e numerosas do material em estudo, especialmente em análises de alimentos, aliado à substituição aos métodos tradicionais de análise, a combinação de tais técnicas com a quimiometria pode gerar respostas valiosas que, muitas vezes, solucionam o problema proposto na pesquisa. Embora o estabelecimento de um modelo quimiométrico muitas vezes seja demorado e complexo, uma vez o modelo estabelecido, as análises podem ser realizadas dentro de um curto período de tempo (PASQUINI, 2003).

Como exemplo disso, Carvalho et al. (2015) utilizaram espectroscopia de infravermelho médio (MIR) objetivando detectar e quantificar adulterações em leite em pó pela adição de soro de leite, onde foram utilizadas técnicas multivariadas de ACP, análise discriminante (AD) e PLS. Segundo os autores, para ACP e AD bons percentuais de separação e classificações corretas entre as diferentes amostras estudadas foram alcançados. Já para PLS o coeficiente de correlação e o erro quadrático médio de predição no melhor modelo foram 0,9885 e 1,17, respectivamente. A utilização de MIR associada à quimiometria pode ser considerada para detecção de adulterações por adição de soro de queijo em leite em pó.

Dentre as ferramentas quimiométricas utilizadas, destacam-se àquelas que podem ser classificadas em: planejamento e otimização de experimentos; calibração multivariada; reconhecimento de padrões e classificação de dados (FERREIRA et al., 1999).

2.5.1. Análise de componentes principais (ACP)

A ACP pode ser agrupada como uma ferramenta quimiométrica exploratória para classificação e redução da dimensionalidade de dados, objetivando desenvolver modelos gráficos capazes de separar/classificar as amostras de interesse em diferentes grupos com base em um conjunto de dados de acordo com a similaridade e/ou diferenças das características avaliadas, sendo considerado um método qualitativo (MINGOTI, 2007).

Consiste em transformar grandes matrizes de dados (variáveis de tratamentos em diferentes repetições) em matrizes menores (matrizes de variância e covariância ou correlação) reduzindo a

complexidade, gerando respostas qualitativas capazes de diferenciar amostras de interesse. Gráficos que mostram a relação entre amostras e variáveis do sistema em estudo são gerados para facilitar na interpretação dos resultados (RIBEIRO, 2007).

ACP não requer nenhum tipo de suposição inicial sobre os dados, portanto é considerada um método de treinamento não-supervisionado, sendo realizada no máximo a padronização inicial das medidas de cada variável para média igual a 0 e desvio padrão igual a 1 quando se faz a utilização de matrizes de covariâncias, o que é equivalente a extrair componentes principais (CP's) utilizando matrizes de correlação das variáveis originais (OGILVIE et al., 2008).

Após a transformação das matrizes originais de dados (padronizadas ou não) um novo conjunto de variáveis é gerado a partir da combinação linear das variáveis originais. Essas combinações lineares agrupam as variáveis que estão altamente correlacionadas em novas variáveis chamadas de CP's que são não correlacionadas entre si, onde os primeiros CP's geralmente expressam as maiores variâncias, sendo possível visualizar a separação de grupos de amostras em gráficos de escores de CP's (MINGOTI, 2007).

2.5.2. Análise discriminante (AD)

A AD é utilizada para discriminação de amostras em dois ou mais grupos de acordo com diversas características avaliadas por metodologias de interesse, diferindo-se da ACP em relação à suposição inicial que deve ser estabelecida, pois esta técnica requer predefinições dos grupos (a priori) em que serão classificadas as amostras, portanto é considerada uma técnica supervisionada (JOHNSON e WICHERN, 1999).

Consiste em estabelecer relações entre uma variável dependente e variáveis independentes com o objetivo de diferenciar as amostras estudadas em grupos distintos, ou seja, os tratamentos avaliados são inseridos nos grupos em que possuem maiores probabilidades de classificação, além da classificação de novos casos aos grupos preestabelecidos anteriormente. Esta classificação é realizada por meio de uma função matemática chamada de regra de classificação ou discriminação (HAIR JR et al., 2010).

De maneira geral, sabe-se que certas amostras são pertencentes a uma determinada população, enquanto outro grupo de amostras pertencem a outra população distinta. Na 1ª fase da análise, denominada de fase de treinamento, após a avaliação das características de interesse, o perfil de cada grupo preestabelecido anteriormente é definido, onde são identificadas as características individuais de cada grupo, evidenciando as similaridades e diferenças entre eles. Desse modo, novas amostras de origem desconhecida e avaliadas podem ser classificadas em algum dos grupos existentes de acordo

com as semelhanças encontradas, esta etapa consiste na 2ª fase da análise denominada de classificação ou alocação (CHEN et al., 2011; FERREIRA, 2011).

Combinações lineares (funções discriminantes ou equações de regressão lineares – Equação 1) formadas a partir das variáveis originais são desenvolvidas para separar as amostras em estudo de populações distintas. Os coeficientes da equação indicam quais variáveis originais mais influenciam ou contribuem para a formação dos grupos (MINGOTI, 2007).

$$Y = v_1X_1 + v_2X_2 + \dots + v_nX_n + a \quad \text{Equação 1}$$

Onde: Y é a função discriminante; v é o coeficiente discriminante ou o peso de cada variável; X é o escore das variáveis estudadas; a é uma constante; n é o número de variáveis.

Após a definição da função discriminante na etapa de treinamento procede-se com a classificação das amostras em seus respectivos grupos (fase de classificação), onde estabelece-se um valor crítico, de forma que novas amostras avaliadas com valores abaixo deste índice pertencem ao mesmo grupo e amostras que apresentarem valores superiores pertencem a outro grupo distinto. Para este caso, a função discriminante é denominada de função discriminante linear de Fischer, que caracteriza-se por produzir separação máxima entre duas populações. Para o caso de mais de duas populações recebe o nome de função discriminante de Anderson, onde as diferentes populações apresentam diferentes características que proporcionam distribuições em grupos específicos (BARROS NETO et al., 2006; CHEN et al., 2011).

2.5.3. Regressão linear múltipla (RLM)

A RLM tem o objetivo de obter modelos matemáticos que descrevam o comportamento de variáveis respostas (variáveis dependentes) com base nos valores obtidos de uma ou mais variáveis explicativas (variáveis independentes), assumindo que há uma relação linear entre a variável resposta e as variáveis explicativas (BARRETO et al., 2016).

Esta técnica também seleciona amostras e/ou variáveis significativas para a construção adequada de modelos matemáticos, principalmente em dados onde o número de preditores é elevado, obtendo-se um conjunto de dados sem outliers (aqueles que não estão associados de maneira esperada à resposta) para posteriormente serem divididos em um conjunto de dados de treinamento para a construção do modelo que melhor represente e contribua para a explicação do objetivo da pesquisa, e outro conjunto de dados de validação para verificar a capacidade de generalização do modelo (HAIR JR et al., 2010).

Uma série de aspectos deve ser avaliada para a utilização da RLM, destacando-se: a correta separação das medidas em estudo entre variáveis dependentes e independentes de acordo com o objetivo proposto na pesquisa; a verificação da existência de multicolinearidade, pois para RLM a multicolinearidade entre os parâmetros do modelo deve ser baixa, existindo pouca correlação entre as variáveis; boa significância do modelo proposto, verificada pelo coeficiente de determinação (R^2); alta correlação; construção do modelo de acordo com a significância dos parâmetros; minimização dos resíduos (erros), diminuindo as diferenças entre os valores observados e os preditos pelo modelo; entre outros (LOPES et al., 2017).

2.5.4. Regressão por mínimos quadrados parciais (PLS)

PLS é uma técnica de calibração multivariada para análise de dados em que relaciona-se uma ou mais variáveis respostas com diversas variáveis independentes, baseada no uso de fatores, variáveis latentes ou componentes (novas variáveis originadas a partir de combinações lineares das variáveis originais), identificados e escolhidos com base naqueles que melhor modelam as variáveis dependentes, ou seja, de acordo com os resultados de validação cruzada, processo pelo qual o erro mínimo de previsão é calculado, através da comparação entre valores previstos e valores de referência (NAES et al., 2002).

As principais vantagens da utilização de PLS consistem na eficiência em trabalhar com conjunto de dados onde existem variáveis altamente correlacionadas, que apresentem ruído considerável e quando existem mais preditores do que observações (BERETON, 2007).

É aplicada em diversas áreas, destacando-se a química, farmacêutica e alimentícia, por meio da relação entre medidas espectrais (NIR e/ou MIR) que incluem muitas variáveis correlacionadas entre si (full spectrum), objetivando desenvolver modelos preditivos, por isso não é muito indicada para filtrar variáveis que não sejam úteis para explicar a resposta. No entanto, em alguns casos, pode ser feita a seleção de regiões espectrais que melhor expliquem o comportamento do fenômeno em estudo e, conseqüentemente, a quantificação de algum composto de interesse (FERRÃO, 2000).

2.5.5. Redes neurais artificiais (RNA)

RNA consistem em técnicas computacionais capazes de realizar estudos de múltiplas variáveis dependentes e independentes simultaneamente, sem a necessidade de informações prévias sobre as relações entre elas, utilizando modelos matemáticos e estatísticos para classificação de amostras e padrões, agrupamento de dados, simulação de atividades, dentre outras. Possuem a capacidade de capturar as relações funcionais existentes entre as variáveis de estudo, mesmo sem a descrição prévia das mesmas. São capazes de acumular os conhecimentos adquiridos a partir de dados reais

(capacidade de aprendizado) e disponibilizá-los para futuras aplicações (habilidade de generalização) (ZHOU e THERDTHAI, 2010).

As redes são compostas por um conjunto de neurônios artificiais interconectados entre si formando camadas simples (somente de entrada e saída) ou múltiplas (de entrada, intermediárias e de saída), em que o número de neurônios das camadas depende da complexidade do estudo, sendo possível obter mais de uma camada intermediária organizada de diversas maneiras (SILVA et al., 2010).

Os sinais são apresentados aos neurônios da camada de entrada (geralmente dados padronizados obtidos a partir das medidas analíticas), onde cada sinal é multiplicado por um número (pesos sinápticos que determinam a influência dos dados, ponderando cada variável de entrada), sendo transferidos por conexões matemáticas para as camadas intermediárias, como uma forma de processar as informações recebidas e distribuir às diferentes unidades que compõem a rede até a obtenção das respostas (valores de saída) (KHOURY JR, 2004).

A rede é composta de função de soma, limiar de ativação, potencial de ativação, função de ativação e saída. A função de soma recebe os sinais de entrada e realiza a soma dos produtos desses sinais com os pesos sinápticos, formando combinações lineares que agregam todos os sinais de entrada. O limiar de ativação é uma constante responsável por permitir ou não a passagem das informações anteriores (somadas ponderadas) para a função de ativação. A diferença entre o valor produzido pela função de soma e o limiar de ativação é o potencial de ativação. Enquanto a função de ativação é a encarregada em controlar as saídas dos neurônios em um intervalo de valores confiáveis (LOPES et al., 2017).

Após a rede ter aprendido a relação funcional entre os dados de entrada e saída na etapa de treinamento, por meio de um nível satisfatório de erro, esta é capaz de generalizar soluções, etapa denominada de classificação, produzindo saídas próximas das esperadas a partir de quaisquer sinais (dados de entrada) apresentados a ela. A rede deverá ser utilizada no modo progressivo feed-forward, onde novas entradas são apresentadas à camada de entrada, são processadas nas camadas intermediárias e os resultados são apresentados na camada de saída, como no treinamento, mas sem a retropropagação do erro (SILVA et al., 2010).

Os principais algoritmos de aprendizado utilizados pelas RNA multicamadas supervisionadas são o Backpropagation (retropropagação do erro) e o Resilient Propagation. É no aprendizado onde os pesos sinápticos são modificados visando minimizar os erros, ou seja, a rede calcula valores de saída a partir dos dados de entrada, e compara esses valores calculados com os de saída originais que foram fornecidos inicialmente, tentando ajustar os pesos para minimizar ao máximo possível os erros. No algoritmo Backpropagation, depois das etapas descritas anteriormente, quando os dados de saída

calculados não forem semelhantes aos dados esperados, o erro é calculado e propagado da camada de saída até a camada de entrada, com isso os pesos vão sendo modificados conforme o erro é retropropagado (BRAGA et al., 2007).

As principais redes utilizadas são as do tipo Perceptron de Múltiplas Camadas, principalmente quando os problemas envolvem altos graus de não-linearidade. Neste tipo de rede são fornecidos os dados de entrada, que posteriormente são multiplicados pelos seus respectivos pesos, obtendo-se uma combinação linear entre as somas ponderadas. Comparando-se com o limiar de ativação (que é a taxa de aprendizado) é gerada uma resposta (LOPES et al., 2017).

As RNA têm sido utilizadas para classificar amostras de leite de acordo com a composição (NAZÁRIO et al., 2009) e para detecção de soro de queijo em leite (VALENTE et al., 2014; ROCHA et al., 2015). Em queijos, vem sendo utilizada para verificar o tempo de maturação (VÁSQUEZ et al., 2018) e o tipo de leite utilizado na produção (BARAJAS et al., 2013).

3. REFERÊNCIAS

- ADDEO, F.; PIZZANO, R.; NICOLAI, M. A.; CAIRA, S.; CHIANESE, L. Fast isoelectric focusing and anti-peptide antibodies for detecting bovine casein in adulterated water buffalo milk and derived Mozzarella cheese. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 1063-1066, 2009.
- AGILENT TECHNOLOGIES. **Spectroscopy Instruments**. Disponível em:>> <https://www.agilent.com/><< Acesso em: 04/05/2019.
- AHMAD, S.; GAUCHER, I.; ROUSSEAU, F.; BEAUCHER, E.; PIOT, M.; GRONGNET, J. F.; GAUCHERON, F. Effects of acidification on physico-chemical characteristics of buffalo milk: A comparison with cow's milk. **Food Chemistry**, v. 106, p. 11-17, 2008.
- AHMED, N. S.; ABD EL-GAWAD, M. A. M.; EL-ABD, M. M.; ABD-RABOU, N. S. Properties of Buffalo Mozzarella Cheese as Affected by Type of Coagulante. **Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria**, v. 10, p. 339-357, 2011.
- APONTE, M.; PEPE, O.; BLAIOTTA, G. Short communication: Identification and technological characterization of yeast strains isolated from samples of water buffalo Mozzarella cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p. 2358-2361, 2010.
- BARAJAS, M. C. S.; MATIN, M. G.; ESTEBAN, J. S.; HIERRO, J. M. H.; RODILLA, V. M.; QUINTANA, A. M. V.; REVILLA, I.; ORTEGA, I. L.; SANCHO, R. M.; DIEGO, B. C. Prediction of the type of milk and degree of ripening in cheeses by means of artificial neural networks with data concerning fatty acids and near infrared spectroscopy. **Talanta**, v. 116, p. 50-55, 2013.
- BARBOSA, L. C. A. **Espectroscopia no Infravermelho na caracterização de compostos orgânicos**. Viçosa: Ed. UFV, 2007. 189p.
- BARRETO, V. C. S.; BATISTELA, G. C.; GAIOTTO, M. R.; SIMÕES, D. Regressão Linear Múltipla aplicada ao preço do leite. **Revista Eletrônica Paulista de Matemática**, v. 7, p. 109-118, 2016.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. 25 anos de quimiometria no Brasil. **Química Nova**, v. 29, p. 1401-1406, 2006.
- BENETTI, C. **Estudo da reparação óssea por espectroscopia ATR-FTIR após remoção de fragmento da região mandibular com laser de Er,Cr:YSGG ou broca multilaminada**. São Paulo – SP: 2014. 91 p. Tese (Doutorado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Materiais).
- BERETON, R. G. **Applied Chemometrics for Scientists**. 1ª ed. Reino Unido: Wiley, 2007. 386 p.

BRAGA, A. P.; CARVALHO, A.; LUDEMIR, T. B. **Redes Neurais Artificiais: teoria e aplicações**. 2ª Ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007. 248p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. RIISPOA. Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2017.

BURNS, D. A.; CIURCZAK, E. W. **Handbook of Near Infrared Analysis**. 3ª Ed., Boca Raton: CRC Press, 2008. 836 p.

BUZI, K. A.; PINTO, J. P. A. N.; RAMOS, P. R. R.; BIONDI, G. F. Análise microbiológica e caracterização eletroforética do queijo mussarela elaborado a partir de leite de búfala. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, p. 7-11, 2009.

CARVALHO, B. M. A.; DE CARVALHO, L. M.; COIMBRA, J. S. R.; MINIM, L. A.; BARCELLOS, E. S.; DA SILVA JÚNIOR, W. F.; DETMANN, E.; DE CARVALHO, G. G. P. Rapid detection of whey in milk powder samples by spectrophotometric and multivariate calibration. **Food Chemistry**, v. 174, p. 1-7, 2015.

CHEN, Q.; CAI, J.; WAN, X.; ZHAO, J. Application of linear/non-linear classification algorithms in discrimination of pork storage time using Fourier transform near infrared (FT-NIR) spectroscopy. **Food Science and Technology**, v. 44, p. 2053-2058, 2011.

COMMISSION REGULATION. Reference method for the detection of cows' milk and caseinate in cheeses from ewes' milk, goats milk and buffaloes' milk or mixtures of ewes' milk, goats milk and buffaloes' milk. **Official Journal of European Communities**, v. 88, p. 53-61, 2008.

CONCEIÇÃO, D. G.; GONÇALVES, B. R. F.; HORA, F. F.; FALEIRO, A. S.; SANTOS, L. S.; FERRÃO, S. P. B. Use of FTIR-ATR Spectroscopy Combined with Multivariate Analysis as a Screening Tool to Identify Adulterants in Raw Milk. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 30, p. 780-785, 2019.

CORREDDU, F.; SERDINO, J.; MANCA, M. G.; COSENZA, G.; PAUCIULLO, A.; RAMUNNO, L.; MACCIOTTA, N. Use of multivariate factor analysis to characterize the fatty acid profile of buffalo milk. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 60, p. 25-31, 2017.

