



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

Área de Concentração: Ciência de Alimentos

**ESPECTROSCOPIA MIR E NIR, AVALIAÇÃO PROTEÔMICA E MEDIDAS
ANALÍTICAS ASSOCIADAS À QUIMIOMETRIA PARA DISCRIMINAÇÃO DA
ORIGEM GEOGRÁFICA DE QUEIJO COALHO**

Autora: Larissa Kaully Rosa Silva

Orientadora: DSc. Sibelli Passini Barbosa Ferrão

Co-orientador: DSc. Leandro Soares Santos

ITAPETINGA
BAHIA- BRASIL
Fevereiro de 2021

LARISSA KAULY ROSA SILVA

**ESPECTROSCOPIA MIR E NIR, AVALIAÇÃO PROTEÔMICA E MEDIDAS
ANALÍTICAS E ASSOCIADAS À QUIMIOMETRIA PARA DISCRIMINAÇÃO DA
ORIGEM GEOGRÁFICA DE QUEIJO COALHO**

Tese apresentada à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos para obtenção do título de Doutor (a).

Orientadora: DSc. Sibelli Passini Barbosa Ferrão

Co-orientador: DSc. Leandro Soares Santos

**ITAPETINGA
BAHIA- BRASIL
Fevereiro de 2021**

637.30287 Silva, Larissa Kauly Rosa.

S581e

Espectroscopia MIR e NIR, avaliação proteômica e medidas analíticas associadas à quimiometria para discriminação da origem geográfica de queijo coalho. / Larissa Kauly Rosa Silva. – Itapetinga-BA: UESB, 2021.

177f.

Tese apresentada à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos para obtenção do título de Doutor (a). Área de Concentração: Ciência de Alimentos. Sob a orientação da Prof^a. D. Sc. Sibelli Passini Barbosa Ferrão e coorientação do Prof. D. Sc. Leandro Soares Santos.

1. Queijo coalho – Espectroscopia – Origem geográfica. 2. Queijo coalho - Análise multivariada. 3. Derivados lácteos - Autenticidade. 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. Santos, Leandro Soares. IV. Título.

CDD(21): 637.30287

Catálogo na Fonte:

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

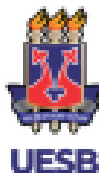
Índice Sistemático para desdobramentos por Assunto:

1. Derivados lácteos – Análise multivariada
2. Queijo coalho - Autenticidade
3. Espectroscopia MIR e NIR



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB
Recredenciada pelo Decreto Estadual
Nº 16.825, de 04.07.2016



Governo do
Estado da Bahia

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Título: ESPECTROSCOPIA MIR E NIR, AVALIAÇÃO PROTEÔMICA E MEDIDAS ANALÍTICAS ASSOCIADAS À QUIMIOMETRIA PARA DISCRIMINAÇÃO DA ORIGEM GEOGRÁFICA DE QUEJO COALHO.

Autor (a): LARISSA KAULY ROSA SILVA

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

Cooorientador (a): Prof. Dr. Leandro Soares Santos

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

Prof.º Dr.º Cristiane Martins Veloso
UESB

Prof.º Dr.º Gabrielle Cardoso Reis Fontan
UESB

Prof. Dr. Ben-Hur Ramos Ferreira Gonçalves
Membro Externo - UFSB

Prof. Dr. Leorges Moraes da Fonseca
Membro Externo - UFMG

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

Itapetinga-BA, 26 de fevereiro de 2021.

*“A persistência é o menor
caminho para o êxito”.*
Charles Chaplin

À Deus
À minha família
Aos Fernandes Amparo
À Ramon

Dedico!

AGRADECIMENTOS

A luta até aqui não foi nada fácil, mas a aprendizagem foi tamanha durante esses quatro anos e só tenho motivos para agradecer! Agradeço primeiramente a Deus, pela saúde e proteção diária e por me conferir sabedoria para que eu possa conquistar meus sonhos e objetivos.

À minha mãe e meu irmão Lucas, pelo amor, carinho e por sempre se fazerem presentes, mesmo distante e por serem a minha base e meu maior incentivo na realização dos meus sonhos. À minha família, meu presente, minha alegria, que sempre esteve ao meu lado, me apoiando, acreditando nas minhas aspirações e me mostrando que sou capaz de alcançá-las. Em especial, um agradecimento à Tia Camila, Tio Eri, Henrique, Alice e Maria. Vocês me proporcionaram mais essa conquista e conseguiram torná-la ainda mais leve, doce, e única...Tia Mil, sem palavras para agradecer a mãe e amiga que você é para mim!

Ao meu compaheiro de vida, Ramon, pelo amor, companheirismo e por sempre me apoiar, me incentivar e me tranquilizar nos momentos mais difíceis. Você é primordial em minha vida e sem o seu apoio seria muito mais difícil chegar até aqui. Te amo!

À minha querida orientadora, professora Dr^a. Sibelli Ferrão. Muito obrigada por todo o ensinamento compartilhado nesses seis anos de trabalho. Só tenho a agradecer pela sua dedicação, disponibilidade, responsabilidade, confiança e pela valiosa contribuição na minha formação acadêmica. Te admiro muito pela pessoa e profissional que és! Uma vida cheia de realizações para você e sua família.

Ao meu co-orientador, professor Dr. Leandro Soares por não ser apenas um co-orientador, mas um verdadeiro incentivador, um professor brilhante, que me inspira como educador e como pessoa. Te agradeço, Léo pela disponibilidade, paciência e por contribuir com o meu trabalho e minha formação, me auxiliando na ampliação dos meus conhecimentos.

Ao Grupo de Estudos em Leite, que sem ele os dias no laboratório seriam mais difíceis e menos alegres. Jô, Beca, Dani, Bel, Grazi, Ben, Lucas, obrigada por todo o auxílio! Foi maravilhoso ter vocês na minha rotina. Jô, mensurar seu apoio nesse período é impossível, então só posso agradecer a Deus pela sua vida e te desejar o melhor, sempre! Sem você, eu não chegaria até aqui! Muito obrigada!

Aos colegas de Doutorado, especialmente a minha amiga e fiel escudeira Jéssica, que me acompanha desde o início da faculdade em nossos projetos de pesquisa. Te levarei comigo sempre!

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

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

À todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para a realização desta Tese.

Meus sinceros agradecimentos!

SUMÁRIO

Resumo.....	17
Abstract.....	18

CAPÍTULO I: REFERENCIAL TEÓRICO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	20
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	22
2.1. Queijo Coalho.....	22
2.2. Propriedades químicas, físico-químicas e tecnológicas do queijo Coalho.....	24
2.3. Indicação geográfica e regiões produtoras de queijo Coalho.....	28
2.4. Caracterizações Analíticas.....	33
2.4.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa e avaliação proteômica em queijos.....	33
2.4.2. Técnicas Espectroscópicas no Infravermelho: NIR e MIR.....	35
2.5. Quimiometria e discriminação de queijos por origem.....	40
2.5.1. Análise de Componentes Principais (ACP).....	41
2.5.2. Análise Linear Discriminante (ALD).....	43
2.5.3. Redes Neurais Artificiais (RNA).....	44
2.6. Estado da arte: aplicação do MIR e NIR associado à quimiometria para discriminação da origem de queijos.....	46
Referências.....	49

CAPÍTULO II: OBJETIVO

1.1. Objetivo Geral.....	63
1.2. Objetivos Específicos.....	63

CAPÍTULO III: Discrimination of Coalho cheese origin by near and middle infrared spectroscopy and analytical measures