COZZOLINO, R.; PASSALACQUA, S.; SALEMI, S.; MALVAGNA, P.; SPINA, E.; GAROZZO, D. Identification of adulteration in milk by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 36, p. 1031-1037, 2001.

COZZOLINO, R.; PASSALACQUA, S.; SALEMI, S.; GAROZZO, D. Identification of adulteration in water buffalo Mozzarella and in ewe cheese by using whey protein as biomarkers and matrix-

assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 37, p. 985-991, 2002.

CZERWENKA, C.; MÜLLER, L.; LINDNER, W. Detection of the adulteration of water buffalo milk and mozzarella with cow's milk by liquid chromatography-mass spectrometry analysis of β -lactoglobulin variants. **Food Chemistry**, v. 122, p. 901-908, 2010.

DALMASSO, A.; CIVERA, T.; LA NEVE, F.; BOTTERO, M. T. Simultaneous detection of cow and buffalo milk in mozzarella cheese by Real-Time PCR assay. **Food Chemistry**, v. 124, p. 362-366, 2011.

DOMINGO, E. C. **Determinação de melamina em leite em pó por infravermelho próximo e espectrometria de massas**. Lavras – MG: 2014. 84 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos).

EGITO, A. S.; ROSINHA, G. M. S.; LAGUNA, L. E.; MICLO, L.; GIRARDET, J. M.; GAILLARD, J. L. Método eletroforético rápido para detecção da adulteração do leite caprino com leite bovino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, p. 932-939, 2006.

ENNE, G.; ELEZ, D.; FONDRINI, F.; BONIZZI, I.; FELIGINI, M.; ALEANDRI, R. High-performance liquid chromatography of governing liquid to detect illegal bovine milk's addition in water buffalo Mozzarella: Comparison with results from raw milk and cheese matrix. **Journal of Chromatography A**, v. 1094, p. 169-174, 2005.

FAOSTAT. 2018. **Livestock Primary**. Disponível: << <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QL> >>. Acesso em: 11/05/2019.

FERRÃO, M. F. **Aplicação de técnicas espectroscópicas de reflexão no infravermelho no controle de qualidade de farinha de trigo**. Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP: 2000. 219 p. Tese (Doutorado).

FERREIRA, M. M. C.; ANTUNES, A. M.; MELGO, M. S.; VOLPE, P. L. O. Quimiometria I: Calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**, v. 22, p. 724-731, 1999.

FERREIRA, D. F. **Estatística Multivariada**. Lavras: Editora UFLA, 2011. 675 p.

GONÇALVES, B. R. F.; SILVA, G. J.; PONTES, S. F. O.; FONTAN, R. C. I.; EGITO, A. S.; FERRÃO, S. P. B. Evaluation of the peptide profile with a view to authenticating buffalo mozzarella cheese. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 51, p. 1586, 1593, 2016.

GRIFFITHS, P. R.; HASETH, J. A. **Fourier Transform Infrared Spectrometry**. 2ª Ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2007. 560 p.

GUERREIRO, J. S.; BARROS, M.; FERNANDES, P.; PIRES, P.; BARDSLEY, R. Principal component analysis of proteolytic profiles as markers of authenticity of PDO cheeses. **Food Chemistry**, v. 136, p. 1526-1532, 2013.

HAIR JR, J. F.; BLACK, W. C.; BABIN, B. J.; ANDERSON, R. E. **Multivariate Data Analysis**. 7 ed. New Jersey: Prentice Hall, 2010. 785 p.

HAN, B.; MENG, Y.; LI, M.; YANG, Y.; REN, F.; ZENG, Q.; NOUT, M. J. R. A survey on the microbiological and chemical composition of buffalo milk in China. **Food Control**, v. 18, p. 742-746, 2007.

HUSSAIN, I.; YAN, J.; GRANDISON, A. S.; BELL, A. E. Effects of gelation temperature on Mozzarella-type curd made from buffalo and cows' milk: 2. Curd yield, overall quality, and casein fractions. **Food Chemistry**, v. 135, p. 1404-1410, 2012.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. (2018). Pesquisa Pecuária Municipal. **SIDRA**. Disponível em: < <http://www.sidra.ibge.gov.br/> >. Acesso em: 30/05/2019.

JAISWAL, P.; JHA, S. N.; BORAH, A.; GAUTAM, A.; GREWAL, M. K.; JINDAL, G. Detection and quantification of soymilk in cow-buffalo milk using Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared spectroscopy (ATR-FTIR). **Food Chemistry**, v. 168, p. 41-47, 2015.

JOHNSON, R. A.; WICHERN, D. W. **Applied multivariate statistical analysis**. 4^a ed. Nova Jersey: Prentice-Hall, 1999. 815 p.

KAROUI, R.; DOWNEY, G.; BLECKER, C. Mid-infrared spectroscopy coupled with chemometrics: a tools for the analysis of intact food systems and the exploration of their molecular structure-quality relationships – a review. **Chemical Reviews**, v. 110, p. 6144-6168, 2010.

KHOURY JR, J. K. **Desenvolvimento e avaliação de visão artificial para classificação de madeira serrada de eucalipto**. Universidade Federal de Viçosa: 2004. 101 p. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola).

LOCCI, F.; GHIGLIETTI, R.; FRANCOLINO, S.; IEZZI, R.; OLIVIERO, V.; GAROFALO, A.; MUCCHETTI, G. Detection of the cow milk in cooked buffalo Mozzarella used as Pizza topping. **Food Chemistry**, v. 107, p. 1337-1341, 2008.

LOHUMI, S. H.; LEE, H.; CHO, B-K. A review of vibrational spectroscopy techniques for the detection of food authenticity and adulteration. **Trends in Food Science & Technology**, v. 46, p. 85-98, 2015.

LOPES, M. L. M.; CHAVARETTE, F. R.; COSSI, A. M. Avaliação do modelo de regressão linear múltipla e redes neurais artificiais na previsão do ganho de massa em animais. **Brazilian Journal of Biosystems Engineering**, v. 11, p. 1-17, 2017.

MANUELIAN, C. L.; VISENTIN, G.; BOSELLI, C.; GIANGOLINI, G.; CASSANDRO, M.; DE MARCHI, M. Short communication: Prediction of milk coagulation and acidity traits in Mediterranean buffalo milk using Fourier-transform mid-infrared spectroscopy. **Journal of Dairy Science**, v. 100, p. 1-5, 2017.

MASSART, D. L.; VANDEGINSTE, B. G. M.; BUYDENS, L. M. C.; JONG, S.; LEWI, P. J.; SMEYERS-BERBEKE, J. **Handbook of chemometrics and qualimetrics**. Amsterdam: Elsevier Science B. V., 1998. 886 p.

MAYER, H. K. Milk species identification in cheese varieties using electrophoretic, chromatographic and PCR techniques. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 595-604, 2005.

MINGOTI, S. A. **Análise de dados através de métodos de estatística multivariada**. Belo Horizonte: Editora UFMG, 297 p. 2007.

MOORE, J. C.; SPINK, J.; LIPP, M. Development and application of a database of food ingredient fraud and economically motivated adulteration from 1980 to 2010. **Journal of Food Science**, v. 77, p. 118-126, 2012.

NAES, T. **A user friendly guide to multivariate calibration and classification**. Chichester: NIR Publications, 2002. p. 114-119.

NAZÁRIO, S. L. S.; BUIOCHI, F.; KITANO, C.; ISEPON, J. S.; ADAMOWSKI, J. C.; HIGUTI, R. T. Caracterização de leite bovino utilizando ultra-som e redes neurais artificiais. **Revista Controle & Automação**, v. 20, p. 627-636, 2009.

NGUYEN, H. T. H.; ONG, L.; LOPEZ, C.; KENTISH, S. E; GRAS, S. L. Microstructure and physicochemical properties reveal differences between high moisture buffalo and bovine Mozzarella cheeses. **Food Research International**, v. 102, p. 458-467, 2017.

NICOLAOU, N.; XU, Y.; GOODACRE, R. Fourier transform infrared spectroscopy and multivariate analysis for the detection and quantification of different milk species. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p. 5651-5660, 2010.

OGILVIE, D. MITCHELL, R.; MUTRIE, N.; PETTICREW, M.; PLATT, S. Perceived characteristics of the environment associated with active travel: development and testing of a new

scale. **The International Journal of Behavioral Nutrition and Physical Activity**, v. 5, p. 5858-5875, 2008.

PASQUINI, C. Review near infrared spectroscopy: Fundamentals, practical aspects and analytical applications. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, p. 198-219, 2003.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à Espectroscopia**. São Paulo: Cengage Learning, 2010. 716 p.

PETRELLA, G.; PATI, S.; GAGLIARDI, R.; RIZZUTI, A.; MASTRORILLI, P.; LA GATTA, B.; DI LUCCIA, A. Study of proteolysis in river buffalo mozzarella cheese using a proteomics approach. **Journal of Dairy Science**, v. 98, p. 7560-7572, 2015.

PIGNATA, M. C.; FERNANDES, S. A. A.; FERRÃO, S. P. B.; FALEIRO, A. S.; CONCEIÇÃO, D. G. Estudo comparativo da composição química, ácidos graxos e colesterol de leites de búfala e vaca. **Revista Caatinga**, v. 27, p. 226-233, 2014.

PINTO, F. A. Método da espectroscopia no infravermelho para análise de soros de queijos de minas padrão e prato. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, p. 1039-1042, 2011.

PIZZANO, R.; NICOLAI, M. A.; MANZO, C.; ADDEO, F. Authentication of dairy products by immunochemical methods: a review. **Dairy Science & Technology**, v. 91, p. 77-95, 2011.

PISANO, M. B.; SCANO, P.; MURGIA, A.; COSENTINO, S.; CABONI, P. Metabolomics and microbiological profile of Italian mozzarella cheese produced with buffalo and cow milk. **Food Chemistry**, v. 192, p. 618-624, 2016.

RIBEIRO, F. A. L. **Análise de imagens nível de cinza utilizando métodos quimiométricos**. Campinas – SP: 2007. 173 p. Tese (Doutorado em Química).

ROCHA, R. A.; PAIVA, I. M.; ANJOS, V.; FURTADO, M. A. M.; BELL, M. J. V. Quantification of whey in fluid milk using confocal Raman microscopy and artificial neural network. **Journal of Dairy Science**, v. 98, p. 3559-3567, 2015.

SANTOS, P. M.; PEREIRA-FILHO, E. R.; RODRIGUEZ-SAONA, L. E. Application of Hand-Held and Portable Infrared Spectrometers in Bovine Milk Analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 1205-1211, 2013.

SAMEEN, A.; ANJUM, F. M.; HUMA, N.; NAWAZ. Quality evaluation of mozzarella cheese from different milk sources. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 7, p. 753-756, 2008.

- SHAKERIAN M.; KIANI, H.; EHSANI, M. R. Effect of buffalo milk on the yield and composition of buffalo Feta cheese at various processing parameters. **Food Bioscience**, v. 15, p. 110-117, 2016.
- SILVA, I. N.; SPATTI, D. H.; FLAUZINO, R. A. **Redes Neurais Artificiais: para engenharia e ciências aplicadas**. São Paulo: Editora Artliber, 2010. 399 p.
- SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Principios de análisis instrumental**. Madri: McGraw Hill, 2001. 1028 p.
- VALENTE, G. F. S.; GUIMARÃES, D. C.; GASPARDI, A. L. A.; OLIVEIRA, L. A. Aplicação de redes neurais artificiais como teste de detecção de fraude de leite por adição de soro de queijo. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 69, p. 425-432, 2014.
- VÁSQUEZ, N.; MAGÁN, C.; OBLITAS, J.; CHUQUIZUTA, T.; AVILA-GEORGE, H.; CASTRO, W. Comparison between artificial neural network and partial least squares regression models for hardness modeling during the ripening process of Swiss-type cheese using spectral profiles. **Journal of Food Engineering**, v. 219, p. 8-15, 2018.
- VELOSO, A. C. A.; TEIXEIRA, N.; FERREIRA, I. M. P. L. V. O.; FERREIRA, M. A. Detecção de adulteração em produtos alimentares contendo leite e/ou proteínas lácteas. **Química Nova**, v. 25, p. 609-15, 2002.
- ZHOU, W.; THERDTHAI, N. **Artificial neural networks in food processing**. Boca Raton: CRC Press, 2010. p. 901-920.
- WALSTRA, P.; GEURTS, T. J.; NOOMEN, A.; JELLEMA; VAN BOEKEL, M. A. J. S. **Ciencia de la leche y tecnología de los productos lácteos**. Zaragoza: Acribia, 2006. 748 p.

Capítulo II

Objetivo

1. OBJETIVOS

1.1. Objetivo Geral

Utilizar FTIR e medidas analíticas associadas à quimiometria para detectar a presença de leite de vaca em leite e muçarela de búfala.

1.2. Objetivos Específicos

- Caracterizar o leite bubalino e bovino e suas respectivas misturas para as formulações dos queijos, por meio da composição química e propriedades físico-químicas (gordura, proteínas, lactose, sólidos totais (ST), sólidos desengordurados (SD), ureia, índice crioscópico, acidez e pH);

- Determinar a composição química e as propriedades físico-químicas (umidade, resíduo mineral fixo, gordura no extrato seco (GES), proteínas, extrato seco total (EST), extrato seco desengordurado (ESD), pH, acidez titulável e medidas de cor instrumental) dos queijos muçarela produzidos;

- Determinar a presença de leite de vaca a partir dos espectros no infravermelho médio das amostras de leite (DairySpecFT), queijo (ATR-FTIR) e peptídeos solúveis em água (PSA) (ATR-FTIR) extraídos dos queijos produzidos;

- Determinar a presença de leite de vaca nos leites e queijos muçarela produzidos por meio das medidas analíticas associadas com a quimiometria;

- Verificar a presença de leite de vaca em amostras comerciais de queijos muçarela de búfala por meio das medidas analíticas associadas com a quimiometria.

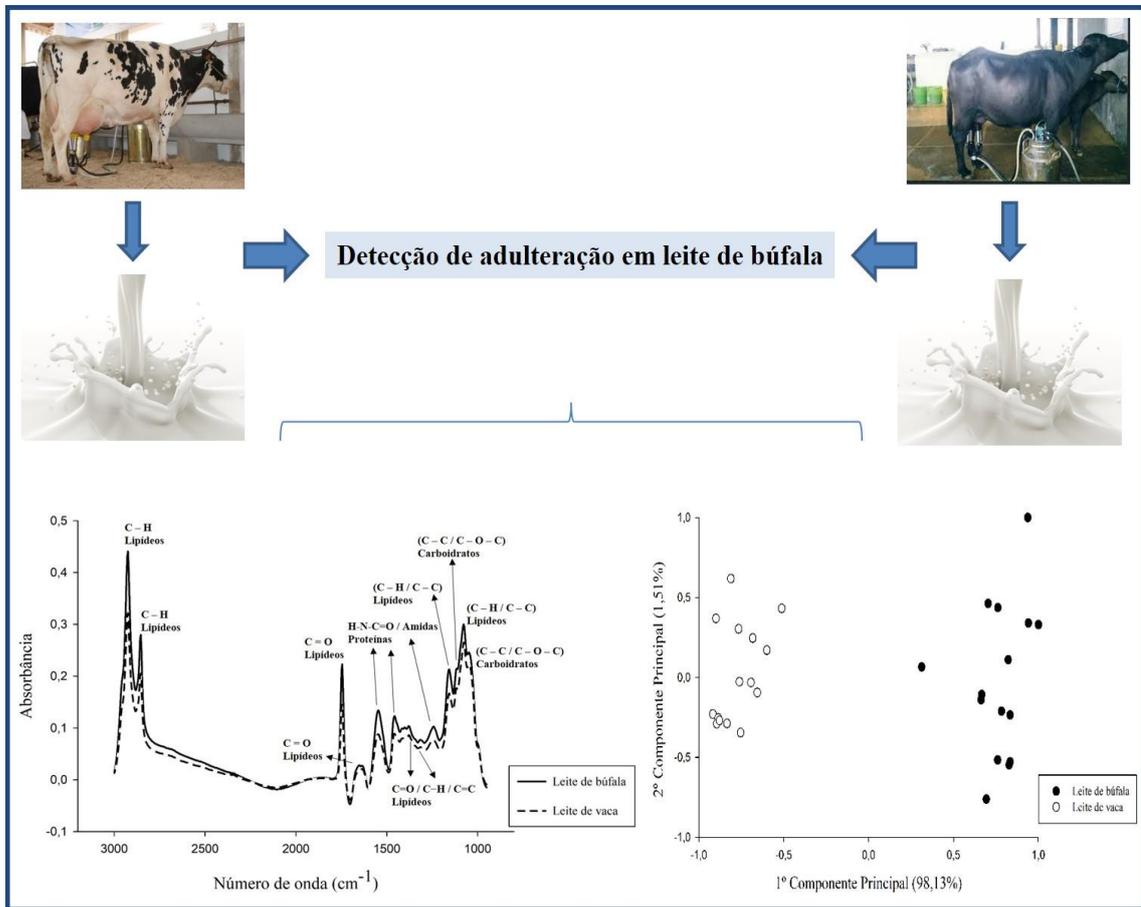
Capítulo III

Artigo 1

Espectroscopia no infravermelho médio, composição química e características físico-químicas associadas com análises multivariadas para quantificação de leite de vaca em leite de búfala

O artigo será submetido para avaliação no periódico “Journal of Brazilian Chemical Society”

Resumo Gráfico



Espectroscopia no infravermelho médio (FTIR), composição química e características físico-químicas associadas à quimiometria para verificação rápida e predição de leite de vaca em leite de búfala.

Espectroscopia no infravermelho médio, composição química e características físico-químicas associadas com análises multivariadas para quantificação de leite de vaca em leite de búfala

Ben-Hur R. F. Gonçalves^{a,b}, Grazielly de J. Silva^a, Josane C. de Jesus^a, Daniele G. Conceição^a, Leandro S. Santos^a, Sibelli P. B. Ferrão^{a,}*

^a Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos (PPGECAL), Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), Itapetinga, Bahia, Brasil

^b Centro de Formação em Tecno-Ciências e Inovação (CFTCI), Universidade Federal do Sul da Bahia (UFSB), Itabuna, Bahia, Brasil

** Autor correspondente*

Resumo

Foram utilizadas espectroscopia no infravermelho médio (FTIR), composição química e características físico-químicas associadas à quimiometria para detecção rápida e quantificação de leite de vaca em leite de búfala. Um total de 165 amostras divididas em leite de búfala, leite bovino em bubalino (10% a 90%) e leite de vaca foram avaliadas, obtendo-se resultados de gordura, proteína, lactose, sólidos totais e desengordurados, ureia, pH, acidez, índice crioscópico e absorbâncias de bandas nos espectros, associados à análise de componentes principais (ACP), regressão linear múltipla (RLM) e regressão por mínimos quadrados parciais (PLS). Os tratamentos foram separados em grupos por ACP, permitindo a classificação das amostras. Modelos de RLM e PLS para predição do teor de leite de vaca apresentaram coeficientes de determinação maiores que 94,57% e raízes do erro quadrático médio de validação menores que 4,73%. FTIR e resultados de composição química e características físico-químicas quando associados à quimiometria são eficientes na verificação de autenticidade do leite de búfala.

Palavras-chave: Bovino; bubalino; fraude; FTIR; leite.

Introdução

A sazonalidade reprodutiva da espécie bubalina associada ao preço elevado do leite de búfala quando comparado ao leite de vaca são os principais fatores responsáveis em alavancar possibilidades de adulterações por adição parcial de leite da espécie bovina em bubalina¹. Nesse sentido, a garantia da autenticidade do leite de búfala, a fim de minimizar a ocorrência desta fraude econômica, é uma preocupação para agências reguladoras laboratórios de pesquisa e indústrias, em que pesquisadores²⁻¹⁰ demonstraram a importância do desenvolvimento e/ou adaptação de métodos analíticos para detecções e quantificações do tipo de leite presente nas amostras avaliadas.

A verificação da autenticidade do leite de búfala geralmente baseia-se na identificação de marcadores únicos ou grupos de marcadores, a exemplo de proteínas e suas frações, peptídeos e aminoácidos por meio de técnicas eletroforéticas, cromatográficas e imunológicas,^{11-12,8} que apesar de possuírem boa sensibilidade e gerar resultados precisos e confiáveis, apresentam custo elevado de operação, necessitam de especialistas treinados na condução das atividades laboratoriais e da utilização de reagentes químicos prejudiciais aos manipuladores e ao meio ambiente, além de tempos prolongados na geração dos resultados, dificultando a implantação de programas de monitoramento nas indústrias.¹³

Desta forma, torna-se necessária a adaptação de técnicas, por meio de métodos de controle adequados, para serem utilizadas em associação às metodologias tradicionais/oficiais na identificação do tipo de leite utilizado pelas indústrias. A espectroscopia no infravermelho médio (FTIR), a partir de dados analíticos numéricos dos constituintes e seus grupos funcionais nos espectros, pode ser uma alternativa viável.⁶

O FTIR destaca-se por ser uma técnica rápida, de fácil execução, que exige pouco preparo das amostras a serem avaliadas, além de apresentar boa sensibilidade e baixo custo operacional. No caso do leite, a partir da vibração dos grupos funcionais que fazem parte da estrutura de seus constituintes químicos, são gerados espectros característicos. Os dados de absorbância das bandas nos espectros e

dos teores dos constituintes do leite, quando associados com análises estatísticas multivariadas, possibilitam a obtenção de respostas precisas na detecção de adulterações. ¹⁴⁻¹⁵ A quimiometria garante o desenvolvimento de modelos matemáticos capazes de prever com resultados confiáveis os níveis de adulterações no material em estudo. ¹⁶

Em trabalhos recentes, estudos com FTIR para verificação da autenticidade de leite de búfala foram realizados com a secagem do leite, onde não foi possível obter um modelo capaz de prever a concentração de leite de vaca em leite de búfala, servindo somente como uma técnica de triagem. ¹⁰ Para leite fluido não foram observados, até o momento, a aplicação de FTIR para quantificar a presença de leite de vaca em amostras de leite de búfala.

Uma alternativa relativamente simples e que ainda não foi realizada com objetivo de verificação da autenticidade do leite de búfala é a associação das características físico-químicas e composições químicas, que diferenciam quantitativamente o leite de búfala do leite de vaca, com a análise multivariada, permitindo a aplicação destes dados obtidos rotineiramente por laboratórios de indústrias de laticínios que processam este tipo de leite aos modelos estatísticos gerados.

Nesse sentido, objetivou-se a utilização do FTIR e composição química associadas a métodos estatísticos multivariados para detecção rápida e quantificação de leite de vaca em leite de búfala.

Experimental

Obtenção das amostras e elaboração das formulações

Os leites de búfala e vaca foram coletados no período matutino entre os meses de maio a agosto de 2017. O leite bovino foi obtido por ordenha mecânica de vacas mestiças (Holandês x Zebu) alimentadas a pasto (*Brachiaria decumbens*), enquanto o leite bubalino foi adquirido a partir de ordenha manual de fêmeas bubalinas mestiças (Jafarabadi x Murrah) alimentadas a pasto (*Brachiaria decumbens*), ambos em condições higiênico-sanitárias adequadas. Após as coletas, as amostras foram elaboradas em 15 repetições, totalizando 165 unidades experimentais, a partir da adição de

quantidades variáveis e crescentes de leite bovino ao bubalino (10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% e 90%), além de formulações produzidas exclusivamente com leite de búfala e vaca.

Composição química, características físico-químicas e obtenção dos espectros na região do infravermelho médio (FTIR)

Uma alíquota de 40 mL de cada formulação de leite foi aquecida em banho-maria a $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e analisadas a partir de espectros na região do infravermelho médio (FTIR) (DairySpec FT, Bentley Instruments, Inc., Chaska, Minnesota, USA) em faixa de 1000 cm^{-1} a 3000 cm^{-1} , sendo obtidos os teores de gordura, proteína, lactose, sólidos totais (ST), sólidos desengordurados (SD), ureia e índice crioscópico, além de análises de acidez titulável e pH de acordo com o método de referência 91.¹⁷

O conjunto dos dados das amostras foi organizado em matrizes formadas por $m \times n$ elementos (m linhas correspondentes aos tratamentos e n colunas correspondentes às variáveis), construídas para as medidas de composição química e características físico-químicas (matriz A_1), dados de absorvância das bandas dos espectros de FTIR (matriz A_2) e absorvância dos espectros completos de FTIR (matriz A_3). Foi utilizado o software Statistical Analysis System Student (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) para retirada de outliers das matrizes pela distância de Cook, no qual amostras que apresentaram distância ≥ 2 foram descartadas individualmente para cada matriz, e para condução das análises estatísticas multivariadas.

Quimiometria

Análise de componentes principais (ACP)

Foi realizada ACP a partir da transformação das matrizes de dados originais (matrizes A_1 e A_2) em matrizes de covariâncias (S), que expressam as variâncias individuais e combinações lineares (covariâncias) entre duas variáveis. Foram obtidos os autovalores ($\lambda_1 \geq \lambda_2 \geq \dots \geq \lambda_p$) e seus respectivos autovetores normalizados que foram utilizados para a construção dos Componentes Principais (CP's). Para a escolha do número de CP's foi considerado o critério de fatores interpretáveis e o diagrama de

autovalores, ou seja, foram selecionados CP's que possuíram as maiores proporções de variância dos atributos originais (acima de 70% de variância) em conjunto com CP's relacionados com autovalores que provocaram alterações expressivas na variância.

Regressão linear múltipla (RLM)

Os dados originais da matriz A_1 foram padronizados (média = 0 e desvio padrão = 1) (Equação 1), eliminando diferenças existentes entre as unidades de medida das variáveis.

$$Z = \frac{x - \mu}{\sigma} \quad \text{Equação 1}$$

Onde: Z = variável padronizada; x = variável original; μ = média; σ = desvio padrão.

Foi realizada análise de multicolinearidade entre as variáveis, de modo que baixos valores de multicolinearidade encontrados não influenciam na estimativa de valores de β das equações de regressão, minimizando os erros.¹⁸

Os dados foram aleatorizados e separados em dois conjuntos (70% para treinamento e 30% para validação) pelo algoritmo de Kennard-Stone.¹⁹ Foram testadas três formas para seleção do modelo: Backward, Forward e Stepwise,²⁰ sendo escolhido o modelo que apresentou o maior coeficiente de determinação (R^2) e menor raiz do erro quadrático médio de treinamento (RMSET) e validação (RMSEV) (Equação 2), além da avaliação do número de parâmetros.

$$RMSE = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_d - x_p)^2} \quad \text{Equação 2}$$

Onde: n = número de observações; x_d e x_p são valores experimentais e previstos, respectivamente, em relação aos tratamentos avaliados.

Regressão por mínimos quadrados parciais (PLS)

Os dados da matriz A_3 foram aleatorizados e divididos em treinamento (70%) e validação (30%) da mesma maneira como descrito em RLM. Os espectros das amostras foram avaliados por PLS a

partir da cross validation para determinar o número mínimo de fatores e o respectivo R^2 , no qual o conjunto de dados é dividido em grupos, onde o modelo é ajustado a todos os grupos, gerando resíduos em cada etapa deste processo, visualizados a partir da raiz do erro quadrático médio da validação cruzada (RMSECV). O modelo foi utilizado para prever as concentrações de leite de vaca em leite de búfala nos dados de validação dos espectros. Os valores de R^2 , RMSECV, RMSET, RMSEV e coeficiente de correlação foram obtidos para explicar a capacidade de predição do modelo.

Resultados e Discussão

Composição química e características físico-químicas

Os resultados de composição química e características físico-químicas das amostras de leite avaliadas apresentaram variações em relação aos tratamentos estudados (Tabela 1).

Tabela 1: Valores mínimos e máximos, médias, desvio padrão e equações de regressão das variáveis utilizadas para construção da matriz A_1 (amostras de leite bubalino, adulteradas e bovino).

Variáveis	Mínimos – Máximos	Médias \pm desvio padrão	Equações de regressão	R^{2*****}
Gordura (%)	3,95 – 8,84	5,28 \pm 0,59	$\hat{Y}=Y=5,28$	*****
Proteína (%)	2,82 – 4,27	3,53 \pm 0,27	$\hat{Y}=Y=3,53$	*****
Lactose (%)	3,89 – 5,37	4,75 \pm 0,32	$\hat{Y}= -0,09248x+5,30627$	0,84
ST (%)*	12,47 – 16,90	14,48 \pm 1,01	$\hat{Y}= -0,3055x+16,30974$	0,92
SD (%)**	7,91 – 10,36	9,20 \pm 0,55	$\hat{Y}= -0,16526x+10,1915$	0,91
Ureia (%)	10,70 – 35,10	21,75 \pm 6,44	$\hat{Y}= 0,04525x^2-2,49756x+34,65387$	0,93
Índice Crioscópico (°H)***	-0,630 - -0,580	-0,610 \pm 0,0069	$\hat{Y}=Y= -0,61$	*****
pH	6,56 – 6,80	6,69 \pm 0,05	$\hat{Y}=Y= 6,69$	*****
Acidez****	10,00 – 20,00	14,05 \pm 1,53	$\hat{Y}=Y= 14,05$	*****

*ST corresponde aos Sólidos Totais. **SD corresponde aos Sólidos Desengordurados. ***Índice Crioscópico expresso em °Hortvet (°H). ****Acidez expressa em °Dornic (°D). ***** R^2 corresponde ao coeficiente de determinação. \hat{Y} = variável resposta. x = valores obtidos nas medidas analíticas para geração da variável resposta. Y = valor médio da

respectiva medida analítica. ***** Não foi possível ajustar equações de regressão de modelo linear ou quadrático ($p > 0,05$).

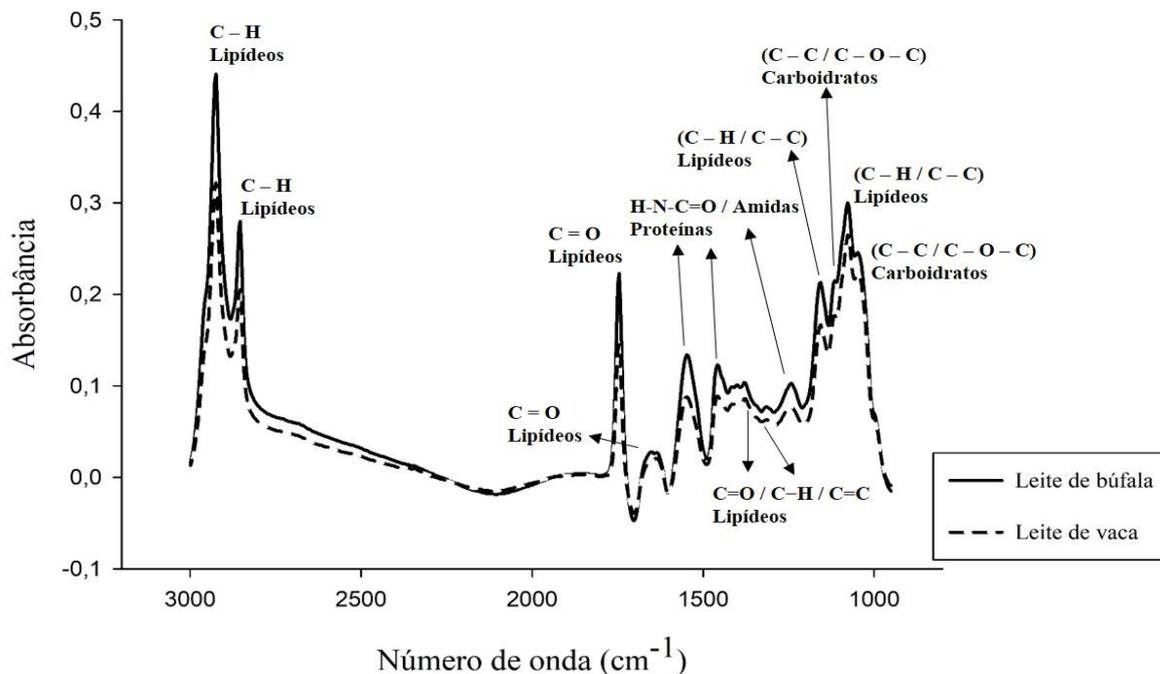
O leite é constituído majoritariamente por água, onde encontram-se dissolvidos ou dispersos componentes sólidos, configurando os sólidos totais (ST) formados por proteínas, lipídeos, carboidratos, vitaminas e minerais. Dos sólidos totais é subtraído o teor de lipídeos, obtendo-se os sólidos desengordurados (SD).²¹ Em virtude de características peculiares da espécie bubalina, associadas a fatores não genéticos como estágio de lactação, estratégias de alimentação e saúde do úbere, entre outros, o leite de búfala geralmente apresenta teores de gordura, lactose, proteínas, ST, SD, vitaminas e minerais superiores ao leite bovino, em contrapartida teor de água inferior, refletindo em menores valores de índice crioscópico, além de maiores resultados de acidez por conta da quantificação de proteínas com características de ácidos,²²⁻²³ facilitando a diferenciação entre os tratamentos do presente estudo.

Espectros na região do infravermelho médio (FTIR) das amostras de leite

A partir das identificações dos grupos funcionais de cada banda nos espectros, em associação aos constituintes (lipídeos, proteínas ou carboidratos) do leite, foram geradas imagens com a sobreposição dos espectros bubalinos e bovinos (Figura 1).

Foram identificados 13 bandas (2 bandas nas regiões de $2977 - 2814 \text{ cm}^{-1}$ referente às vibrações de C – H de lipídeos, 2 bandas em $1788 - 1605 \text{ cm}^{-1}$ relacionados a C = O de lipídeos, 3 bandas em $1574 - 1214 \text{ cm}^{-1}$ originados devido a H-N-C=O de proteínas, 2 bandas em $1417 - 1285 \text{ cm}^{-1}$ de vibrações de C = O / C – H / C = C de lipídeos, 1 banda em $1173 - 1148 \text{ cm}^{-1}$ referente aos grupos C – H / C – C de lipídeos, 1 banda em $1127 - 1097 \text{ cm}^{-1}$ de C – C / C – O – C representando carboidratos, 1 banda em $1102 - 1057 \text{ cm}^{-1}$ da vibração C – H / C – C para lipídeos e 1 banda em $1061 - 1026 \text{ cm}^{-1}$ das vibrações C – C / C – O – C referentes aos carboidratos) a partir de dados disponíveis na literatura^{10, 14-15, 24-25}.

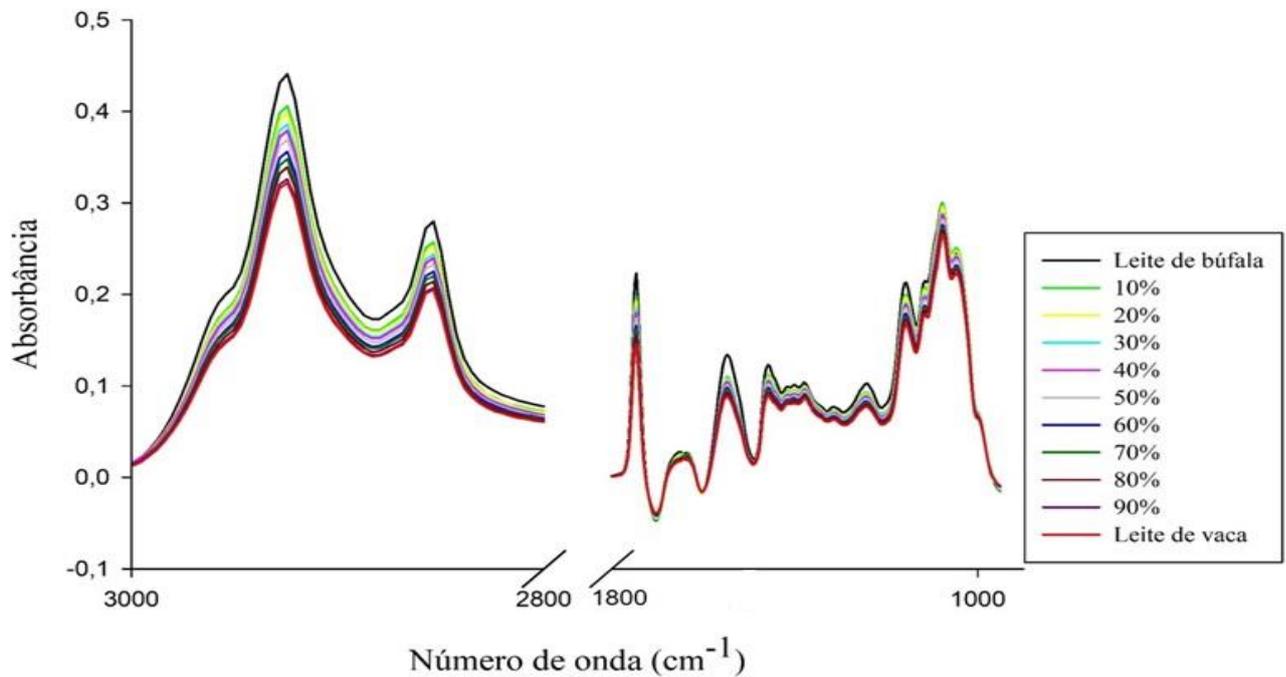
Figura 1: Espectros de FTIR das amostras de leite de búfala e vaca.