1. Abstract.....	66
2. INTRODUCTION.....	67

3. MATERIAL AND METHODS.....	69
4. RESULTS AND DISCUSSION.....	73
5. CONCLUSIONS.....	86
ACKNOWLEDGEMENTS.....	87
CONFLICT OF INTEREST.....	87
AUTHOR CONTRIBUTION INDICATION.....	87
REFERENCES.....	88

CAPÍTULO IV: Espectroscopia (MIR) e cromatografia (RP-HPLC) aplicadas em peptídios solúveis para discriminação da origem geográfica de queijo Coalho

Destaques.....	94
Resumo.....	95
1. Introdução.....	95
2. Material e Métodos.....	97
3. Resultados e Discussão.....	103
4. Conclusões.....	120
Declaração de contribuição dos autores CRediT.....	120
Declaração de conflito de Interesse.....	120
Agradecimentos.....	121
Referências.....	121
Apêndice – Material Suplementar.....	127

CAPÍTULO V: Spectroscopic infrared techniques applied to assessment of the cheeses authenticity: A Review

Highlights.....	129
Abstract.....	130
1. Introduction.....	131
2. Cheese Authenticity.....	132
3. Spectroscopic Techniques in Infrared.....	138
4. Chemometrics and Cheese Authenticity.....	142
5. Application of Spectroscopic Techniques for Cheese Authentication.....	145

6. Conclusions and Future Trends.....	161
Author contribution	161
Declaration of competing interest.....	162
Acknowledgements.....	162
References.....	162

CAPÍTULO VI: Considerações Finais

Considerações Finais.....	176
---------------------------	-----

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I: Referencial Teórico

Figura 1. Fluxograma de produção de queijo Coalho.....	23
Figura 2. Mesorregiões geográficas da Bahia.....	30
Figura 3. (A) Biomas do Nordeste Brasileiro (B) Temperaturas médias anuais do Estado da Bahia e (C) Precipitação de chuvas anuais do Estado da Bahia.....	31
Figura 4. Desenho esquemático relativo à estrutura de peptídeos e proteínas.....	34
Figura 5. Espectros característicos de queijo nas regiões do infravermelho próximo e médio e a discriminação da origem.....	38
Figura 6. Desenho esquemático sobre os grupos amidas dos peptídeos e estrutura secundária das proteínas.....	39
Figura 7. Rede Neural Artificial e unidades de processamento do neurônio artificial.....	45

CAPÍTULO III: Discrimination of Coalho cheese origin by near and middle infrared spectroscopy and analytical measures

Graphical Abstract	66
Figure 1. Geographic location of the producing factories of coalho cheese in the State of Bahia, Brazil.....	70
Figure 2. Coalho cheeses spectra from the mesoregions of Bahia obtained by (A) MIR and (B) NIR; (C) Geographic location of Bahia mesoregions producing coalho cheese.....	77
Figure 3. Graphics of PCA scores from the (A) chemical composition and physicochemical characteristics and (B) technological properties of coalho cheeses from Bahia, Brazil.....	79
Figure 4. Graphics of the PCA scores from absorbance of the spectrum bands in the MIR (A) and NIR (B) for the coalho cheeses from Bahia, Brazil.....	83

CAPÍTULO IV: Espectroscopia (MIR) e cromatografia (RP-HPLC) aplicadas em peptídios solúveis para discriminação da origem geográfica de queijo Coalho

Figura 1. Cromatogramas de peptídios solúveis em água de queijos Coalho de diferentes mesorregiões da Bahia, Brasil, separados por RP-HPLC. Mesorregiões A: Sul; B: Extremo Oeste; C: Nordeste; D: Centro Sul.....	105
---	-----

Figura 2. a) Espectros dos Peptídeos Solúveis em Água (PSA) de queijos Coalho de mesorregiões da Bahia, Brasil, obtidos por MIR. (b) Regiões espectrais ampliadas referentes às amidas A e B (c) Amidas I, II e III. Mesorregiões A: Sul; B: Extremo Oeste; C: Nordeste; D: Centro Sul.....	109
Figura 3. Regiões ampliadas de cromatogramas de cinco peptídios solúveis em água (PSA) de queijos Coalho de diferentes mesorregiões da Bahia, Brasil obtidos por RP-HPLC. Mesorregiões A: Sul; B: Extremo Oeste; C: Nordeste; D: Centro Sul.....	112
Figura 4. (a) <i>Score plot</i> dos peptídeos solúveis em água de queijos Coalho de diferentes mesorregiões referentes aos dados de RP-HPLC; (b) Separação espacial das amostras originadas Sul (A) e Centro-Sul (D); (c) Separação espacial das amostras do Extremo Oeste (B) e Nordeste (C).....	113
Figure 5. (a) <i>Score plot</i> dos peptídeos solúveis em água de queijos Coalho de diferentes mesorregiões referentes aos dados de MIR; (b) Separação espacial das amostras originadas do Sul (A) e Centro-Sul (D); (c) Separação espacial das amostras do Extremo Oeste (B) e Nordeste (C).....	115
Figura 6. Configuração das redes neurais artificiais aplicadas nos dados (a) cromatográficos (RP-HPLC) e (b) espectroscópicos (MIR). Input neurons: P1-P5: picos / B1-B18:bandas; Output neurons: A:Sul, B: Extremo Oeste, C: Nordeste, D: Centro Sul.....	118
Figura 7. Gráfico de RMSET e RMSEV em função do número de iterações nas etapas de treinamento e validação das redes de melhor arquitetura testada para (a) RP-HPLC e (b) MIR.....	119
Figure 1S. Separação cromatográfica (RP-HPLC) de peptídeos solúveis em água (PSA) extraídos de queijo Coalho da Bahia, Brasil e número de frações peptídicas obtidas, demonstradas na Tabela 1.....	127

CAPÍTULO V: Spectroscopic infrared techniques applied to assessment of the cheeses authenticity: A Review

Figure 1. Production chain, processing and authenticity of cheese.....	134
Figure 2. Spectral regions in near and middle infrared and cheese authenticity analysis.....	142
Figura 3. Chemometric methods commonly used for cheese authentication.....	144

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I: Referencial Teórico

Tabela 1. Bandas e associações de grupos funcionais nas regiões NIR e MIR em queijos.....37

CAPÍTULO III: Discrimination of Coalho cheese origin by near and middle infrared spectroscopy and analytical measures

Table 1. Analytical measures of coalho cheese by mesorregion from Bahia, Brazil.....74

Table 2. Classification of the coalho cheeses origin by mesorregion regarding chemical and physicochemical characteristics, technological properties and spectral data (MIR and NIR) by applying LDA functions.....85

CAPÍTULO IV: Espectroscopia (MIR) e cromatografia (RP-HPLC) aplicadas em peptídios solúveis para discriminação da origem geográfica de queijo Coalho

Tabela 1. Áreas dos picos (%) das frações peptídicas dos queijos Coalho de diferentes mesorregiões da Bahia, Brasil, obtidos por RP-HPLC.....104

Tabela 2. Percentuais de classificação da configuração de rede neural artificial escolhida referentes aos peptídeos solúveis em água (PSA) de queijos Coalho de diferentes mesoregiões da Bahia, Brasil avaliados por RP-HPLC e MIR.....118

CAPÍTULO V: Spectroscopic infrared techniques applied to assessment of the cheeses authenticity: A Review