Os espectros do leite das duas espécies não apresentaram bandas distintas, mas foram observadas diferenças em relação à intensidade de absorção. As amostras de leite de vaca apresentaram bandas com intensidade inferior às amostras de leite de búfala. Isso se deu em virtude dos maiores percentuais de água nas amostras de leite bovino e, conseqüentemente, menores teores de lipídeos, proteínas e carboidratos, sendo refletidos nos picos dos espectros, pois a intensidade dos modos vibracionais dos grupos funcionais com a radiação emitida na amostra é relacionada aos teores dos constituintes presentes.²³ Quanto maior a concentração dos constituintes maior é a intensidade dos modos vibracionais.

Os espectros dos tratamentos bubalino e bovino, foram sobrepostos aos 9 níveis de adulteração (10% a 90%) (Figura 2).

Figura 2: Espectros de FTIR nas regiões entre 3000 cm^{-1} e 2800 cm^{-1} e entre 1800 cm^{-1} e 1000 cm^{-1} .



Os espectros com os menores níveis de adulteração apresentaram comportamento semelhante ao bubalino e, à medida que leite de vaca foi adicionado ao leite de búfala, os tratamentos passaram a ter características semelhantes ao leite bovino. Os picos são ocasionados devido a vibração de grupos funcionais presentes principalmente na estrutura da gordura, proteínas e lactose do leite, de forma que quaisquer mudanças nos teores destes componentes, observadas em virtude de características peculiares nos leites das diferentes espécies, provocaram variações nos comportamentos das bandas dos espectros.

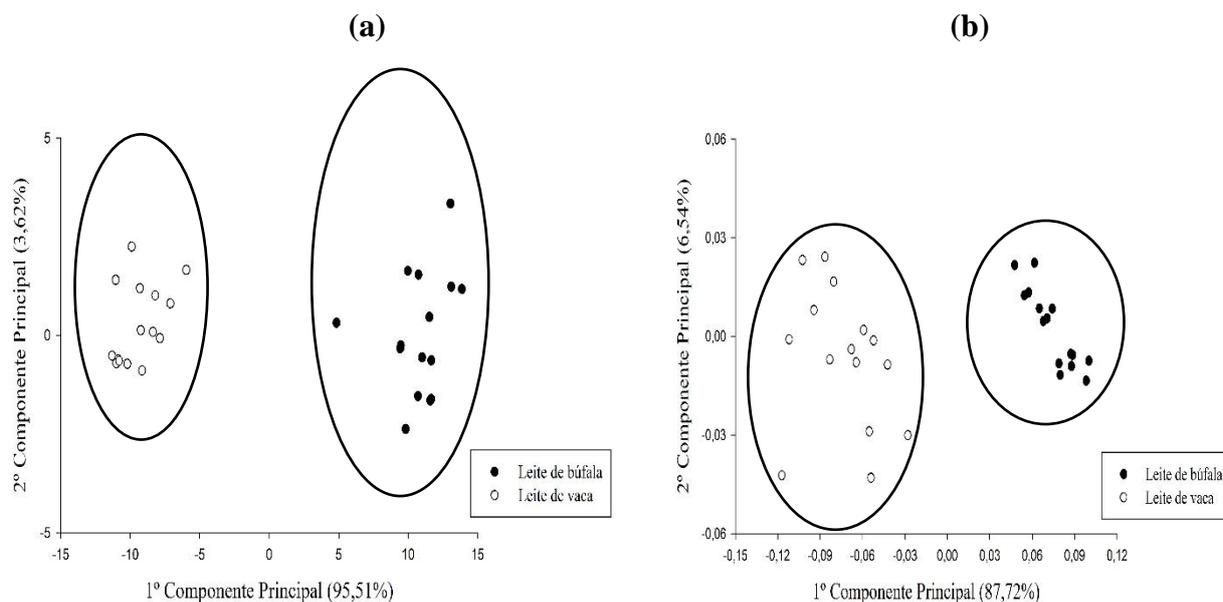
Quimiometria

Análise de componentes principais (ACP)

A classificação dos tratamentos bubalino e bovino por ACP (Figura 3) evidenciou diferenças entre as amostras das duas espécies, além das relações existentes entre as formulações de leite avaliadas e as medidas analíticas. Pelo critério de fatores interpretáveis, associado ao diagrama de

autovalores, foram selecionados 2 CP's que apresentaram as maiores proporções de variância dos atributos originais.

Figura 3: Gráficos bidimensionais de dispersão das amostras de búfala e vaca: (a) composição química e características físico-químicas (matriz A₁); (b) absorbância das bandas dos espectros (matriz A₂).



Para a matriz A₁, o componente principal 1 (CP1) explicou 95,51% e o componente principal 2 (CP2) 3,62% da variância total dos dados, sendo suficientes para discriminar os tratamentos quanto à composição química e características físico-químicas estudadas. As informações mais relevantes dos dados estão contidas no CP1, que comportou-se como uma combinação entre gordura, proteína, lactose, ST, SD, ureia e acidez (medidas positivas) contra o índice crioscópico e pH (negativas). Dessa forma, amostras de leite de búfala possuíram resultados superiores das medidas correlacionadas positivamente quando comparadas com amostras de leite de vaca, por isso a separação espacial em dois grupos distintos por ACP.

Para a matriz A_2 , o CP1 explicou 87,72% da variância total dos dados, enquanto o CP2 6,54%, com isso as amostras também separaram-se em relação ao CP1. Todas as variáveis (13 bandas) foram correlacionadas significativamente com o CP1. A medida que leite de vaca foi adicionado ao leite de búfala os valores de absorvância das bandas diminuíram, ocasionando mudanças de localização de amostras com maiores percentuais de leite bovino para regiões negativas do CP1, pois com a diminuição dos teores dos constituintes do leite de vaca quando comparado ao de búfala, ocorreram menores intensidades de vibração dos grupos funcionais presentes nos constituintes das amostras. Desta forma, amostras de leite de búfala apresentaram características distintas do leite de vaca, em que as 8 bandas relacionadas à gordura influenciaram na diferenciação entre os tratamentos, assim como as 3 bandas relacionadas à proteína e as 2 bandas relacionadas à lactose.

Os CP's, tanto em relação à composição (Figura 4) quanto aos dados de absorvância (Figura 5), foram capazes de explicar a maior parte da variância total dos dados originais, com os maiores percentuais de explicação sendo atribuídos ao CP1 (correlação positiva significativa entre os teores de gordura, proteína, lactose, ST, SD, ureia e acidez para a matriz A_1 e para todos os 13 picos de absorção da matriz A_2). À medida que os índices de adulteração foram aumentando no leite de búfala as amostras foram movimentando-se em direção a escala negativa do CP1, ou seja, diminuindo os valores dos constituintes (com exceção de pH e índice crioscópico) e, conseqüentemente, da absorvância das 13 bandas dos espectros, possibilitando a separação/classificação em grupos distintos. Por ACP (Figuras 4 e 5), pode-se afirmar que a partir de 20% de adulteração é possível observar a separação de amostras de leite de búfala das adulteradas e leite de vaca.

Figura 4: ACP das amostras de leite adulteradas (10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% e 90%), bubalinas e bovinas em relação à composição química e características físico-químicas.

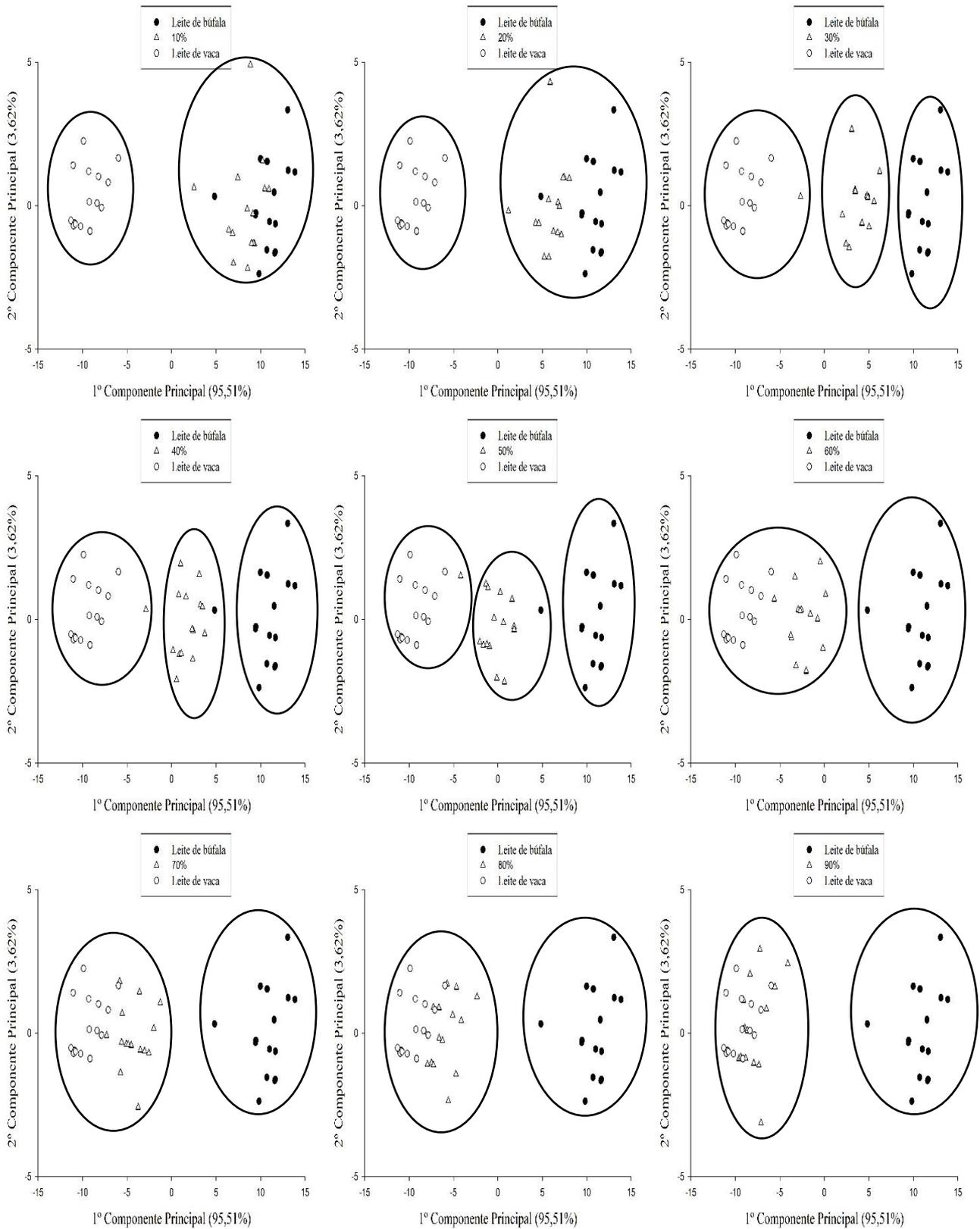
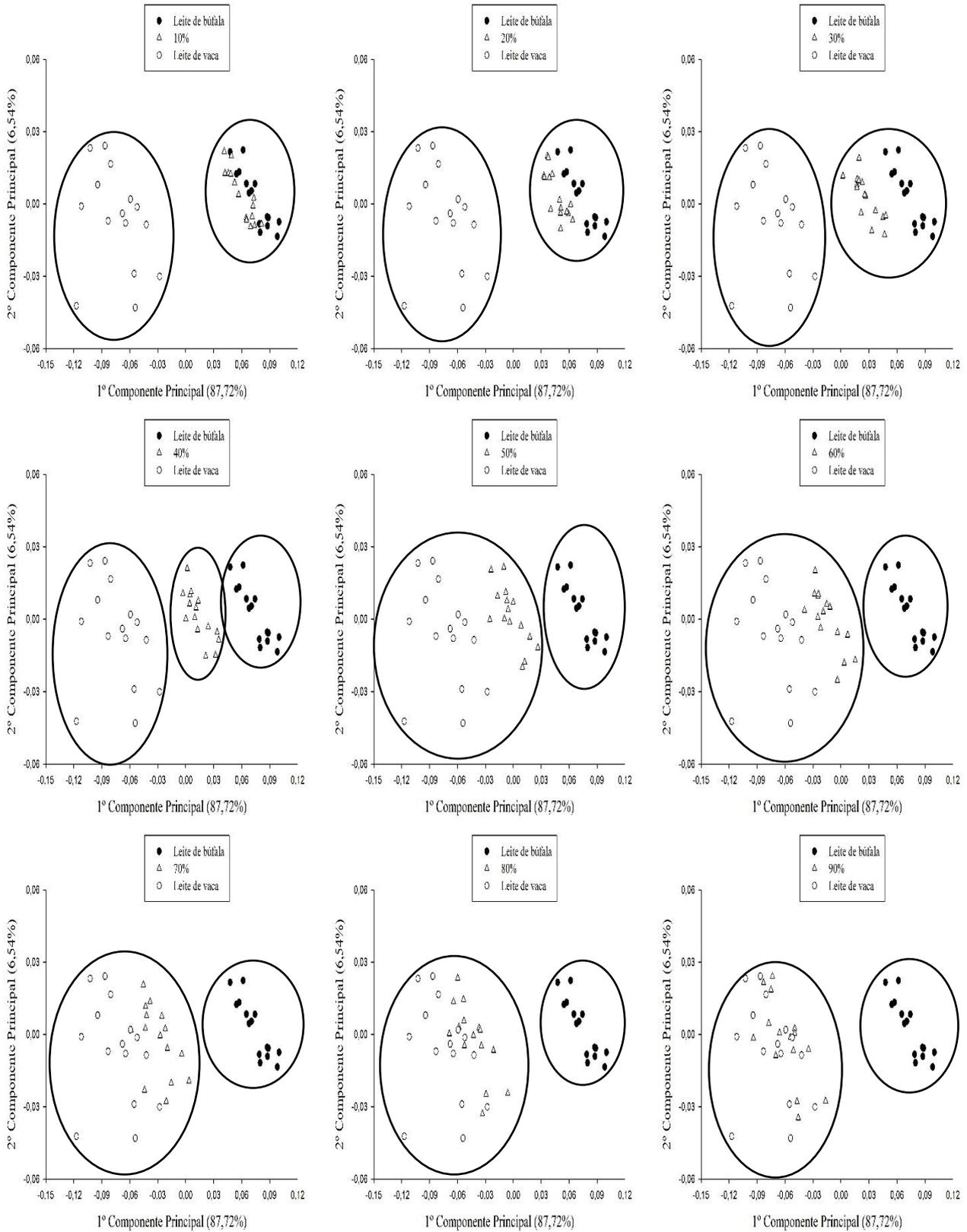


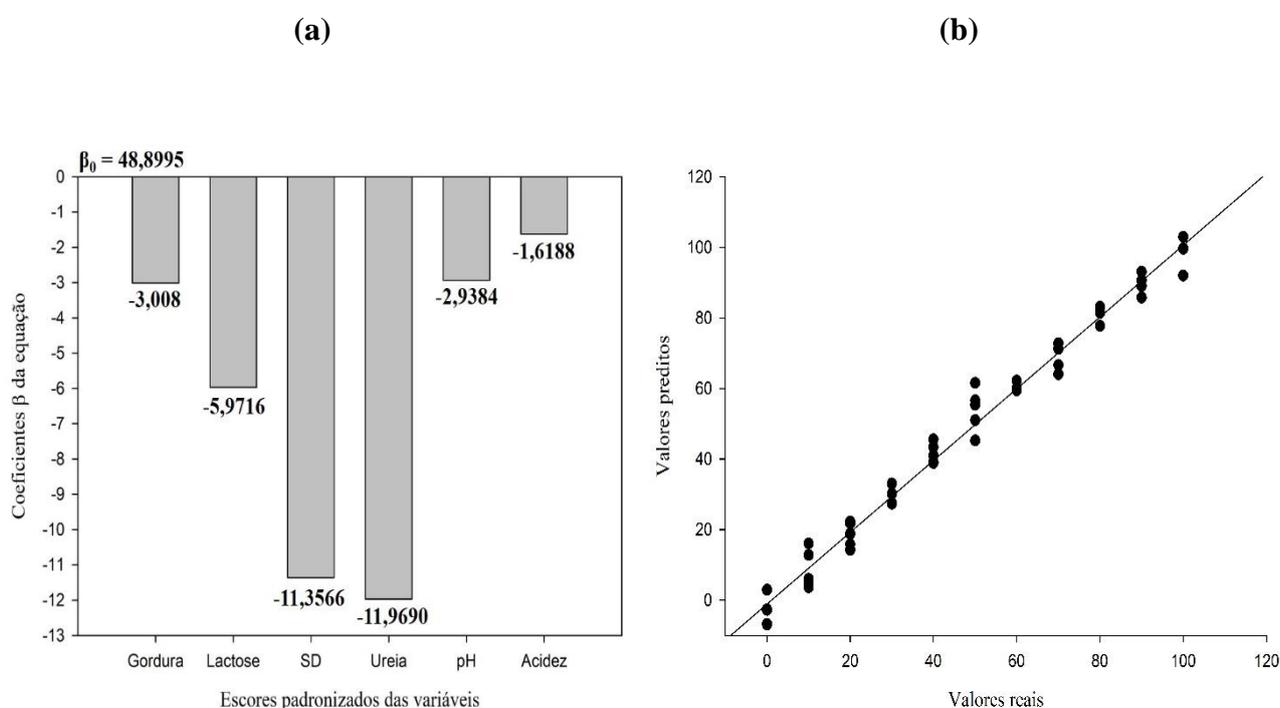
Figura 5: ACP das amostras de leite adulteradas (10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% e 90%), bubalinas e bovinas em relação aos picos dos espectros (FTIR).



Regressão linear múltipla (RLM)

O modelo de RLM foi escolhido pela técnica Backward (Figura 6a). A multicolinearidade entre as variáveis foi baixa (≤ 100), ou seja, no geral não existiu alto grau de correlação entre as variáveis independentes, assim os parâmetros foram estimados com precisão. O modelo foi capaz de prever a quantidade de leite bovino em leite de búfala (Figura 6b) a partir dos dados de composição química e características físico-químicas (matriz A_1), pois não foram gerados altos erros nas comparações entre os valores preditos pelos modelos e os valores experimentais.

Figura 6: (a) Coeficientes de β da equação de regressão; (b) correlação entre valores reais e preditos.



Das variáveis de composição e características físico-químicas apenas índice crioscópico, proteína e ST não foram significativos, ou seja, não são relevantes para a quantificação do teor de leite de vaca em leite de búfala. O modelo apresentou $R^2 = 0,9776$, RMSET = 4,73% e RMSEV = 4,04%, correlação = 0,9963, além de baixa multicolinearidade. Isso demonstra que variáveis que são comumente obtidas no cotidiano ou fazem parte da rotina de laboratórios de controle de qualidade de leite podem ser utilizadas a fim de verificar a autenticidade do leite de búfala. A medida que elevou-

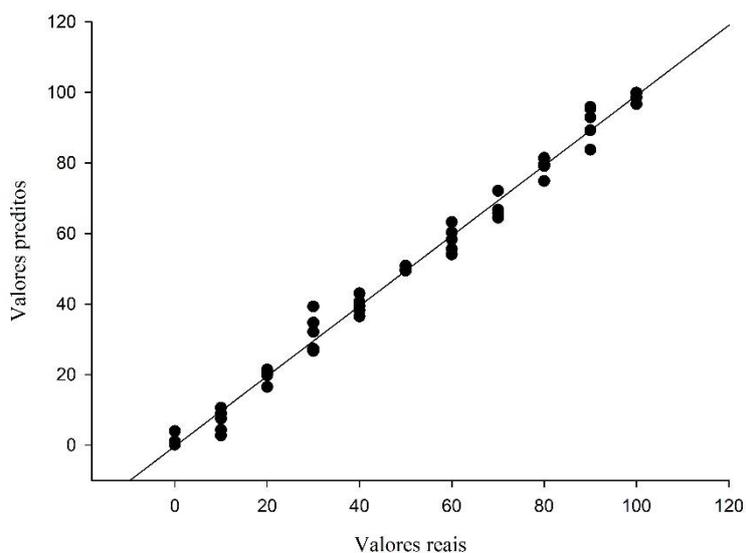
se os percentuais de leite bovino no bubalino ocorreu a diluição dos componentes do leite de búfala, permitindo a quantificação do leite de vaca nas formulações, facilitando a verificação da autenticidade de leite bubalino pelas indústrias de laticínios que utilizam este leite como matéria prima.

Regressão por mínimos quadrados parciais (PLS)

Os dados espectrais (matriz A_3) foram utilizados para prever os teores de leite de vaca em leite de búfala por PLS, técnica estatística que permite o ajuste de variáveis altamente correlacionadas, fato comum em dados de FTIR. Os níveis de adulteração estudados foram quantificados devido à diminuição nas intensidades dos picos dos espectros de FTIR à medida em que foi adicionado leite de vaca nas formulações (Figura 2).

O R^2 do modelo de treinamento foi de 0,9879 sendo necessário 7 variáveis latentes a fim de fatores explicar com maior precisão a variância dos dados. A correlação entre os valores preditos pelo modelo e os valores experimentais para os dados de validação foi de 0,9988 (Figura 7), com RMSET e RMSEV de 3,48%.

Figura 7: Correlação entre valores reais e preditos gerados pelo modelo de PLS.



Alguns estudos utilizaram métodos rápidos associados à estatística multivariada para verificação da autenticidade de leite de búfala. Silva et al.,¹⁰ em estudo com amostras de leite liofilizadas e ATR-FTIR associado a ACP e RNA, encontraram diferenças entre os leites das espécies somente a partir de 40% de adulterações, não sendo possível a predição dos teores de leite de vaca em leite de búfala, somente a classificação. Em contrapartida, Velioglu et al.,¹³ ao pesquisarem sobre a autenticidade do leite bubalino por espectroscopia de fluorescência associada a ACP e PLS encontraram modelos com R^2 de 0,98 e RMSET e RMSEV de 2% e 4%, respectivamente, resultados semelhantes aos encontrados nesta pesquisa.

Com relação a eficácia dos modelos testados verificou-se que os dois modelos (RLM e PLS) apresentaram resultados compatíveis. A modelagem por PLS para os dados espectrais e RLM a partir dos resultados de composição química e características físico-químicas, por apresentarem bons índices de RMSE, R^2 e correlação, mostraram-se eficientes para verificação da autenticidade de leite de búfala, com capacidade de quantificação quando houver a presença de leite de vaca nas amostras avaliadas. O FTIR além de ser uma técnica confiável, rápida e precisa, possibilitando a utilização em pesquisa de indústrias de laticínios e laboratórios de vigilância, pode ser aplicado diretamente ao leite sem a necessidade de preparação de amostras e utilização de reagentes prejudiciais aos manipuladores e ao meio ambiente. Já os dados de composição química e características físico-químicas podem ser utilizados por laboratórios de pesquisa que analisam rotineiramente leite de vaca e búfala.

Comparado ao leite de vaca, o leite de búfala apresenta maiores teores de constituintes, sendo comercializado por preços elevados. Associado a isso, têm-se a questão da diminuição da disponibilidade do leite bubalino em determinadas épocas do ano, geralmente nos meses com estações de primavera-verão. O uso de dados de composição química, características físico-químicas e FTIR associados à quimiometria podem ser capazes de revelar adulterações em leite de búfala, que geralmente ocorrem em quantidades superiores a 10% de adulteração, pois níveis mais baixos não trazem ganhos financeiros significativos. Os resultados desta pesquisa mostraram-se capazes de quantificar os teores de leite de vaca presentes em leite de búfala, oferecendo estratégias alternativas

que podem proporcionar maior poder de fiscalização por parte das indústrias de laticínios que realizam o processamento do leite bubalino e das autoridades de fiscalização.

Conclusões

Foram desenvolvidas duas estratégias alternativas para verificar a autenticidade de leite de búfala, a primeira com base em análises de composição química e características físico-químicas realizadas rotineiramente nos laboratórios de qualidade de leite, e a segunda a partir de espectros de FTIR. Ambas as técnicas, quando associadas à quimiometria, apresentaram resultados compatíveis na detecção das adulterações.

ACP permitiu a separação dos tratamentos em regiões distintas nos gráficos bidimensionais, servindo para classificação das amostras em grupos característicos. Os modelos de RLM e PLS ajustados apresentaram resultados capazes de prever a presença de leite de vaca em leite de búfala, além de descrever o comportamento das amostras de acordo com os efeitos da adição do leite de vaca.

Agradecimentos

Os autores agradecem à “Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior” (CAPES) pelo fornecimento de bolsa de estudo.

Referências

1. Gonçalves, B. R. F.; Silva, G. J.; Pontes, S. F. O.; Fontan, R. C. I.; Egito, A. S.; Ferrão, S. P. B. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2016**, *51*, 1586.
2. Cozzolino, R.; Passalacqua, S.; Salemi, S.; Malvagna, P.; Spina, E.; Garozzo, D. *J. Mass Spectrom.* **2001**, *36*, 1031.
3. Enne, G.; Elez, D.; Fondrini, F.; Bonizzi, I.; Feligini, M.; Aleandri, R. *J. Chromatogr. A.* **2005**, *1094*, 169.

4. Addeo, F.; Pizzano, R.; Nicolai, M. A.; Caira, S.; Chianese, L. J. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 1063.
5. Czerwenka, C.; Müller, L.; Lindner, W. *Food Chem.* **2010**, *122*, 901.
6. Nicolaou, N.; Xu, Y.; Goodacre, R. *J. Dairy Sci.* **2010**, *93*, 5651.
7. Fuselli, F. D.; Montepeloso, E. A.; Ibba, G.; Tidona, F.; Longo, L.; Marianella, R. M. *J. Sci. Food Agric.* **2015**, *95*, 2757.
8. Caira, S.; Nicolai, M. A.; Lilla, S.; Calabrese, M. G.; Pinto, G.; Scaloni, A.; Chianese, L.; Addeo, F. *Food Chem.* **2017**, *230*, 482.
9. Trimboli, F.; Costanzo, N.; Lopreiato, V.; Ceniti, C.; Morittu, V. M.; Spina, A.; Britti, D. *J. Dairy Sci.* **2019**.
10. Silva, L. K. R.; Gonçalves, B. R. F.; Da Hora, F. F.; Santos, L. S.; Ferrão, S. P. B. *Rev. Mex. de Ing. Quim.* **2019**.
11. Locci, F.; Ghiglietti, R.; Francolino, S.; Iezzi, R.; Oliviero, V.; Garofalo, A.; Mucchetti, G. *Food Chem.* **2008**, *107*, 1337.
12. Guerreiro, J. S.; Barros, M.; Fernandes, P.; Pires, P.; Bardsley, R. *Food Chem.* **2013**, *136*, 1526.
13. Velioglu, S. D.; Ercioglu, E.; Boyaci, I. H. *J. Dairy Res.* **2017**, *84*, 214.
14. Santos, P. M.; Pereira-Filho, E. R.; Rodriguez-Saona, L. E. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 1205.
15. Conceição, D. G.; Gonçalves, B. R. F.; Hora, F. F.; Faleiro, A. S.; Santos, L. S.; Ferrão, S. P. B. *J. Braz. Chem. Soc.* **2019**, *30*, 780.
16. Vásquez, N.; Magán, C.; Oblitas, J.; Chuquizuta, T.; Avila-George, H.; Castro W. *J. Food Eng.* **2018**, *219*, 8.
17. International Dairy Federation. <https://www.fil-idf.org/>, Acesso em: Julho 2019.

18. Barreto, V. C. S.; Batistela, G. C.; Gaiotto, M. R.; Simões, D. *Rev. Elet. Paul. Matem.* **2016**, *7*, 109.
19. Kennard, R. W.; Stone, L. A. *Technom.* **1969**, *11*, 137.
20. Tabachnick, B.; Fidell, L. S. *Using multivariate statistics*, 3th ed.; Harper Collins: New York, USA, 1996.
21. Walstra, P.; Geurts, T. J.; Noomen, A.; Jellema; Van Boekel, M. A. J. S. *Ciencia de la leche y tecnología de los productos lácteos*. Acribia: Zaragoza, 2006.
22. Abd El-Salam, M. H.; El-Shibiny, S. A. *Dairy Sci. Technol.* **2011**, *91*, 663.
23. Manuelian, C. L.; Visentin, G.; Boselli, C.; Giangolini, G.; Cassandro, M.; De Marchi, M. J. *Dairy Sci.* **2017**, *100*, 1.
24. Barbosa, L. C. A. *Espectroscopia no Infravermelho na caracterização de compostos orgânicos*. Viçosa: Ed. UFV, 2007.
25. Stuart, B. H. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. New Jersey: John Wiley & Sons, 2004.

Capítulo IV

Artigo 2

Avaliação proteômica por FTIR-ATR, composição química e características físico-químicas combinadas com quimiometria para verificação de autenticidade em muçarela de búfala

O artigo será submetido para avaliação no periódico “Food Control”.

Avaliação proteômica por FTIR-ATR, composição química e características físico-químicas combinadas com quimiometria para verificação de autenticidade em muçarela de búfala

Ben-Hur Ramos Ferreira Gonçalves^{a,b}, Grazielly de Jesus Silva^a, Josane Cardim de Jesus^a, Daniele Gomes Conceição^a, Leandro Soares Santos^a, Antonio Silvio do Egito^c, Sibelli Passini Barbosa Ferrão^{a,*}

^a Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos (PPGECAL), Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), Itapetinga, Bahia, Brasil

^b Centro de Formação em Tecno-Ciências e Inovação (CFTCI), Universidade Federal do Sul da Bahia (UFSB), Itabuna, Bahia, Brasil

^c Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Sobral, Ceará, Brasil

* Autor correspondente

Destaques

- Verificação da autenticidade de muçarela de búfala;
- FTIR-ATR e quimiometria para detecção de leite de vaca em muçarela de búfala;
- FTIR-ATR e RNA de queijos e peptídeos permitiram a identificação de amostras comerciais adulteradas.

Resumo

O objetivo deste trabalho foi a avaliação de queijos muçarela e peptídeos solúveis em água por FTIR-ATR, além da composição química e características físico-químicas associadas à quimiometria como triagem para verificação da autenticidade de muçarela de búfala. Foram produzidos queijos com quantidades crescentes de leite bovino ao bubalino (10% a 90%), com leite de búfala e somente leite de vaca, totalizando 165 amostras, além de serem coletados 11 queijos comerciais de muçarela de búfala. As amostras foram avaliadas (medidas analíticas) em relação aos teores de água, resíduo mineral fixo, gordura, proteína, extrato seco total e desengordurado, pH, acidez, cor instrumental e FTIR-ATR, que também foi aplicado aos peptídeos solúveis em água extraídos dos queijos. Análise

de componentes principais (ACP), discriminante (AD), regressão linear múltipla (RLM) e redes neurais artificiais (RNA) foram aplicadas aos dados. Foi possível a partir das medidas analíticas, por RLM, prever as quantidades de leite de vaca em muçarela de búfala. FTIR-ATR e RNA aos dados espectrais dos queijos e peptídeos garantiram a separação/classificação das amostras em grupos com a presença de leite de vaca (10% a 90% e muçarela de vaca) e muçarela de búfala, sendo viável para triagens na verificação da autenticidade, detectando-se 3 amostras comerciais adulteradas.

Palavras-chave: adulteração; bovinos; bubalinos; queijo.

Abreviações

10% - 90%: percentual de leite de vaca em leite/muçarela de búfala

A₁, A₂ e A₃: matrizes de dados

a*,b*: coordenadas de cromaticidade

ACP: análise de componentes principais

AD: análise discriminante

CP's, CP1 e CP2: componentes principais, componente principal 1 e 2

EST e ESD: extrato seco total e extrato seco desengordurado

FTIR: espectroscopia no infravermelho médio com transformada de Fourier

FTIR-ATR: espectroscopia no infravermelho médio com transformada de Fourier e célula de reflectância total atenuada

GES: gordura no extrato seco

L*: índice de luminosidade

m/v: relação massa-volume

PSA: peptídeos solúveis em água

RLM: regressão linear múltipla

RMSET e RMSEV: raiz do erro quadrático médio de treinamento e validação

RNA: redes neurais artificiais

1. Introdução

O leite de búfala é um alimento que possui boas propriedades nutricionais, sensoriais e tecnológicas (Velioglu et al., 2017), sendo utilizado por indústrias de laticínios na produção de diversos tipos de derivados lácteos, em especial o queijo muçarela (Gonçalves et al., 2016).

O queijo muçarela de búfala deve ser produzido obrigatoriamente a partir de leite bubalino integral de acordo com tecnologia de fabricação específica (Petrela et al., 2015). É um queijo de massa filada, o que confere ao produto características próprias de textura e derretimento (Nguyen et al., 2017), além de apresentar alto teor de gordura na matéria seca, massa elástica e sabor agradável (Locci et al., 2008), com quantidades relevantes de proteínas, vitaminas e minerais (Silva et al., 2015).

Em contrapartida, a produção do leite de búfala apresenta caráter sazonal, com maiores ofertas normalmente no outono-inverno. Associado ao preço elevado quando comparado ao leite de vaca, fraudadores encontram oportunidades para cometerem práticas ilegais de mistura intencional de leite bovino ao bubalino para a produção dos derivados (Czerwenka et al., 2010), o que configura fraude alimentar por adulteração quando não existir a presença da informação da mistura na embalagem dos produtos.

Adulterações por adição de leite de vaca em muçarela de búfala geralmente ocorrem com o objetivo de gerar ganhos financeiros significativos (Dalmaso et al., 2011). Testes laboratoriais que permitam checar a espécie animal produtora do leite utilizado na fabricação do queijo muçarela de búfala possuem aplicabilidade, tanto para os serviços oficiais de fiscalização quanto para laboratórios que certificam a autenticidade dos produtos (Velioglu et al., 2017). Uma série de métodos baseados em avaliações proteômicas, a partir da detecção das especificidades de marcadores únicos ou grupos de marcadores das espécies, a exemplo de proteínas e suas frações, peptídeos e aminoácidos, foram desenvolvidos e/ou adaptados para detectar as fraudes e garantir a autenticidade dos produtos (Locci et al., 2008).