Table 1. Bands and associations of functional groups in the MIR and NIR regions in cheese.....140

Table 2. Application of the NIR for cheese authenticity.....146

Table 3. Application of MIR for cheese authenticity.....154

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
>	Maior
<	Menor
°C	Graus celsius
®	Marca registrada
g	Gramas
σ	Desvio padrão
μ	Média
C	Carbono
H	Hidrogênio
O	Oxigênio
N	Nitrogênio
L*	Índice de luminosidade
a*	Coordenada de cromaticidade a
b*	Coordenada de cromaticidade b
R	Coefficiente de correlação
n	Número
a _w	Atividade de água
β	Beta
α	Alfa
±	Mais ou menos
mm	Milímetros
cm ⁻¹	Centímetros a -1
%R	Reflectância
S	Matriz de covariância
μ L	Microlitro
V/V	Volume/volume
\bar{X}	Média
SD	Desvio padrão

LISTA DE SIGLAS

UESB	Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia
BA	Bahia
ACP	Análise de Componentes Principais
CP	Componentes Principais
ALD	Análise Linear Discriminante
MIR	<i>Mid infrared Spectroscopy</i>
NIR	<i>Near infrared Spectroscopy</i>
IR	<i>Infrared</i>
SAS	<i>Statistical Analysis System</i>
GES	Gordura no Extrato Seco
EST	Extrato Seco Total
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
FT	<i>Fourier Transformed</i>
FTIR-ATR	<i>Fourier Transformed Infrared Spectroscopy – Attenuated Total Reflectance</i>
APT	Análise do Perfil De Textura
pH	Potencial Hidrogeniônico
ICS	Sociedade Internacional de Quimiometria
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
UV	Ultravioleta
RP-HPLC	<i>Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography</i>
IG	Indicações Geográficas
IP	Indicação de Procedência
DO	Denominação de Origem
APT	Análise de Perfil de Textura
DOP	Denominação de Origem Protegida
IGP	Indicação Geográfica Protegida

ETG	Especialidade Tradicional Garantida
INPI	Instituto Nacional de Propriedade Industrial
SNV	<i>Standard Normal Variate</i>
MSC	<i>Multiplicative Scatter Correction</i>
RNA	Redes Neurais Artificiais
MLP	<i>Multilayer Perceptron</i>
SNNS	<i>Stuttgart Neural Network Simulator</i>

RESUMO

SILVA, L. K. R. **Espectroscopia MIR e NIR, avaliação proteômica e medidas analíticas associadas à quimiometria para discriminação da origem geográfica de queijo Coalho.** Itapetinga, BA: UESB, 2021. 177 p. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Área de Concentração: Ciências de Alimentos.*

Objetivou-se utilizar o infravermelho próximo (NIR) e médio (MIR), perfis proteômicos avaliados por MIR e cromatografia (RP-HPLC) e medidas analíticas associados à quimiometria para discriminar a origem geográfica de queijos Coalho. Os queijos foram obtidos das mesorregiões Sul (n=10), Extremo Oeste (n=20), Nordeste (n=10) e Centro-Sul (n=30) da Bahia, Brasil, oriundos de sete laticínios distintos, totalizando 70 amostras, coletadas com até 10 dias de fabricação e congeladas com 20 dias, até as análises. Obteve-se dados de composição química e características físico-químicas (umidade, cinzas, extrato seco total, proteína, gordura no extrato seco, acidez titulável, pH e cor instrumental), propriedades tecnológicas (Análise do Perfil de Textura e derretimento) e espectros do MIR e NIR. Peptídeos solúveis em água foram extraídos dos queijos e avaliados por RP-HPLC e MIR. Foram aplicadas a Análise de Componentes Principais (ACP), Análise Linear Discriminantes (ALD) e Redes Neurais Artificiais (RNA). ACP e ALD, aplicadas aos dados dos queijos foram capazes de evidenciar suas diferenças, pela formação de grupos distintos e boas taxas de classificação, com destaque para as variáveis pH, a_w , teor de gordura e grupos funcionais indicativos de água e gordura, sendo a melhor discriminação observada com o NIR. Com o estudo proteômico, RP-HPLC indicou cinco peptídeos marcadores para diferenciação dos queijos e o MIR apresentou perfis espectroscópicos distintos, variando conforme a origem geográfica. Com a ACP observou-se a formação de grupos distintos dos queijos nos gráficos bidimensionais para ambas as técnicas e com modelos de RNA todos os queijos foram classificados corretamente, na etapa de validação, associado a baixas taxas de erro. Os resultados deste estudo demonstraram que o NIR foi uma técnica útil na discriminação da origem de queijos Coalho, pois suas características químicas refletiram nos dados espectrais. Avaliando o perfil proteômico, o MIR mostrou ser a melhor alternativa para discriminação pois apresentou separação e classificação semelhantes ao RP-HPLC, além de ser uma técnica rápida, menos onerosa e robusta. O uso do NIR e MIR associados a quimiometria são alternativas eficientes e rápidas para discriminar queijos Coalho por origem contribuindo para a autenticidade e maior agregação de valor ao produto.

Palavras-chave: derivados lácteos, análise multivariada, espectroscopia.

* Orientadora: DSc. Sibelli Passini Barbosa Ferrão, UESB.
Co-orientador: DSc. Leandro Soares Santos, UESB.

ABSTRACT

SILVA, L. K. R. **MIR and NIR spectroscopy, proteomic evaluation and analytical measures associated with chemometry to discriminate the geographical origin of Coalho cheese.** Itapetinga, BA: UESB, 2021. 177 p. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Área de Concentração em Ciências de Alimentos.*

The objective was to use the near infrared (NIR) and middle (MIR), proteomic profiles evaluated by MIR and chromatography (RP-HPLC) and analytical measures associated with chemometry to discriminate the geographical origin of Coalho cheeses. The cheeses were obtained from the South (n=10), Far West (n=20), Northeast (n=10) and Center-South (n=30) mesoregions of Bahia, Brazil, from seven different dairy products, totaling 70 samples collected with up to 10 days of manufacture and frozen with 20 days, until analysis. Data on chemical composition and physicochemical characteristics (moisture, ash, total dry extract, protein, fat in the dry extract, titratable acidity, pH and instrumental color) were obtained, technological properties (Texture Profile Analysis and melting) and spectra MIR and NIR. Water-soluble peptides were extracted from the cheeses and evaluated by RP-HPLC and MIR. Principal Component Analysis (PCA), Linear Discriminating Analysis (LDA) and Artificial Neural Networks (ANN) were applied. ACP and ALD, applied to the cheese data, were able to show their differences, by the formation of distinct groups and good classification rates, with emphasis on the variables pH, a_w , fat content and functional groups indicative of water and fat, being the best discrimination observed with the NIR. With the proteomic study, RP-HPLC indicated five marker peptides for cheese differentiation and the MIR presented distinct spectroscopic profiles, varying according to geographic origin. With the ACP it was observed the formation of distinct groups in the two-dimensional graphics for both techniques and with RNA models all cheeses were classified correctly, in the validation stage, associated with low error rates. The results of this study demonstrated that the NIR was a useful technique in discriminating the origin of Coalho cheeses, since its chemical characteristics reflected in the spectral data. Assessing the proteomic profile, MIR proved to be the best alternative for discrimination because it presented separation and classification similar to the RP-HPLC, in addition to being a fast, less expensive and robust technique. The use of NIR and MIR associated with chemometry are efficient and fast alternatives to discriminate Coalho cheeses by origin, contributing to the authenticity and greater added value to the product.