Métodos baseados em eletroforese (Commission Regulation, 2008; Fuselli et al., 2015), imunologia (Addeo et al., 2009; Silva et al., 2015), cromatografia (Enne et al., 2005; Czerwenka et al., 2010; Gonçalves et al., 2016) e espectrometria de massas (Cozzolino et al., 2001) foram utilizados para verificar a autenticidade de leite e queijo muçarela de búfala. Apesar da boa sensibilidade destes métodos empregados na detecção destas adulterações, apresentam a desvantagem de elevados custos na condução das análises, tempos prolongados na geração dos resultados, especialistas altamente treinados e sofisticação laboratorial, além das dificuldades de serem implantados em análises de rotina. Nesse sentido, técnicas espectroscópicas surgem como alternativas viáveis para verificação da autenticidade de alimentos (Boyaci et al., 2015).

A espectroscopia no infravermelho médio (FTIR) é uma técnica de fácil execução, rápida e precisa na obtenção dos resultados, oferecendo vantagens em relação a outras técnicas convencionais (Lohumi et al., 2015). A análise por FTIR de peptídeos solúveis em água (PSA) extraídos de muçarela pode garantir a identificação do tipo de leite utilizado durante a produção dos queijos, indicando a autenticidade dos produtos, ou seja, a técnica laboratorial quando associada à quimiometria é capaz de fornecer respostas interessantes sobre a presença de adulterantes em alimentos (Vásquez et al., 2018).

Portanto, objetivou-se com este trabalho a avaliação de queijos muçarela e peptídeos solúveis em água por espectroscopia no infravermelho médio (FTIR-ATR), além da composição química e características físico-químicas associadas a métodos estatísticos multivariados como ferramentas de triagem para verificação da autenticidade de muçarela de búfala.

2. Material e métodos

2.1. Obtenção do leite e produção dos queijos muçarela

As amostras de leite bovino (vacas Holandês x Zebu) e bubalino (búfalas Jafarabadi x Murrah) foram obtidas em condições higiênico-sanitárias adequadas e imediatamente enviadas para o laboratório de processamento, onde foram submetidas às etapas de filtração para retirada de impurezas e pasteurização a $64^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}/30$ minutos sob agitação constante objetivando a garantia da segurança do alimento.

Os queijos muçarela foram produzidos nos mesmos períodos de coleta dos leites, com adição de quantidades variáveis e crescentes de leite bovino ao bubalino (10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% e 90%), além de formulações fabricadas exclusivamente com leite de búfala e vaca. Para obtenção da massa fermentada, 1L de leite de cada formulação ao atingir $38^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ foi adicionado de 0,03 g de fermento lácteo liofilizado constituído por bactérias mesófilas e termófilas (BV-DEX-06, Bela Vista Produtos Enzimáticos Indústria e Comércio Ltda., Alto Bela Vista, SC, Brasil), 0,4 mL de cloreto de cálcio 50% (m/v) (Coalhopar, Coalhos Bio Paraná LTDA, Alto Piquiri, PR, Brasil) e 0,8 mL de coagulante líquido (HÁ-LA®, Brasil – *Chr Hansen* – força 1:3000). Após 40 minutos em repouso, a massa coagulada foi cortada em cubos, seguida de mexeduras a $38^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos até obtenção de uma massa cozida e firme. A massa foi dessorada, fermentada até atingir pH de 5,1 por aproximadamente 18 horas a temperatura ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$), fatiada, filada em água a $80^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e acondicionada em formas próprias. Em seguida, os queijos foram submetidos à salga, em salmoura contendo 20% de NaCl (m/v) por 1 hora com viragem em 30 minutos, e posterior resfriamento a $6^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 12 horas, sendo então embalados a vácuo (BS 320, R. Baião, Vila Casal

Ubá, MG, Brasil). Cada formulação dos queijos foi produzida em 15 repetições, totalizando 165 unidades experimentais. A fim de se controlar o efeito do armazenamento sob refrigeração na proteólise dos queijos, todas as amostras foram mantidas sob refrigeração a $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 20 dias, sendo então congeladas a $-20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ para análises posteriores.

Um total de 11 marcas comerciais de queijos muçarela de búfala foram obtidas em comércio varejista, coletadas em embalagens próprias, sob refrigeração. Após as coletas, os queijos foram mantidos sob refrigeração a $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ para padronização e maior controle da proteólise. Todos os queijos foram obtidos considerando-se um prazo máximo de 20 dias após a data de fabricação, sendo congelados a $-20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ no 20º dia de fabricação.

2.2. Composição química e características físico-químicas

Foram determinados os teores de água (código 926.08), resíduo mineral fixo (código 935.42), gordura no extrato seco (GES) (código 920.125), proteína (código 920.123), extrato seco total (EST) e extrato seco desengordurado (ESD) por diferença, pH e acidez titulável (código 920.124), em triplicata, de acordo com metodologias descritas pela AOAC (2016).

A cor instrumental dos queijos foi determinada no sistema L^* , a^* , b^* , em colorímetro Colorquest XE (HunterLab, Sunset Hills Reston, VA, EUA), iluminante D_{65} e observador 10° , utilizando o sistema CIELAB (CIE, 1996), previamente calibrado em uma superfície branca e preta, onde L^* representa a luminosidade ($L^* = 0$ – preto e $L^* = 100$ – branco) e a^* e b^* as coordenadas de cor responsáveis pela cromaticidade: ($+a^*$ = vermelho e $-a^*$ = verde, $+b^*$ = amarelo e $-b^*$ = azul).

2.3. Extração dos peptídeos solúveis em água (PSA)

Os PSA foram extraídos dos queijos segundo metodologia adaptada de Ong et al. (2007). 10 g de cada amostra de queijo foram homogeneizadas em mesa agitadora (Q226K, Quimis, Diadema, SP, Brasil) em 50 mL de água ultrapura (Milli-Q, Millipore Corp., Bedford, MA, USA) a 200 rpm por 1 hora. Os extratos contendo os PSA foram filtrados em papel filtro quantitativo (Quanty, J. Prolab Ind. e Com., São José dos Pinhais, PR, Brasil), congelados a $-80^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 horas e liofilizados em liofilizador de bancada FreeZone 4,5 L (LabConco, Kansas City, MO, USA).

2.4. Obtenção dos espectros na região do infravermelho médio (FTIR-ATR)

Os espectros de todas as 165 unidades experimentais dos queijos e PSA liofilizados foram obtidos em equipamento de infravermelho médio (Cary 630 FTIR, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA), equipado com célula de reflectância total atenuada (ATR). Antes de cada coleta foi realizada uma leitura do espectro de fundo. Cerca de 0,05 g das amostras foram colocadas

individualmente sobre o compartimento do acessório onde incidem os raios na faixa do infravermelho (cristal de diamante), sendo obtidos os espectros no modo de absorbância. As repetições de cada amostra foram avaliadas na região espectral com número de onda de 4000 cm^{-1} a 600 cm^{-1} e 64 varreduras, recolhidos com resolução de 4 cm^{-1} a temperatura de $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

2.5. Análises estatísticas multivariadas

O conjunto dos dados foi organizado em matrizes formadas por $m \times n$ elementos (m linhas correspondentes aos tratamentos e n colunas correspondentes as variáveis), construídas para as medidas de composição química e características físico-químicas (matriz A_1), dados de absorbância das bandas dos espectros de queijos (matriz A_2) e PSA (matriz A_3). Foi utilizado o software Statistical Analysis System Student (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) para retirada de *outliers* das matrizes pela distância de Cook, no qual amostras que apresentaram distância ≥ 2 foram descartadas individualmente para cada matriz, e para condução das análises estatísticas multivariadas.

Foi realizada análise de componentes principais (ACP) a partir dos dados das matrizes A_1 para investigar o agrupamento das amostras de acordo com suas respectivas formulações, por meio da obtenção da matriz de covariâncias, que expressa as variâncias individuais e as combinações lineares (covariâncias) entre duas variáveis. Após a obtenção dos autovalores e de seus respectivos autovetores característicos normalizados, foram construídos os componentes principais (CP's), escolhidos de acordo com o critério de fatores interpretáveis associado ao diagrama de autovalores.

Os dados das matrizes A_1 , A_2 e A_3 foram aleatorizados e divididos em dois grupos pelo algoritmo de Kennard-Stone (Kennard e Stone, 1969), onde optou-se por utilizar 70% dos dados para treinamento e 30% para validação na análise discriminante (AD), regressão linear múltipla (RLM) e redes neurais artificiais (RNA).

AD aplicada aos dados da matriz A_1 consistiu em obter funções matemáticas capazes de classificar amostras de queijo muçarela em grupos. Foram utilizados dados padronizados (média = 0 e desvio padrão = 1) e sem *outliers*.

RLM foi aplicada aos dados padronizados da matriz A_1 para prever as quantidades de leite de vaca em muçarela de búfala. Análise de multicolinearidade foi realizada entre as variáveis, referente a razão entre o maior e o menor autovalor da matriz de correlação (Barreto et al., 2016). Foram testadas três formas para seleção do modelo: Backward, Forward e Stepwise (Tabachnick e Fidell, 1996). Foram escolhidos modelos que apresentaram os maiores valores de coeficiente de determinação (R^2) e menor raiz do erro quadrático médio de treinamento (RMSET) e validação (RMSEV) (Eq. 1), além da avaliação do número de parâmetros.

$$RMSE = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_d - x_p)^2} \quad \text{Eq. 1}$$

Onde: n = número de observações; x_d e x_p são valores experimentais e previstos, respectivamente, em relação aos tratamentos avaliados.

RNA a partir das matrizes A_2 e A_3 foi realizada por meio do software Java Neural Network (Wilhelm-Schickard-Institute (WSI), Tübingen, Alemanha), com o intuito de classificar amostras em seus respectivos grupos (adulteradas e não adulteradas). Os dados originais foram padronizados (Eq. 2).

$$y = \frac{x_1 - x_2}{x_3 - x_2} \quad \text{Eq. 2}$$

Onde: y = escore padronizado / x_1 = escore original / x_2 = valor mínimo / x_3 = valor máximo.

Foi utilizada a metodologia de redes supervisionadas (perceptrons multicamadas) para classificação das amostras, com função de ativação logística em todos os neurônios, além de conexões “feed-forward” entre os neurônios e algoritmo de treinamento “Resilient Propagation”, tornando a rede robusta e diminuindo com maior intensidade o RMSET. Foram utilizados 500 ciclos, divididos em 110 iterações, correspondentes aos números de amostras na fase de treinamento.

As configurações das redes foram escolhidas baseadas na minimização do RMSE e no maior percentual de acertos de classificação (Rai et al., 2005).

3. Resultados e discussão

3.1. Composição química e características físico-químicas

Os resultados de composição química e características físico-químicas dos queijos avaliados apresentaram variações (Tabela 1). As amostras de muçarela de búfala apresentaram diferenças estatísticas significativas ($p \leq 0,05$) pelo teste F, em relação às variáveis (gordura, proteína, EST, ESD, acidez, umidade, resíduo mineral fixo, L^* , a^* e b^*), quando comparadas com muçarela de vaca, evidenciando que existem particularidades entre os dois grupos de queijos.

Tabela 1: Valores mínimos e máximos, média e desvio padrão das variáveis dos queijos muçarela (0% a 100%).

Variáveis	Mínimos – Máximos	Média	Desvio padrão
Gordura** (%)	36,68 – 56,54	48,11	4,14
Proteína (%)	23,29 – 43,67	30,47	3,01
EST (%)	49,48 – 64,54	56,14	2,71
ESD (%)	24,87 – 37,39	29,10	2,34
pH	5,27 – 6,15	5,66	0,10
Acidez***	17,96 – 69,60	32,00	7,25
Umidade (%)	35,46 – 50,52	43,85	2,71
Cinzas (%)	2,42 – 5,11	3,11	0,39
L*	56,88 – 98,24	90,35	12,85
a*	-5,32 – 1,71	-1,34	1,59
b*	10,42 – 36,70	23,11	5,83

L* = parâmetro de luminosidade / a* e b* = coordenadas de cromaticidade. ** Gordura expressa em extrato seco (GES). *** Acidez expressa em porcentagem de ácido láctico.

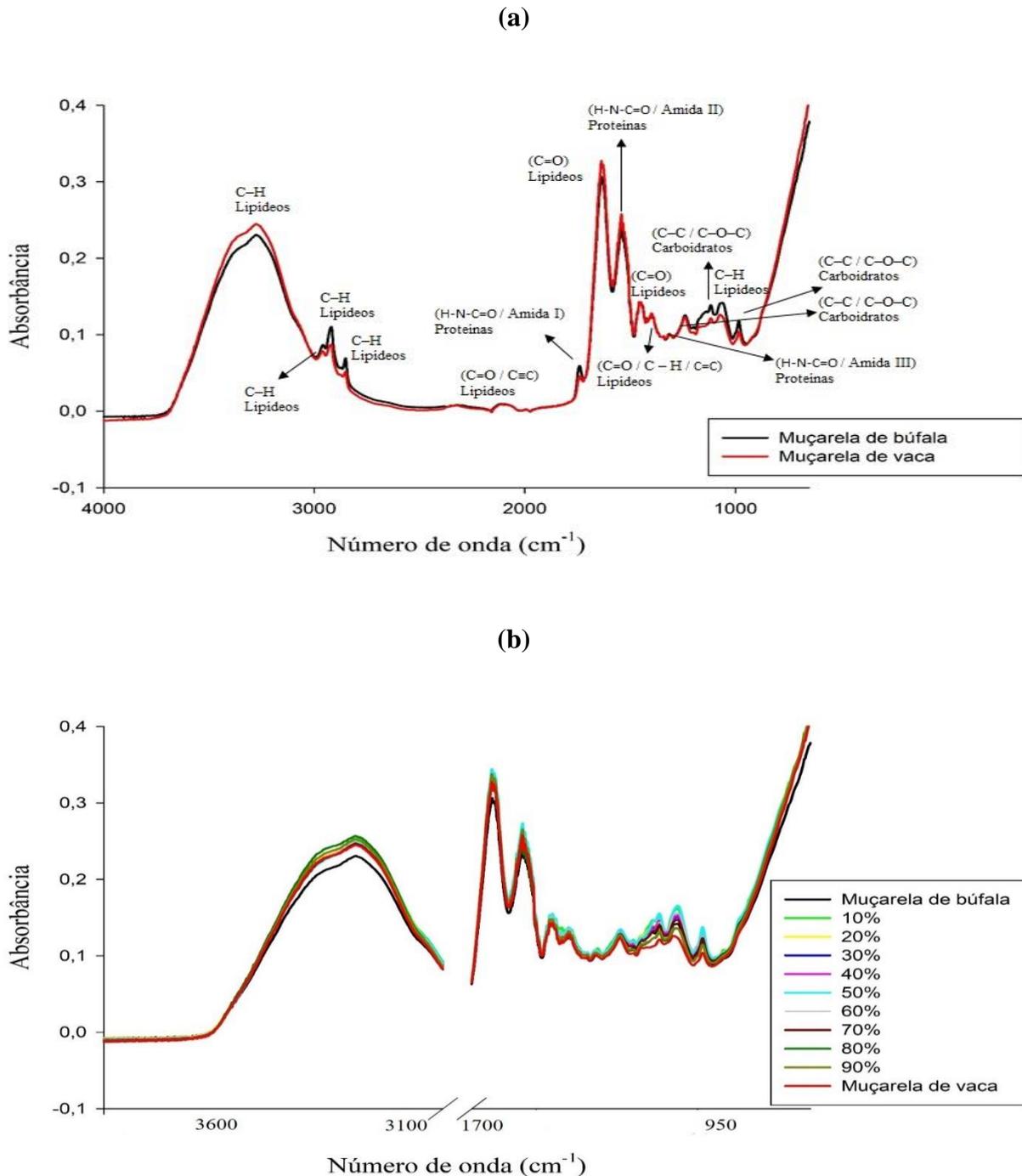
A composição química reflete características de qualidade da matéria-prima e condições do processamento dos queijos. Com a padronização do processo produtivo, as diferenças observadas ocorreram em virtude das peculiaridades individuais dos leites das diferentes espécies. A quantificação dos teores de gordura e proteína explicam as diferenças nos processos de coagulação da massa do queijo, em que o leite de búfala, devido à conformação proteica diferenciada e maiores tamanhos dos glóbulos de gordura, ocasiona menor retenção de água na massa quando comparado ao leite de vaca durante o processo produtivo de muçarela, influenciando nas variações de umidade, EST e ESD (Walstra et al., 2006; Moore et al., 2012).

O parâmetro L* refere-se à capacidade da amostra em refletir ou transmitir luz, variando em uma escala de 0 (preto) a 100 (branco). A coordenada de cromaticidade a* aponta a coloração no intervalo do verde ($a^* < 0$) ao vermelho ($a^* > 0$), enquanto a b* do azul ($b^* < 0$) ao amarelo ($b^* > 0$) (CIE, 1996). Quanto maior o valor L*, maior a coloração branca da amostra. Queijos muçarela de búfala, devido às menores concentrações de β -caroteno na composição química do leite, apresentam tonalidades de colorações mais brancas em comparação aos queijos muçarela produzidos com leite de vaca. Para as coordenadas de cromaticidade a* e b*, a maioria dos queijos produzidos em laboratório (0% a 70%) apresentou colorações nas regiões do verde e amarelo.

3.2. Espectros (FTIR-ATR) dos queijos e PSA

A partir das análises de FTIR-ATR foram obtidos os comportamentos dos modos vibracionais de grupos funcionais presentes nos constituintes dos queijos (Figura 1).

Figura 1: (a) Espectros obtidos em FTIR-ATR das amostras de queijo muçarela de búfala e vaca. (b) Regiões selecionadas entre 3600 cm^{-1} e 3100 cm^{-1} e 1700 cm^{-1} e 950 cm^{-1} para classificação entre amostras de búfala, adulteradas (10% a 90%) e vaca.