Keywords: dairy derivatives, multivariate analysis, spectroscopy.

* Advisor: DSc. Sibelli Passini Barbosa Ferrão, UESB.

Co-Advisor: DSc. Leandro Soares Santos, UESB.

Capítulo I

Referencial Teórico

1. INTRODUÇÃO GERAL

O queijo Coalho é um produto de alto valor comercial e socioeconômico e um dos mais populares queijos brasileiros originados do Nordeste, que ocupa uma posição de destaque devido à versatilidade e aceitabilidade (FONTENELE et al., 2017). A sua produção e consumo tem ganhado espaço em todo o país, sendo que o Estado da Bahia se destaca por possuir uma das mais importantes bacias leiteiras do Nordeste, contribuindo com parcela significativa na expansão do queijo 'Coalho produzido no Brasil (IBGE, 2019).

É um queijo não maturado, produzido com leite bovino integral pasteurizado e obtido através da coagulação enzimática pela ação do coalho. Entre suas particularidades possui uma composição de médio a alto teor de água e gordura, textura firme, sabor levemente ácido e o não derretimento durante o aquecimento. É consumido integralmente, tostado e é considerado ingrediente indispensável no preparo de muitos pratos típicos do Nordeste, como baião de dois, cuscuz e tapioca (BRASIL, 2001; QUEIROGA et al., 2013).

Sabe-se que a origem geográfica e os fatores climáticos, de solo, frequência de chuvas, bioma, assim como os processos e tecnologias locais aplicadas podem afetar as características finais dos queijos, proporcionando diferentes propriedades químicas e físico-químicas, além de também gerar peptídeos específicos, aspectos que se referem à essência territorial (SILVA et al., 2016; JABRI et al., 2020).

O interesse do consumidor por produtos tradicionais como o queijo Coalho vem crescendo nos últimos anos e a valorização da territorialidade dos queijos pode trazer maior agregação de valor ao produto podendo assim expandir novos mercados, sendo interessante buscar alternativas eficientes para classificação da origem geográfica do produto para garantia da autenticidade e rastreabilidade (SANTOS et al., 2017).

Indicações Geográficas (IG) são ferramentas de proteção e promoção comercial de produtos tradicionais, vinculados a determinados territórios, que agregam valor ao produto, promovendo a herança histórico-cultural da região produtora, e dentre as IG's, a Denominação de Origem (DO) se refere ao diferencial que as características do território agregam ao produto. Estabelecer a identidade de origem de um produto é uma forma eficaz de atribuir maior credibilidade no mercado em função dos seus aspectos regionais, assim, a realização de estudos que possam encontrar variáveis que sirvam como marcadores que contribuam para obtenção de IG favorecem a sua valorização (WILKINSON et al., 2017).

Além de estudo químico e físico-químico do queijo, a avaliação proteômica, que envolve as proteínas e suas frações peptídicas têm sido promissora para a obtenção de marcadores

moleculares para a autenticidade do produto visando a identificação de origem de queijos, principalmente as IG's, como a Denominação de Origem. A maioria dos trabalhos que abordam esta perspectiva envolvem a aplicação de ensaios eletroforéticos (GONÇALVES et al., 2016) cromatográficos (GUERREIRO et al., 2013) e a espectrometria de massas (SILVA et al., 2016; LIMA et al., 2017; DIAS et al., 2019), técnicas que apesar de confiáveis, de boa sensibilidade e precisão são onerosas e demandam uso de reagentes e longos períodos para as análises.

Assim, há uma demanda crescente por técnicas rápidas, de fácil execução, que requerem pouco preparo de amostras, boa sensibilidade e baixo custo operacional, reduzindo o uso de reagentes, permitindo maior volume de análises, entre as quais se destacam as técnicas espectroscópicas no infravermelho próximo (MIR) e médio (NIR) (PAX et al., 2019; LEITE et al., 2019).

Essas técnicas tem sido bastante exploradas devido à possibilidade de extrair informações baseadas na composição química do queijo. Movimentos rotacionais e vibracionais das ligações dos grupos funcionais que fazem parte da estrutura dos constituintes do queijo geram espectros específicos que possibilitam a obtenção de respostas precisas na discriminação de amostras, principalmente quando associadas às análises quimiométricas (PASQUINI 2018; KAMAL e KAROUI, 2015).

Dados analíticos combinados com a quimiometria possibilitam a redução da dimensionalidade e a extração das informações essenciais do conjunto de dados originais, além de serem desenvolvidos métodos e modelos matemáticos com boas performances, que permitem classificações e diferenciações de objetos de estudo de maneira rápida, podendo ser utilizado para a verificação da origem dos queijos em termos de procedência geográfica (ESTEKI et al., 2018; KAROUI, 2017).

Neste contexto, propor um estudo voltado para a discriminação de queijos Coalho produzidos na Bahia por meio de métodos eficientes e rápidos como o MIR e NIR e também por meio de avaliação proteômica pode ser uma alternativa interessante, do ponto de vista sócio-econômico e científico, por promover o desenvolvimento regional do produto e também por demonstrar uma possibilidade de diferenciar a origem geográfica dos queijos, contribuindo para a garantia da sua autenticidade.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Queijo coalho

O queijo é um dos alimentos mais antigos produzidos e consumidos no mundo devido ao seu sabor peculiar, aspectos culturais e históricos enraizados, além de ser importante para a alimentação humana, em razão do alto teor de proteínas, lipídios, vitamina A e sais minerais, como cálcio e fósforo (VÁSQUEZ et al., 2018). Existem mais de 1000 variedades de queijos produzidos no mundo (MCSWEENEY et al., 2004) e o queijo Coalho é um dos queijos mais populares e tradicionais do Brasil, oriundo da região Nordeste.

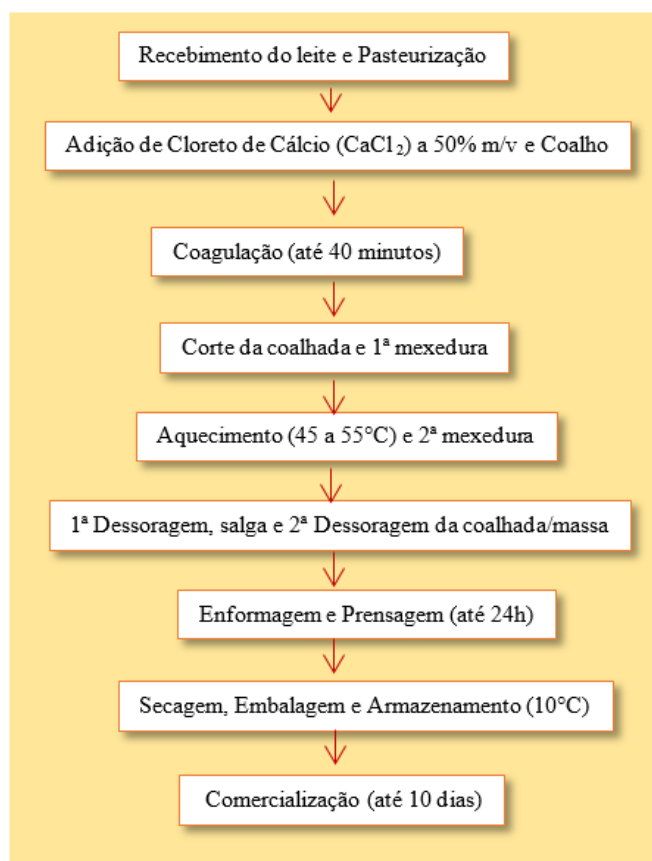
A produção de queijo no Brasil, teve início com a colonização portuguesa e o queijo Coalho surgiu no Nordeste há mais de 150 anos, com a chegada do gado bovino trazido pelos Portugueses como uma forma de viabilizar e comercializar o leite produzido nas fazendas. Atualmente, este tipo de queijo possui um valor inestimável quanto aos aspectos sócio-econômicos da região, por fomentar a atividade econômica e representar parte da renda de pequenos e médios produtores (BEZERRA et al., 2016).

Os queijos Coalho são queijos semi-duros, produzidos com leite bovino integral pasteurizado, de massa cozida, que não passam por processo de maturação e são coagulados enzimaticamente com coalho (quimosina). É um queijo bastante apreciado nas formas *in natura*, assado, frito ou como componente de diversos pratos, podendo ser encontrado como espetinhos, em pequenos pedaços ou barras, consumido no café da manhã, como tira-gosto ou como ingrediente de preparações tipicamente nordestinas, como o baião-de-dois, tapioca, cuscuz ou canjica (BRASIL, 2001; MAMEDE et al., 2010).

A produção do queijo no Brasil ocorre conforme determinado pela legislação vigente, a qual é abrangente e permite uma diversidade de produtos com características distintas. O processamento inicia após o recebimento e pasteurização do leite, a massa é coagulada em até 40 minutos, podendo ser crua, cozida ou semicozida sob 45°C-55°C, sendo que o aquecimento ocorre sob mexedura lenta e rápida até se obter o ponto da massa. A coalhada é submetida à salga, secagem, prensagem, seguida de embalagem e para este tipo de queijo, não maturado, embora seja permitido pela legislação, não há adição de culturas *starter* e o armazenamento ocorre entre 6°C-10°C, comercializado com até 10 dias após a fabricação. A prensagem da massa pode ocorrer por meio de prensa manual ou automática, mas em sua maioria, se utiliza a prensa automática, em que o processo ocorre em até 30 min, sob refrigeração (BRASIL, 2001) (Figura 1).

A origem do nome Coalho deriva do processo de manufatura do queijo que, tradicionalmente, ocorria a partir da ação do coalho de origem animal, extraído do estômago de pequenos animais como cabrito, bezerro e preá e, atualmente, esta prática vem sendo substituída pelo uso de coalho de origem microbiana (FONTENELE et al., 2017).

Figura 1. Fluxograma de produção de queijo Coalho



Fonte: Brasil (2001)

No Nordeste, o queijo Coalho está entre os principais tipos de queijos comprovadamente incorporados à cultura regional e diferentes estados nordestinos, como Pernambuco, Ceará, Rio Grande do Norte e Paraíba são potenciais produtores do derivado lácteo. Nestas regiões, diversos estudos já foram desenvolvidos na tentativa de caracterizar os queijos de acordo com parâmetros de composição, físico-químicos, texturais, sensoriais e proteômicos, sendo observado que tais propriedades podem variar de acordo com o local de onde é produzido (QUEIROGA et al., 2013; SOUZA et al., 2014; DIAS et al., 2019).

Nos últimos anos, o queijo Coalho tem se difundido em todo país, desempenhando um importante papel no desenvolvimento da agricultura e geração de emprego local e o Estado da Bahia tem se destacado em produção e consumo do produto. Estima-se que mais de 80 mil toneladas/ano de queijo sejam produzidas no Estado, incluindo o Coalho (IBGE, 2019), além disso, a Bahia possui uma das bacias leiteiras mais importantes do Nordeste, o maior rebanho de vacas ordenhadas do Brasil e a maior produção regional de leite, com 22,8% em relação aos outros estados, contribuindo significativamente para a expansão da produção de queijos Coalho no Estado (MAPA, 2017).

2.2. Propriedades químicas, físico-químicas e tecnológicas do queijo Coalho

O queijo Coalho por ser um produto fabricado em diferentes regiões do Nordeste pode ter sua composição química variável. Jesus et al. (2019) afirma que a composição de queijos pode variar de acordo com a região onde foi produzido, a matéria-prima utilizada e o processamento em que é submetido. Portanto, as características de cada região produtora do queijo (clima, solo, genética do gado e técnicas de produção dos queijos) podem influenciar diretamente nos parâmetros do produto final.

O queijo coalho é classificado e especificado de acordo com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo Coalho (BRASIL, 2001), sendo um produto de consistência semidura, elástica, textura compacta e macia, cor branco amarelada uniforme, sabor brando, levemente ácido e não apresentam derretimento quando submetido a altas temperaturas. É classificado entre semi-gordo a gordo, com teor de gordura no Extrato Seco (GES) entre 35% e 60% e com umidade entre média e alta (36 a 54,9%).

Santos et al. (2011) e Souza et al. (2014) avaliaram a composição química de queijos Coalho de estados nordestinos (Sergipe, Ceará, Piauí, Rio Grande do Norte, Paraíba e Pernambuco) e obtiveram para umidade resultados variando entre 29,38% a 62,3%, apresentando diferenças significativas de acordo com a região. Na Paraíba, o teor de GES diferiu significativamente dos demais estados e variou entre 41,72 a 47,63% (média e alta umidade). Em Alagoas, foram observados queijos com média umidade, com 45,5 a 51,5% e com GES até 48,16% (SILVA et al., 2010). Na Bahia, Fontan (2013) encontrou queijos com média e alta umidade e GES entre 42,82-48,65%.

A umidade e gordura dos queijos Coalho podem ser influenciados pelo processamento, sendo que a umidade interfere na atividade de água (a_w) e suas variações podem estar relacionadas à qualidade da matéria-prima e ao processamento, que envolve o manuseio da

massa, temperaturas de cozimento que afetam o processo de expulsão do soro da coalhada (sinerese) na etapa de cozimento, além do tempo de prensagem e a força aplicada para o processo, que podem provocar maior ou menor compactação da massa, formando queijos com diferentes teores de água. Durante o corte da coalhada, se esse procedimento for realizado de maneira brusca pode ocorrer o rompimento da estrutura da coalhada, liberando lipídeos, proteínas e outras substâncias a serem perdidas na dessoragem (FONTENELE et al., 2017).

A cor dos queijos está intimamente ligada à sua composição, principalmente ao teor de gordura, além disso é uma importante propriedade físico-química, uma vez que variações na cor do produto tem relação direta com a sua aceitabilidade. Nas medidas instrumentais da cor de materiais opacos, a reflexão da luz sobre o objeto é detectada em escala de três elementos $L^* a^* b^*$ (sistema Hunter Lab e CIELAB), onde o L^* indica a luminosidade e a capacidade do queijo em refletir a luz, (0 a 100), a^* varia do verde (de -60 a zero) ao vermelho (de 0 a + 60) e b^* varia do azul (de -60 a zero) ao amarelo (de zero a + 60) (MAMEDE et al., 2010).

Andrade (2006) avaliaram queijos Coalho produzidos no Ceará e encontraram queijos com coloração branca, levemente amarelados, com valores de L^* até 91,16 e valor de b^* positivo, representando a intensidade de cor amarela. O b^* tem relação direta com o teor de gordura, uma vez que o β -caroteno, pigmentação responsável pela cor, é lipofílico e tem afinidade com as micelas de gordura. Pode-se inferir que os queijos com alto teor de gordura apresentam uma cor mais amarela (QUEIROGA et al., 2013).