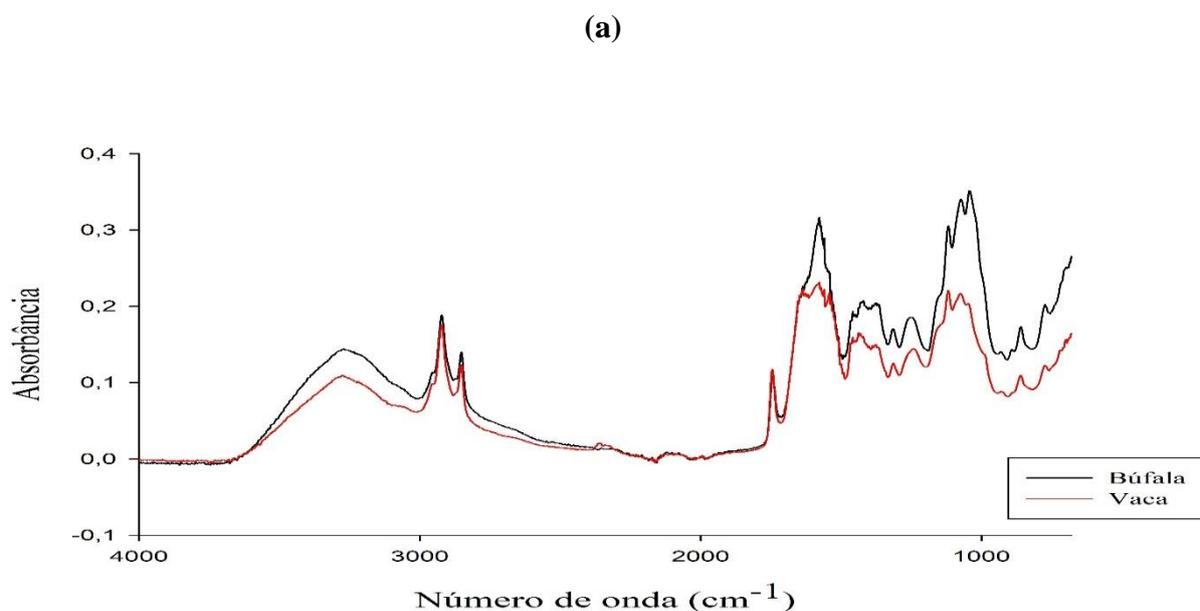


Um total de 15 bandas de absorção foram identificadas (Figura 1a) a partir de dados disponíveis na literatura (Stuart, 2004; Barbosa, 2007; Santos et al., 2013). Não houve a ocorrência de bandas características entre as amostras oriundas de leites das diferentes espécies, porém 10 bandas foram selecionadas (Figura 1b) nas regiões entre 3600 cm^{-1} e 3100 cm^{-1} (vibração do grupo funcional C–H associada aos lipídeos) e 1700 cm^{-1} e 950 cm^{-1} (vibrações C=O/C–H/C=C associadas aos lipídeos, H–N–C=O para Amidas II e III de proteínas e C–C/C–O–C de carboidratos) por apresentarem intensidades de vibração diferentes entre amostras de queijos oriundas de leite de búfala e com a presença de leite de vaca.

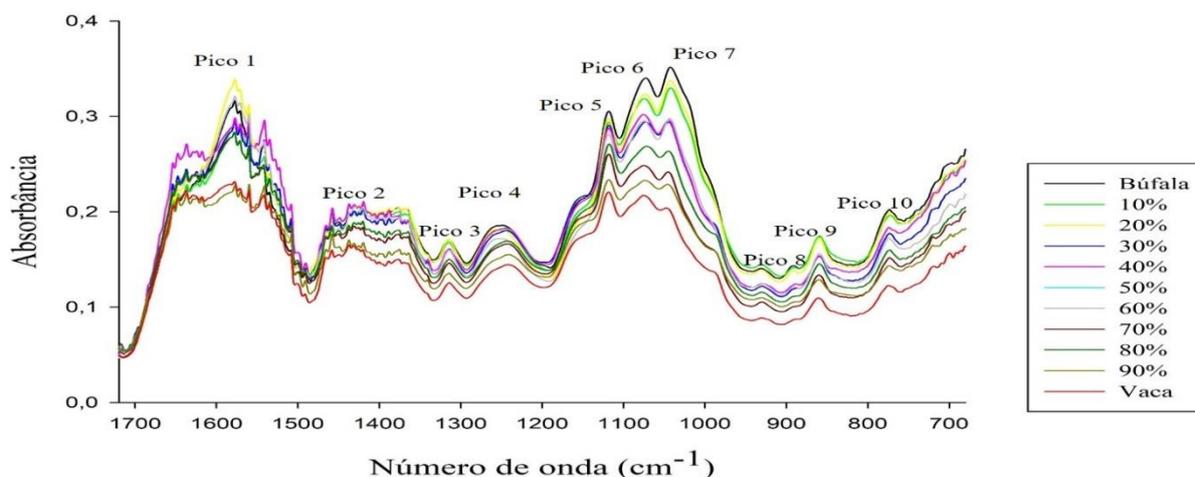
Durante as etapas de corte e cozimento da massa na produção dos queijos, a massa coagulada apresenta-se com glóbulos de diferentes tamanhos (Walstra et al., 2006). Este aspecto, associado aos maiores teores dos constituintes do leite bubalino quando comparado ao leite de vaca, provocam variações no percentual de água dos queijos produzidos, pois quanto menor o tamanho dos glóbulos, maior a sinérese do soro e menor a umidade do produto final, influenciando nos teores dos constituintes e, assim, nos resultados de FTIR-ATR.

Nos espectros obtidos a partir de PSA extraídos dos queijos (Figura 2) observou-se que não houve a presença de bandas diferentes para as espécies bubalina e bovina (Figura 2a), somente diferenças de intensidades de absorção. Assim, 10 bandas foram selecionadas na faixa entre 1720 cm^{-1} e 680 cm^{-1} para classificação dos queijos (Figura 2b).

Figura 2: (a) Espectros obtidos em FTIR-ATR de PSA extraídos de queijos muçarela de búfala e vaca. (b) Espectros (FTIR-ATR) em faixa selecionada entre 1720 cm^{-1} e 680 cm^{-1} de PSA extraídos dos queijos muçarela de búfala, adulteradas (10% a 90%) e muçarela de vaca.



(b)



Em queijos, as proteínas e suas frações sofrem degradações, processo denominado de proteólise, que consiste na quebra de sua estrutura tridimensional e, conseqüentemente, em mudanças conformacionais, dando origem a peptídeos de menor massa molecular e aminoácidos livres. No caso de queijos muçarela (queijos frescos) produzidos a partir de leites de diferentes espécies, neste caso a bubalina e bovina, associado ao processamento e à padronização do tempo de refrigeração (20 dias) antes do congelamento para a realização das análises, efeitos diferenciados nas vibrações de grupos funcionais de PSA extraídos ocorreram, de maneira geral, diminuindo a intensidade de vibração dos picos devido ao aumento dos níveis de adulteração.

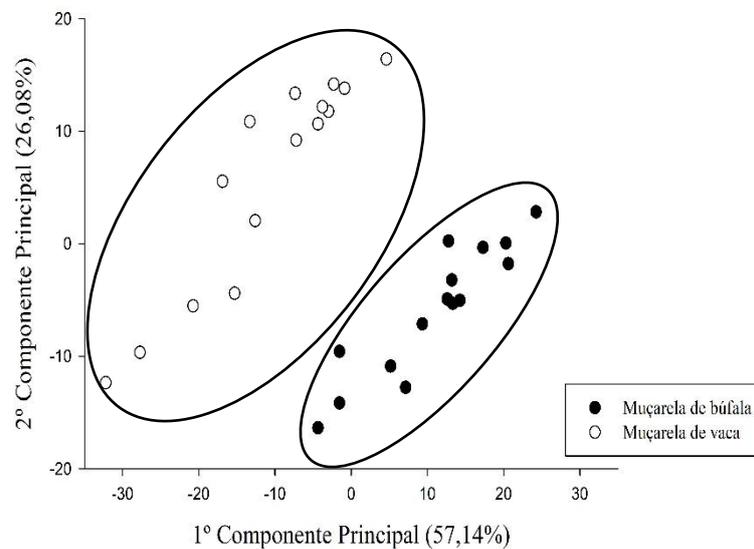
3.3. Análises estatísticas multivariadas

3.3.1. Composição química e características físico-químicas

Os queijos muçarela de búfala e vaca apresentaram comportamento distinto com relação à composição química e características físico-químicas por ACP (Figura 3). Foram selecionados 2 CP's, com o CP1 explicando 57,14% e o CP2 26,08% da variância total dos dados.

Observou-se na figura 3 a formação de dois grupos distintos, o primeiro formado por amostras bubalinas situadas em maior parte na escala positiva do CP1 e negativa do CP2, pois apresentaram maiores valores de GES, EST, acidez e índice de luminosidade L^* . O segundo grupo formado exclusivamente por amostras bovinas, com a maioria localizada na escala negativa do CP1, por apresentarem maiores percentuais de umidade e coordenadas de cromaticidade a^* e b^* .

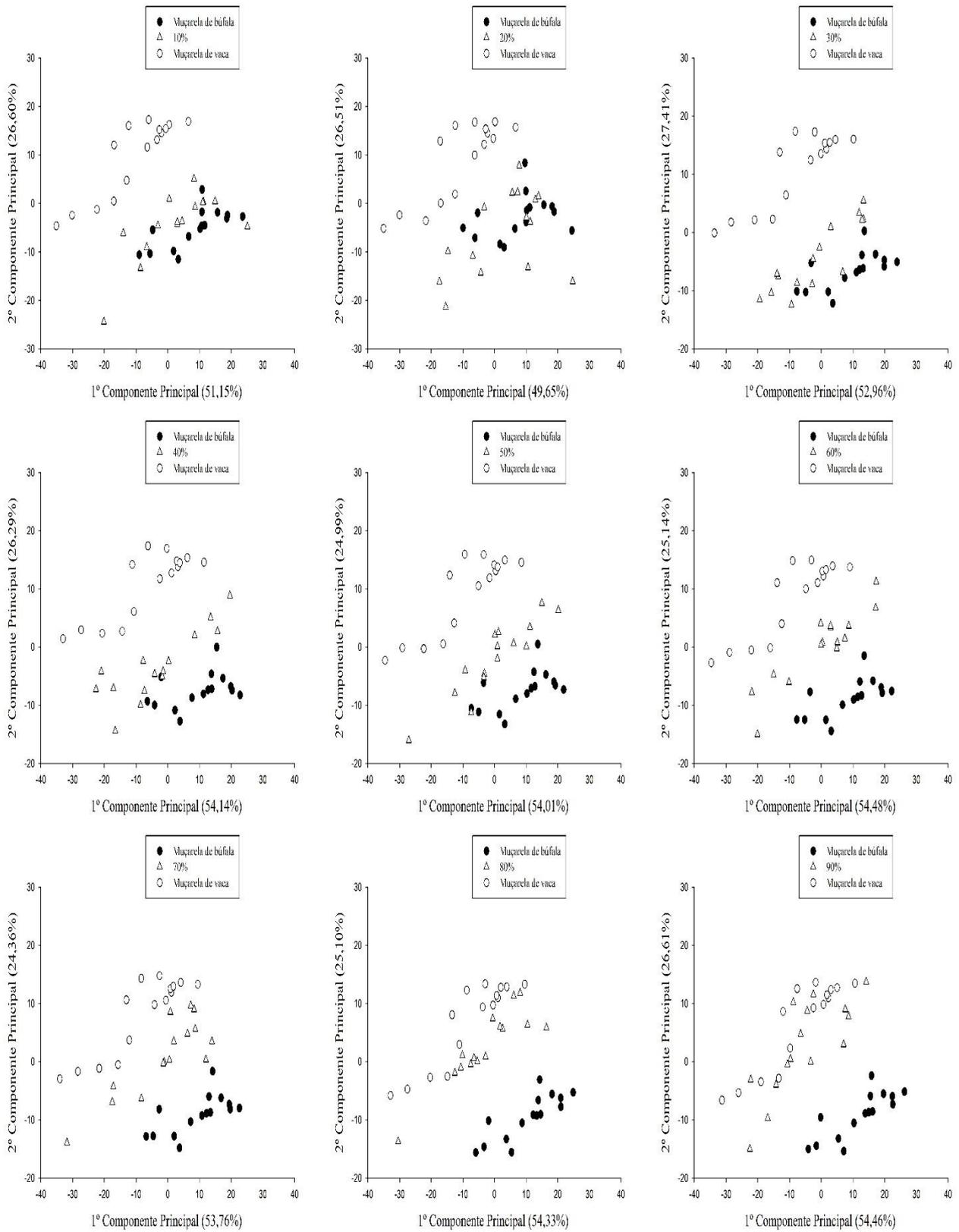
Figura 3: ACP dos queijos muçarela de búfala e vaca em relação à composição química e características físico-químicas.



Objetivando verificar a influência dos diferentes níveis de adulteração de leite de vaca ao leite de búfala foi realizada ACP das adulterações individualmente (10% a 90%) com os tratamentos bubalino e bovino (Figura 4). Igualmente ao que ocorreu na ACP entre amostras de búfala e vaca (Figura 3), foram escolhidos dois CP's (CP1 e CP2) que explicaram a maior parte da variância dos dados.

Com o aumento dos níveis de adulteração nos queijos, observou-se elevações na umidade e coordenadas de cromaticidade a^* e b^* , além de diminuições nos teores de GES, EST e índice de luminosidade L^* , com grupos de amostras movimentando-se na direção da diminuição dos valores do CP1 e aumento dos valores do CP2. Amostras com 10%, 20% e 30% de adulteração situaram-se em regiões próximas ao tratamento bubalino. Os tratamentos com 40% a 60% de leite de vaca localizaram-se em regiões intermediárias entre muçarelas de búfala e vaca, enquanto amostras de 70%, 80% e 90% de leite de vaca apresentaram-se em regiões próximas à do tratamento bovino.

Figura 4: ACP das amostras de queijo adulteradas (10% a 90%), bubalinas e bovinas em relação à composição química e características físico-químicas.



5 funções discriminantes obtidas por AD foram utilizadas para classificação dos queijos em seus respectivos grupos originados pela ACP (grupo 1: muçarela de búfala / grupo 2: 1ª classe de adulteração (10% a 30%) / grupo 3: 2ª classe de adulteração (40% a 60%) / grupo 4: 3ª classe de adulteração (70% a 90%) / grupo 5: muçarela de vaca). Nas funções a AD atribuiu pesos às equações, que foram multiplicados por cada variável a fim maximizar a variância entre os grupos e minimizá-la dentro de cada grupo. Na Tabela 2 encontram-se os percentuais de acertos de classificação das amostras.

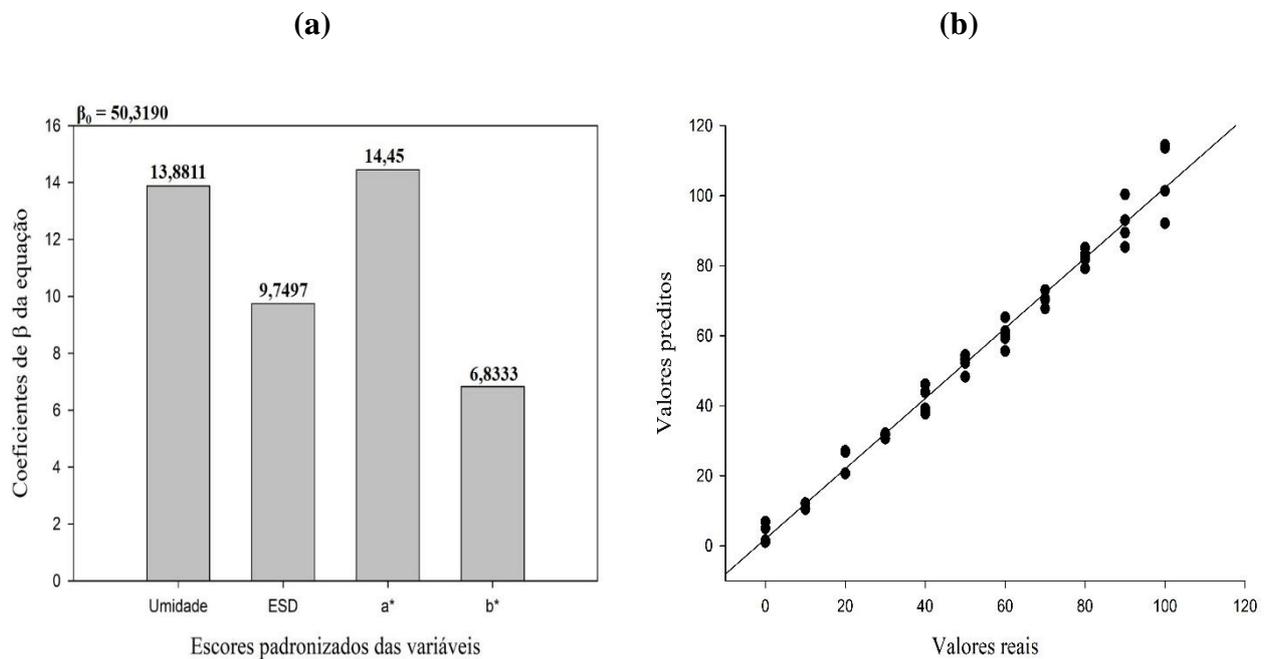
Tabela 2: Número de observações em relação a composição química e características físico-químicas dos queijos e percentuais de classificação por grupo no treinamento (T) e validação (V).

Grupos	Búfala	1ª classe	2ª classe	3ª classe	Vaca	TOTAL
	(T/V)	(T/V)	(T/V)	(T/V)	(T/V)	(T/V)
Búfala	10/4	0/0	0/0	0/0	0/0	10/4
	100/100	0/0	0/0	0/0	0/0	100/100
1ª classe	1/0	26/11	3/0	0/0	0/0	30/11
	3,33/0	86,67/100	10/0	0/0	0/0	100/100
2ª classe	0/0	4/3	24/11	2/1	0/0	30/15
	0/0	13,33/20	80/73,33	6,67/6,67	0/0	100/100
3ª classe	0/0	0/0	2/2	25/8	3/3	30/13
	0/0	0/0	6,67/15,38	83,33/61,54	10/23,08	100/100
Vaca	0/0	0/0	0/0	1/0	9/4	10/4
	0/0	0/0	0/0	10/0	90/100	100/100

As funções garantiram bons percentuais de classificação para os grupos de amostras, principalmente no tratamento bubalino que deve possuir o máximo possível de acertos, ou seja, amostras deste grupo devem ser apresentadas corretamente, não sendo classificados em outros grupos. Com isso, a AD a partir dos dados de composição química e características físico-químicas pode ser utilizada para classificar queijos muçarela de búfala adulterados e não adulterados.