Embora não sejam regulamentados pela legislação, variações em relação ao teor de proteína, valores de pH, acidez e cinzas também foram observadas em queijos Coalho. Freitas Filho et al. (2012) avaliaram queijos de Pernambuco e obtiveram valores de pH entre 5,2 e 6,5, propriedade físico-química que também pode interferir nas características finais do queijo.

O pH é um fator decisivo na qualidade do queijo Coalho, podendo variar entre 5,6 e 6,5 (SOUZA et al., 2014; FONTENELE et al., 2017), variação que pode interferir em suas propriedades funcionais como derretimento e textura, considerando que as características principais do queijo Coalho são as bordas bem definidas e o não derretimento. Queijos com valores de pH mais baixos, ácidos, próximo ao ponto isoelétrico das caseínas (4,7), podem ter menor dureza/ firmeza e mastigabilidade e maior coesividade devido à maior interação entre as proteínas, e queijos com pH mais alto podem ter textura mais endurecida (MACHADO et al., 2011).

Como observado, as propriedades tecnológicas dos queijos Coalho, como a textura e o derretimento, podem ter relação com as suas características físico-químicas e afetarem as

propriedades tecnológicas do produto acabado. Uma das formas de avaliar a estrutura dos queijos é por meio da Análise do Perfil de Textura (APT). A textura é definida como o conjunto de propriedades reológicas e estruturais de um alimento, perceptíveis pelos receptores mecânicos, táteis e eventualmente pelos receptores visuais e auditivos. No teste de APT ocorre a simulação da mordida pela ação de compressão e corte dos alimentos através dos dentes durante a mastigação, consistindo em aplicações sucessivas de forças (deformantes) ao corpo de prova (BOURNE, 2002).

Durante a simulação da compressão de uma mordida, se observa a representação da movimentação da boca por duas vezes e o equipamento de análise, equipado com uma “probe” (para aplicação da força), uma fonte de movimento e um registrador, proporciona o estudo das propriedades mecânicas por meio da deformação produzida após submeter o alimento a uma determinada força (SILVA, 2013).

Para a APT do queijo Coalho, Fogaça (2014) apontou que é importante avaliar os parâmetros de dureza/firmeza (N), coesividade, elasticidade (nm) e mastigabilidade (J), sendo que a dureza é a força necessária para produzir certa deformação, a coesividade é a quantidade de energia necessária para romper as ligações internas das amostras; a elasticidade é determinada como a capacidade do material deformado voltar à condição não deformada depois que força de compressão for removida; enquanto que a mastigabilidade corresponde à força para desintegrar o alimento sólido até a deglutição

Queiroga et al. (2013) avaliaram a composição e aplicaram o APT em queijos Coalho do Ceará e observaram que queijos com maior umidade possuíam menor dureza, sendo justificado que a alta umidade levou ao enfraquecimento da malha proteica, tornando a matriz do queijo mais macia. Queijos com maior acidez apresentaram-se mais macios, com menor dureza, o que ocorreu pois a acidez causou alterações nos agregados de proteína afetando a textura, mas quando foram armazenados por 28 dias a 10°C, queijos com pH reduzidos não exibiram alterações na dureza, uma vez que a atividade metabólica a 10°C é limitada.

Em queijos não maturados como o Coalho, um dos fatores que mais contribuem para a textura final do produto é a sua composição. Baixo teor de gordura pode acarretar em maior interação entre as proteínas, promovendo uma matriz mais densa e, conseqüentemente, aumento na coesividade, mastigabilidade e dureza. Além disso, variações no teor de umidade também podem afetar a textura, já que um maior teor de umidade resulta na textura mais macia do queijo, além de também contribuir para o aumento do derretimento (FONTAN, 2013).

O derretimento consiste na capacidade das partículas do queijo fluírem e formar uma fase uniformemente derretida, que é direcionada inicialmente pela evaporação da água e fluidificação da gordura. No queijo Coalho esta é uma propriedade que se mantém intacta após o aquecimento (cerca de 100°C, até 7-10 minutos) (Brasil, 2001, Fogaça, 2014).

Segundo Machado et al. (2011), os fatores que interferem no derretimento são: a) teor de gordura presente no queijo, pois quanto maior, maior será o derretimento no momento do aquecimento; b) pH, pois quanto mais elevados, menor a desmineralização e menor derretimento devido à maior estruturação da malha protéica; c) proteólise da massa, sendo que queijos mais úmidos tendem a apresentar proteólise mais acelerada e, portanto, tendem a derreter mais. No caso de queijos Coalho, para a manutenção do não derretimento, o ideal é que o queijo esteja com o pH próximo a 5,8, pois em valores menores, o queijo apresentará elevado grau de desmineralização, provocando maior derretimento quando submetido ao calor.

Não foram encontrados estudos envolvendo o derretimento de queijos Coalho e a relação com a sua origem geográfica, mas estudos correlacionando o derretimento e o tempo de armazenamneto de queijo Coalho tem sido realizados. Fogaça (2014) ao avaliar queijos Coalho fabricados com diferentes tipos de ácido (acético, cítrico, láctico) observou que a capacidade de derretimento também não foi influenciada pela adição de ácidos, mas foi observado o aumento significativo no derretimento ao longo do tempo de armazenamento, sendo 21,41% em 28 dias. Machado et al (2011) ao armazenarem queijos Coalho entre 3 e 90 dias observaram que houve aumento do derretimento a partir do 8º dia e quanto maior a acidez maior foi o derretimento. Santos et al. (2011) ao avaliarem queijos Coalho, observaram que valores de pH mais altos não favoreceram o processo de derretimento.

Diferenças no processo de fabricação dos queijos Caolho podem levar a diferentes condições proteolíticas. Podem ser utilizados distintas enzimas coagulantes (coalho), associadas a variações quanto ao seu poder de coagulação, à sua natureza. Os queijos podem ser produzidos utilizando coalho de origem animal, vegetal ou microbiana e todos são caracterizados pela presença de proteases que atacam a fração da *k*-caseína, provocando a coagulação do leite (Dias et al., 2019). De acordo com Timón et al. (2019) enzimas de distintas naturezas se diferem em relação à sua especificidade e, conseqüentemente, em relação a proteólise primária da caseína, levando à obtenção de diferentes frações peptídicas.

Enzimas como a pepsina, além de romper a ligação 105-106 da *k*-caseína, continuam a degradar rapidamente o restante da cadeia de aminoácios durante a coagulação do leite, provocando maiores perdas de nitrogênio e gordura durante a produção e influenciando na

natureza dos peptídeos obtidos (Nielsen et al., 2018). Enzimas obtidas por cepa de origem microbiana, como a *Rhizomucor miehei* possuem atividade proteolítica mais específica e acentuada em relação aos de origem animal (Timón et al., 2014). O poder coagulante dos coalhos se referem à força que o coalho possui para coagular o leite até 40 minutos, sob temperatura controlada (45° a 55°C), podendo variar entre 50 a 2200 IMCU (*International Milk Clotting Units/mL*) e quanto maior, menor o tempo de coagulação.

O tipo de coalho utilizado, o seu poder coagulante, as condições de processamento (temperatura de cozimento e o tempo de prensagem) e o local de origem dos queijos tem relação com as suas características físico-químicas (umidade e atividade de água (a_w)), as quais podem afetar diretamente a atividade proteolítica e enzimática do queijo (Jesus et al., 2020).

2.3. Indicação geográfica e regiões produtoras de queijo Coalho

A discriminação de queijos tem grande importância, principalmente quando se refere a produtos de grande valor cultural e comercial. Estabelecer a identidade de origem de um produto é uma forma eficaz de agregar valor e credibilidade, concedendo-lhe um diferencial de mercado em função das características de seu local de origem e proporcionando o maior reconhecimento da região produtora ao valorizar os aspectos regionais do produto (SILVA et al., 2016).

As Indicações Geográficas (IG) são ferramentas coletivas de proteção e promoção comercial de produtos tradicionais vinculados a determinados territórios que devem agregar valor ao produto, proteger e promover a região produtora e sua herança histórico-cultural. Funcionam como protetoras contra falsificações e usurpações indevidas dos produtos, levando uma maior garantia para o consumidor e indicando que se trata de um produto especial e diferenciado. (DIAS et al., 2018).

A União Europeia tem reconhecido e apoiado a diferenciação dos produtos numa base regional, introduzindo uma estrutura integrada para a proteção da origem geográfica e das técnicas tradicionais de produção de diversos gêneros alimentícios, como os queijos, que correspondem às seguintes especificações: Denominação de Origem Protegida (DOP), Indicação Geográfica Protegida (IGP) e Especialidade Tradicional Garantida (ETG) (EU, 2011; MEDEIROS et al., 2016).

A DOP é atribuída a queijos produzidos com matéria prima e área geográfica específicas e possui o maior número de registros dentre os queijos produzidos no mundo, tais

como: Pecorino, Grana, Gouda, Parmigiano Reggiano, Gruyère, Camembert. A IGP também tem relação com a área geográfica, mas faz referência ao registro de apenas uma etapa de produção (Emmental, Blue Cheeses, Tomme de Savoie, Danablu) e a ETG compreende produtos com caráter tradicional, desenvolvidos utilizando matérias-primas ou métodos tradicionais, como por exemplo a Mussarela na Itália (EU, 2011; WOODCOCK et al., 2008).

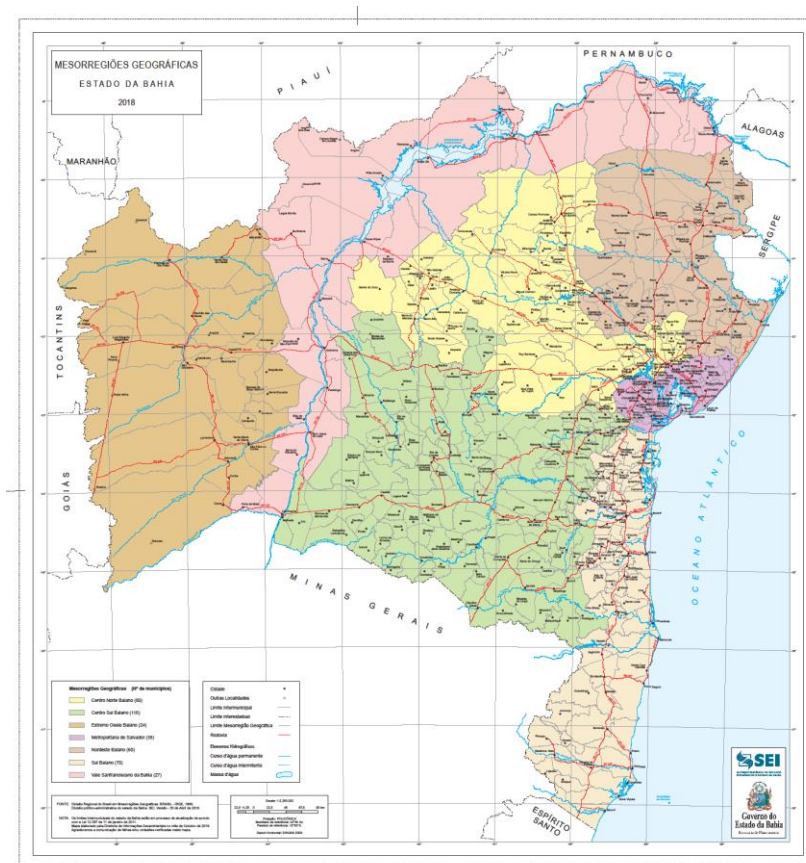
No Brasil, o Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) possui a competência para estabelecer as condições de registro e certificações de indicação de origem. O processo de certificação envolve a capacidade de um grupo de produtores, indústrias, entre outros, de provar que determinado produto pertence a uma região, dotada de topografia, clima, história e processo de produção imemorial (INPI, 2019).

As Indicações Geográficas são divididas em Indicação de Procedência (IP) e Denominação de Origem (DO). A IP se refere ao nome do local reconhecido por fabricar o produto, como o Queijo Serro, Canastra e Minas Artesanal. Valoriza a tradição produtiva e o reconhecimento público sobre a qualidade diferenciada do produto de uma determinada região, protegendo a relação entre o produto e sua reputação, em razão de sua origem geográfica específica. A DO designa que as características do território ou origem geográfica agregam um diferencial ao produto, a exemplo do Queijo Artesanal Serrano, considerando que uma determinada área desenvolva um produto e que as características sofram influência exclusiva ou essencialmente em razão das particularidades daquele lugar, incluindo fatores naturais e humanos, ou seja, as peculiaridades daquela região devem afetar o resultado final do produto, de forma identificável e mensurável (WILKINSON et al., 2017).

Nos últimos anos, pesquisadores e consumidores têm mostrado maior interesse em produtos regionais e tradicionais com certificações e este conceito envolve os fatores naturais, humanos e estão relacionados à área geográfica e aos elementos que podem ocasionar tais características (DIAS et al., 2018).

O Estado da Bahia é dividido em diferentes mesorregiões geográficas pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2019), que são áreas individualizadas em unidades da federação, que apresenta formas de organização no espaço geográfico conforme aspectos sociais, econômicos, culturais e em todo o Estado existem regiões produtoras de queijo Coalho (Figura 2).

Figura 2. Mesorregiões geográficas da Bahia.



Fonte: Superintendência de Estudos Econômicos e Sociais da Bahia. Governo do Estado da Bahia (2019)