Para o modelo de RLM escolhido pela técnica Backward (Figura 5), a multicolinearidade foi baixa (≤ 100), ou seja, não existiu alto grau de correlação entre as variáveis independentes, assim os parâmetros foram estimados com precisão.

Figura 5: (a) Coeficientes de β da equação de RLM para os dados de composição química e características físico-químicas. (b) Correlação entre valores reais e preditos gerada pelo modelo de RLM.



Poucos parâmetros (escores padronizados de umidade, ESD e coordenadas de cromaticidade a* e b*) foram suficientes para descrever o comportamento das amostras com a adição de leite de vaca e, assim, evidenciar as diferenças entre elas. O modelo foi bem ajustado aos dados ($R^2 = 0,9462$), com alta correlação (0,9909) e baixos RMSET (7,33%) e RMSEV (4,64%), sendo capaz de prever a quantidade de leite bovino nos queijos muçarela (Figura 4b), pois não houve grandes diferenças nas comparações entre os valores preditos e reais.

Os teores de água e as coordenadas de cromaticidade a* e b* aumentaram à medida que elevou-se os percentuais de leite bovino nos queijos. Estes comportamentos podem ser caracterizados por maiores quantidades de constituintes do leite bubalino, além da associação com as diferenças entre a coagulação da massa dos queijos oriundos de leite das diferentes espécies, o que diferencia na retenção de água pela massa. As diferenças na cor das amostras foram confirmadas pela elevação dos valores da coordenada de cromaticidade b*, com valores positivos sendo característicos da cor amarela, mais característica e com maior intensidade nos queijos com maiores teores de leite de vaca.

3.3.2. FTIR-ATR dos queijos e PSA

RNA aplicada aos dados espectrais dos queijos e PSA permitiram a classificação de amostras devido a presença de leite de vaca nas formulações. Os parâmetros utilizados na arquitetura das redes

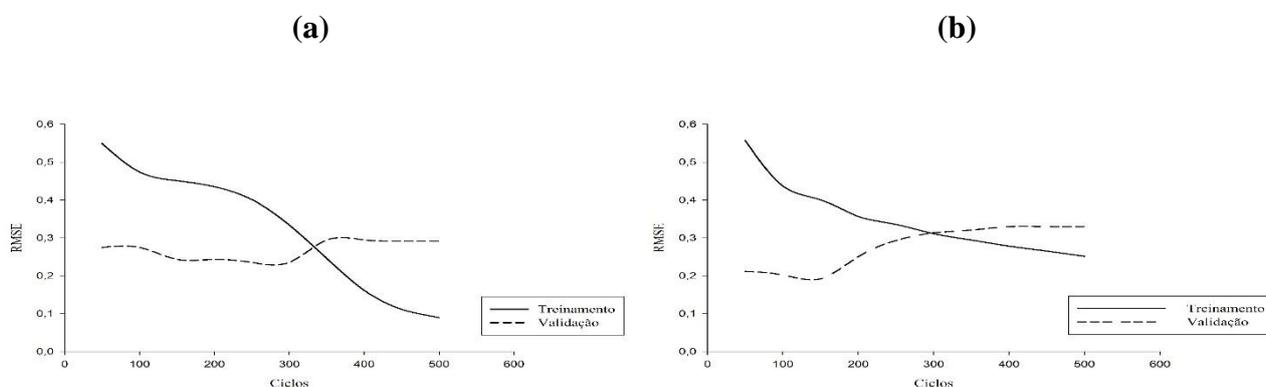
se diferenciaram em relação a quantidade de neurônios das camadas de entrada e intermediárias (Tabela 3).

Tabela 3: Arquitetura das redes para os dados espectrais (FTIR-ATR) dos queijos e PSA.

Parâmetros da RNA	Queijos	PSA
Aprendizagem	Supervisionado	Supervisionado
Função de Ativação	Logística	Logística
Número de variáveis de entrada	10	10
Número de camadas intermediárias	2	2
Número de neurônios na 1ª camada intermediária	50	50
Número de neurônios na 2ª camada intermediária	20	20
Número de variáveis de saída	2	2
Iteração (número de ciclos)	500	500

Os dados de entrada corresponderam às variáveis selecionadas nos espectros (FTIR-ATR), neste caso, 10 bandas referentes aos dados dos queijos (Figura 1b) e 10 bandas utilizadas para classificação em relação aos PSA (Figura 2b). Os neurônios das camadas intermediárias foram escolhidos baseados nas melhores configurações de redes que apresentaram menores RMSET, RMSEV e maiores percentuais de acertos de classificação. A camada de saída das redes foi composta por 2 neurônios, objetivando a classificação das amostras entre muçarela de búfala e adulteradas (grupo formado por queijos com 10% a 90% de leite de vaca) e queijos muçarela de vaca. Nas configurações escolhidas houve boa classificação das amostras, gerando baixos RMSET e RMSEV, o que permitiu a verificação de autenticidade dos queijos (Figura 6).

Figura 6: RMSET e RMSEV em função do número de ciclos nas etapas de treinamento e validação das redes de melhores arquiteturas testadas. (a) queijos muçarela. (b) PSA.



A RNA de classificação dos queijos apresentou RMSET de 0,089, RMSEV de 0,29 e percentual de acertos de classificação de 97,78% (100% de acertos para amostras pertencentes ao grupo de muçarela de búfala e 95,56% para as amostras adulteradas e muçarela de vaca), permitindo a verificação rápida de autenticidade em muçarela de búfala, sem a necessidade da aplicação de métodos caros, demorados e que necessitam de técnicos treinados e da utilização de reagentes químicos prejudiciais.

A rede para classificação a partir de PSA apresentou RMSET de 0,25, RMSEV de 0,33 e percentual de acertos de classificação de 85% (divididos em 80% de acertos para amostras pertencentes ao grupo de muçarela de búfala e 90% para o outro grupo), permitindo a detecção de adulterações em muçarela de búfala, discriminando as amostras em adulteradas e não adulteradas. A detecção das adulterações a partir de 10% pode ser viável em aplicações práticas de triagem na rotina de indústrias e laboratórios de pesquisa.

A maior parte dos estudos para detecção de leite de vaca em muçarela de búfala baseia-se em análise de proteínas e suas frações, peptídeos e aminoácidos por meio de técnicas proteômicas, como eletroforeses, cromatografias e espectrometria de massas, que apesar de apresentarem resultados precisos e confiáveis na detecção da adulteração, são métodos relativamente caros, demorados e difíceis de serem aplicados em análises de rotina, quando comparados com a aplicação de FTIR-ATR. A adição fraudulenta de leite de vaca em leite de búfala geralmente ocorre em níveis superiores a 10% de adulteração, pois níveis mais baixos não trazem ganhos financeiros significativos (Czerwenka et al., 2010; Fuselli et al., 2015; Velioglu et al., 2017).

3.3.3. Verificação da qualidade e autenticidade de amostras comerciais de muçarela de búfala

Foram utilizados os padrões italianos estabelecidos pelo “Decreto del Ministero delle Politiche Agricole e Forestali” (D.M., 2003) para muçarela de búfala de Campana, e os padrões brasileiros para queijo muçarela (Brasil, 1997) para verificações dos índices de qualidade (composição química – teores de água e GES) das amostras comerciais de queijo muçarela de búfala.

De acordo os padrões italianos (D.M., 2003), a muçarela de búfala deve apresentar teor mínimo de gordura na matéria seca de 52% e umidade máxima de 65%. Pelo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Queijo Mozzarella (Muzzarella ou Mussarela) (Brasil, 1997), designado originalmente para muçarela de vaca, esses queijos devem ser produtos de média, alta ou muito alta umidade, com valores máximos de 60% de água; e extragordos, gordos a semigordos, com teores mínimos de 35% de GES.

A umidade das amostras comerciais variou entre 30,84% e 47,32%, com todos os valores situando-se abaixo dos máximos de 65% e 60% estabelecidos pela legislação internacional e nacional, respectivamente. Em relação ao teor de GES, observou-se que os resultados das amostras variaram entre 44,04% e 69,03%. De acordo com a legislação brasileira (Brasil, 1997), 5 queijos apresentaram características de gordos e 6 foram classificados como extragordos. Já pela legislação italiana, 3 marcas de queijo muçarela de búfala se enquadraram abaixo dos teores mínimos de 52% para GES.

Com os dados de composição química e características físico-químicas das amostras comerciais aplicados ao modelo obtido por RLM (Figura 5a), 2 das 11 amostras avaliadas apresentaram, pelo menos 20% e 30% de leite de vaca nas formulações. A aplicação de FTIR-ATR e RNA, tanto nos dados dos queijos quanto nos PSA extraídos, permitiu a classificação de 3 amostras adulteradas com níveis superiores a 10% de leite de vaca nas formulações. A aplicação dos métodos propostos nesta pesquisa em associação aos tradicionais oficialmente empregados para verificação da autenticidade de muçarela de búfala confirmaria a detecção das adulterações e a predição dos níveis de leite de vaca utilizados na produção dos queijos.

4. Conclusões

Foi possível detectar e quantificar a presença de leite de vaca nos queijos por meio das análises de composição química e características físico-químicas associadas à quimiometria, evidenciando a não utilização de equipamentos e técnicas sofisticadas para verificação da autenticidade de muçarela de búfala, o que auxilia no poder de fiscalização por laboratórios de pesquisa. Pelo modelo de RLM gerado a partir destes dados, 2 amostras comerciais foram detectadas com quantidades superiores a 20% de leite de vaca.

Os dados de FTIR-ATR dos queijos e PSA associados às RNA permitiram a identificação de adulteração do queijo a partir da classificação em grupos de amostras não adulteradas e adulteradas, com destaques para a rede desenvolvida para aplicação aos dados espectrais dos queijos, por não ser preciso o preparo das amostras, além de ter apresentado maiores percentuais de acertos de classificação e menores RMSET e RMSEV. As redes permitiram a classificação de 3 amostras comerciais adulteradas.

Os métodos desenvolvidos nesta pesquisa foram eficazes e podem ser utilizados na verificação de autenticidade em muçarela de búfala.

Agradecimentos

Os autores agradecem à “Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior” (CAPES) pelo fornecimento de bolsa de estudo e a Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia por toda a estrutura de laboratórios, equipamentos e reagentes utilizados.

Financiamento

Esta pesquisa não recebeu nenhuma concessão específica de agências de financiamento nos setores público, comercial ou sem fins lucrativos.

Referências

- Addeo, F., Pizzano, R., Nicolai, M. A., Caira, S., & Chianese, L. (2009). Fast isoelectric focusing and anti-peptide antibodies for detecting bovine casein in adulterated water buffalo milk and derived Mozzarella cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 1063-1066.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. (2016). *Official Methods of Analysis*. (18th ed.), Washington: AOAC.
- BARBOSA, L. C. A. (2007). *Espectroscopia no Infravermelho na caracterização de compostos orgânicos*. Viçosa: Ed. UFV.
- BARRETO, V. C. S., BATISTELA, G. C., GAIOTTO, M. R., & SIMÕES, D. (2016). Regressão Linear Múltipla aplicada ao preço do leite. *Revista Eletrônica Paulista de Matemática*, 7, 109-118.
- BOYACI, I. H., TEMIZ, H. T., GENIS, H. E., SOYKUT, E. A., YAZGAN, N. N., GUVEN, B., UYSAL, R. S., BOZKURT, A. G., ILASLAN, K., TORUN, O., & SEKER, F. C. D. (2015). Dispersive and FT-Raman spectroscopy methods in food analysis. *RSC Advances*, 5, 56606-56624.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 364. (1997) Regulamento Técnico para fixação de Identidade e Qualidade do queijo *Mozzarella* (*Muzzarella* ou *Mussarela*). *Diário Oficial da União*, Brasília, DF.
- CIE. Commission Internationale de L'Éclairage. (1996). *Colorimetry*. (2nd ed.). Vienna: CIE publication.
- COMMISSION REGULATION. (2008). Reference method for the detection of cows' milk and caseinate in cheeses from ewes' milk, goats milk and buffaloes' milk or mixtures of ewes' milk, goats milk and buffaloes' milk. *Official Journal of European Communities*, 88, 53-61.

- COZZOLINO, R., PASSALACQUA, S., SALEMI, S., MALVAGNA, P., SPINA, E., & GAROZZO, D. (2001). Identification of adulteration in milk by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 36, 1031-1037.
- CZERWENKA, C., MÜLLER, L., & LINDNER, W. (2010). Detection of the adulteration of water buffalo milk and mozzarella with cow's milk by liquid chromatography-mass spectrometry analysis of β -lactoglobulin variants. *Food Chemistry*, 122, 901-908.
- DALMASSO, A., CIVERA, T., LA NEVE, F., & BOTTERO, M. T. (2011). Simultaneous detection of cow and buffalo milk in mozzarella cheese by Real-Time PCR assay. *Food Chemistry*, 124, 362-366.
- DAMODARAN, S., PARKIN, K. I., & FENNEMA, O. R. (2010). *Química de Alimentos de Fennema*. (4 ed.). Artmed: São Paulo.
- D. M. Decreto del Ministero delle Politiche Agricole e Forestali. (2003). Disciplina di produzione della denominazione di origine protetta della "Mozzarella di Bufala Campana". *Gazzetta Ufficiale*.
- ENNE, G., ELEZ, D., FONDRINI, F., BONIZZI, I., FELIGINI, M., & ALEANDRI, R. (2005). High-performance liquid chromatography of governing liquid to detect illegal bovine milk's addition in water buffalo Mozzarella: Comparison with results from raw milk and cheese matrix. *Journal of Chromatography A*, 1094, 169-174.
- FUSELLI, F. D., MONTEPELOSO, E. A., IBBA, G., TIDONA, F., LONGO, L., & MARIANELLA, R. M. (2015). Detection of fraudulent addition of bovine whey in water buffalo ricotta cheese by isoelectric focusing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95, 2757-2762.
- GONÇALVES, B. R. F., SILVA, G. J., PONTES, S. F. O., FONTAN, R. C. I., EGITO, A. S., & FERRÃO, S. P. B. (2016). Evaluation of the peptide profile with a view to authenticating buffalo mozzarella cheese. *International Journal of Food Science and Technology*, 51, 1586, 1593.
- KENNARD, R. W., & STONE, L. A. Computer aided design of experiments. *Technometrics*, 11, 137-148.
- LOCCI, F., GHIGLIETTI, R., FRANCOLINO, S., IEZZI, R., OLIVIERO, V., GAROFALO, A., & MUCCHETTI, G. (2008). Detection of the cow milk in cooked buffalo Mozzarella used as Pizza topping. *Food Chemistry*, 107, 1337-1341.
- LOHUMI, S. H., LEE, H., & CHO, B-K. (2015). A review of vibrational spectroscopy techniques for the detection of food authenticity and adulteration. *Trends in Food Science & Technology*, 46, 85-98.

- MINGOTI, S. A. (2007). *Análise de dados através de métodos de estatística multivariada*. Belo Horizonte: Editora UFMG.
- MOORE, J. C., SPINK, J., & LIPP, M. (2012). Development and application of a database of food ingredient fraud and economically motivated adulteration from 1980 to 2010. *Journal of Food Science*, 77, 118-126.
- NGUYEN, H. T. H., ONG, L., LOPEZ, C., KENTISH, S. E., & GRAS, S. L. (2017). Microstructure and physicochemical properties reveal differences between high moisture buffalo and bovine Mozzarella cheeses. *Food Research International*, 102, 458-467.
- NICOLAOU, N., XU, Y., & GOODACRE, R. (2010). Fourier transform infrared spectroscopy and multivariate analysis for the detection and quantification of different milk species. *Journal of Dairy Science*, 93, 5651-5660.
- ONG, L., HENRIKSSON, A., & SHAH, N. P. (2007). Angiotensin converting enzyme-inhibitory activity in Cheddar cheeses made with the addition of probiotic *Lactobacillus casei* sp. *Lait*, 87, 149-165.
- PETRELLA, G., PATI, S., GAGLIARDI, R., RIZZUTI, A., MASTRORILLI, P., LA GATTA, B., & DI LUCCIA, A. (2015). Study of proteolysis in river buffalo mozzarella cheese using a proteomics approach. *Journal of Dairy Science*, 98, 7560-7572.
- RAI, P., MAJUMDAR, G. C., DASGUPTA, S., & DE, S. (2005). Prediction of the viscosity of clarified fruit juice using artificial neural network: a combined effect of concentration and temperature. *Journal of Food Engineering*, 68, 527-533.
- SANTOS, P. M., PEREIRA-FILHO, E. R., & RODRIGUEZ-SAONA, L. E. (2013). Application of Hand-Held and Portable Infrared Spectrometers in Bovine Milk Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 1205-1211.
- STUART, B. H. (2004). *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. New Jersey: John Wiley & Sons.
- TABACHNICK, B., & FIDELL, L. S. (1996). *Using multivariate statistics*. (3 ed.). New York: Harper Collins.
- VÁSQUEZ, N., MAGÁN, C., OBLITAS, J., CHUQUIZUTA, T., AVILA-GEORGE, H., & CASTRO, W. (2018). Comparison between artificial neural network and partial least squares regression models for hardness modeling during the ripening process of Swiss-type cheese using spectral profiles. *Journal of Food Engineering*, 219, 8-15.

VELIOGLU, S. D., ERCIOGLU, E., & BOYACI, I. H. (2017). Rapid discrimination between buffalo and cow milk and detection of adulteration of buffalo milk with cow milk using synchronous fluorescence spectroscopy in combination with multivariate methods. *Journal of Dairy Research*, 84, 214-219.

WALSTRA, P., GEURTS, T. J., NOOMEN, A., JELLEMA, & VAN BOEKEL, M. A. J. S. (2006). *Ciencia de la leche y tecnología de los productos lácteos*. Zaragoza: Acribia.