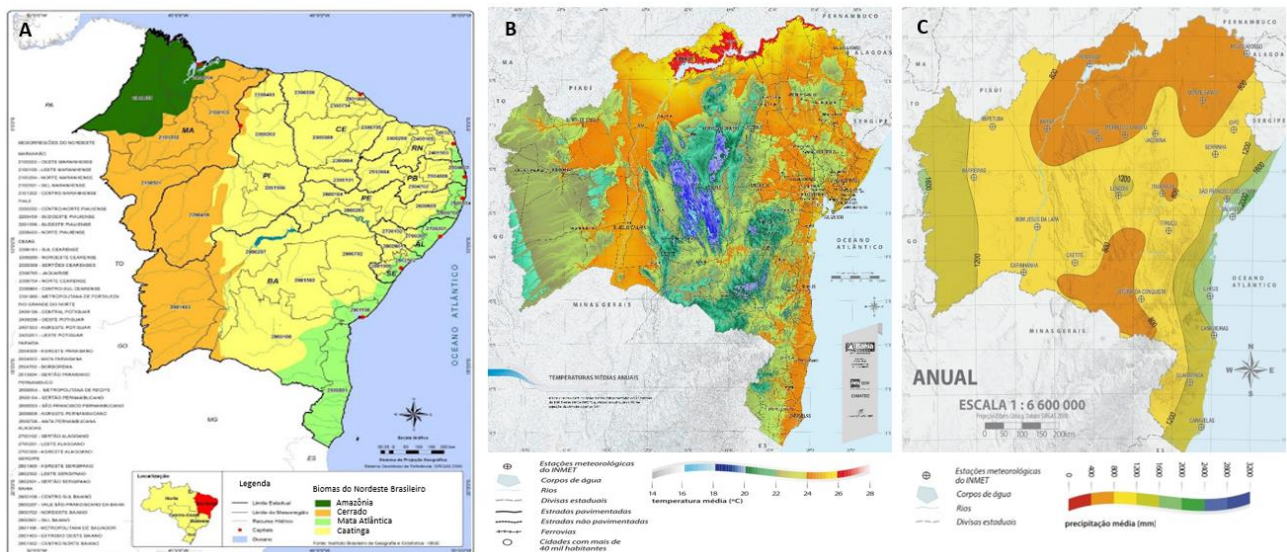
Embora existam dezenas de laticínios no Estado da Bahia com produção expressiva de queijos, as fábricas produtoras de queijo Coalho cadastradas na Agência de Defesa Agropecuária da Bahia (ADAB), órgão fiscalizador estadual, se localizam em quatro mesorregiões do Estado: Sul, Centro Sul, Nordeste e Extremo Oeste. Cada área e seus respectivos laticínios são representativos em termos de produção já que cada região produtora utiliza tanques de expansão para receber a matéria-prima e os queijos são produzidos com leite bovino originado de um conjunto de produtores regionais (ADAB, 2018; SINDILEITE, 2018).

A origem dos queijos Coalho pode ter a sua identidade relacionada com as condições edafoclimáticas estabelecidas pelo meio ambiente (DIAS et al., 2019). O clima, frequência de chuvas e o bioma exercem influência na flora botânica das pastagens ofertadas aos bovinos, afetando a composição do leite utilizado na produção do queijo assim como elementos naturais como a geologia, topografia e as técnicas de produção de queijos podem influenciar na composição da microbiota do leite e gerar modificações bioquímicas específicas no queijo. Além disso, o uso de ingredientes e processos específicos influenciados por questões culturais

e locais podem também atribuir um conjunto de características ao produto que se referem à essência territorial (KAROUI et al., 2005a; KAROUI et al., 2005b; KAROUI et al., 2006; KAROUI et al., 2007; JABRI et al., 2020).

Na Figura 3 são apresentados o bioma da região Nordeste do Brasil (Figura 3A) e os climas predominantes da Bahia, indicados pela frequência de chuvas (3B) e temperaturas alcançadas anualmente (3C), em que se observam as diferenças climáticas de cada mesorregião. Em toda a extensão territorial da Bahia, pode-se observar diferentes biomas como o de Mata Atlântica, Cerrado e Caatinga, além de variações no clima na maioria das mesorregiões da Bahia. A mesorregião Nordeste apresenta chuvas escassas e altas temperaturas, com bioma de Caatinga, enquanto que a mesorregião Sul faz parte da Zona da Mata Atlântica, com maior regularidade de chuvas, aspectos que podem gerar diferenças na composição dos queijos Coalho produzidos.

Figura 3. (A) Biomas do Nordeste Brasileiro (B) Temperaturas médias anuais do Estado da Bahia e (C) Precipitação de chuvas anuais do Estado da Bahia



Fonte: Embrapa (2014)

Nos últimos anos, diversos critérios foram importantes para identificar a origem de diferentes queijos e discriminá-los. A diferenciação quanto a origem geográfica, associada a investigações referentes à composição química, físico-química, parâmetros de cor, teor e perfil de ácidos graxos, perfil proteômico do queijo, entre outros, associados a oscilações climáticas ou sazonais foram realizadas (GONZÁLEZ-MARTÍN et al., 2011a; COZZI et al., 2009; LIMA et al., 2017; DANEZIS et al., 2020).

Aspectos referentes ao solo (KAROUI et al., 2005a), altitude (COZZI et al., 2009) e à alimentação animal (GONZÁLEZ-MARTÍN et al., 2011b; GUERRA et al., 2014) também foram considerados na discriminação de queijos, uma vez que a diversificação da composição botânica pode afetar a microbiota do leite e, conseqüentemente, as características do queijo. Além disso, o processo de produção, bem como o tratamento térmico aplicado ao leite também foram avaliados já que a presença de enzimas específicas sensíveis ao calor são capazes de discriminá-los (PICQUE et al., 2002; ALEWIJN et al. 2018).

Em países europeus, queijos tradicionais com IG, principalmente DOP's têm sido bastante estudados visando uma caracterização precisa para buscar um certificado de originalidade ou verificar a sua autenticidade, a exemplo dos queijos Parmigiano Reggiano (CEVOLI et al., 2013a; CEVOLI et al., 2013b), Pecorino (LERMA-GARCÍA et al., 2010), Idiazabel (CATTANEO et al., 2009), Gruyère e L'Etivaz (KAROUI et al., 2007), onde foram estudadas as características químicas, bioquímicas, sensoriais, reológicas e componentes voláteis.

Embora a proteção de queijos com IG esteja circunscrita principalmente em países Europeus (KAROUI et al., 2007, CEVOLI et al., 2013a) o surgimento no mercado brasileiro de produtos totalmente tipificados, poderá ter importância econômica, tecnológica e sociais e, em decorrência da popularidade, aceitabilidade e tradição do queijo Coalho na alimentação do Nordeste, este produto apresenta grande potencial para obtenção de IG, ocasionada pelas suas características, inclusive no Estado da Bahia (WILKINSON et al., 2017).

No Brasil, Indicações de Procedência já foram concedidas a vinhos e espumantes do Vale dos Vinhedos, café do Cerrado Mineiro e da Serra da Mantiqueira, carne bovina e derivados do Pampa Gaúcho, aguardentes (tipo cachaça e composta azulada) de Paraty e os queijos do Serro e da Canastra. As Denominações de Origem foram fornecidas ao arroz do Litoral Norte Gaúcho e camarão da Costa Negra. No Estado da Bahia, algumas IP já foram atribuídas a alimentos como café verde em grãos do Oeste da Bahia, amêndoas de cacau, produzidas no Sul da Bahia, aguardente de cana da região da Chapada Diamantina, uvas de mesa e manga do Vale do Submédio São Francisco (INPI, 2019).

Embora algumas IP's tenham sido atribuídas a produtos da Bahia, nenhuma concessão de DO foi registrada, processo que demanda que características da origem geográfica sejam atribuídas ao produto. Observa-se crescente o interesse e consumo de produtos lácteos regionais como os queijos Coalho, principalmente se houver o registro de Indicação Geográfica. Assim, é primordial o desenvolvimento de técnicas analíticas que permitam

discriminar queijos de cada região, agregar valor ao produto e contribuir com sua rastreabilidade assegurando a sua autenticidade (FONTENELE et al., 2017).

2.4. Caracterizações Analíticas

2.4.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa e avaliação proteômica em queijos

O estudo da autenticidade e certificação da origem de produtos lácteos nos últimos anos tem se baseado em diferentes abordagens analíticas. Dentre as mais aplicadas, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (*Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography-RP-HPLC*) é uma técnica que se destaca por ser bastante precisa na análise e separação de compostos específicos do leite e derivados para fins de identificação e diferenciação dos produtos, principalmente avaliando peptídeos (NIELSON et al., 2017).

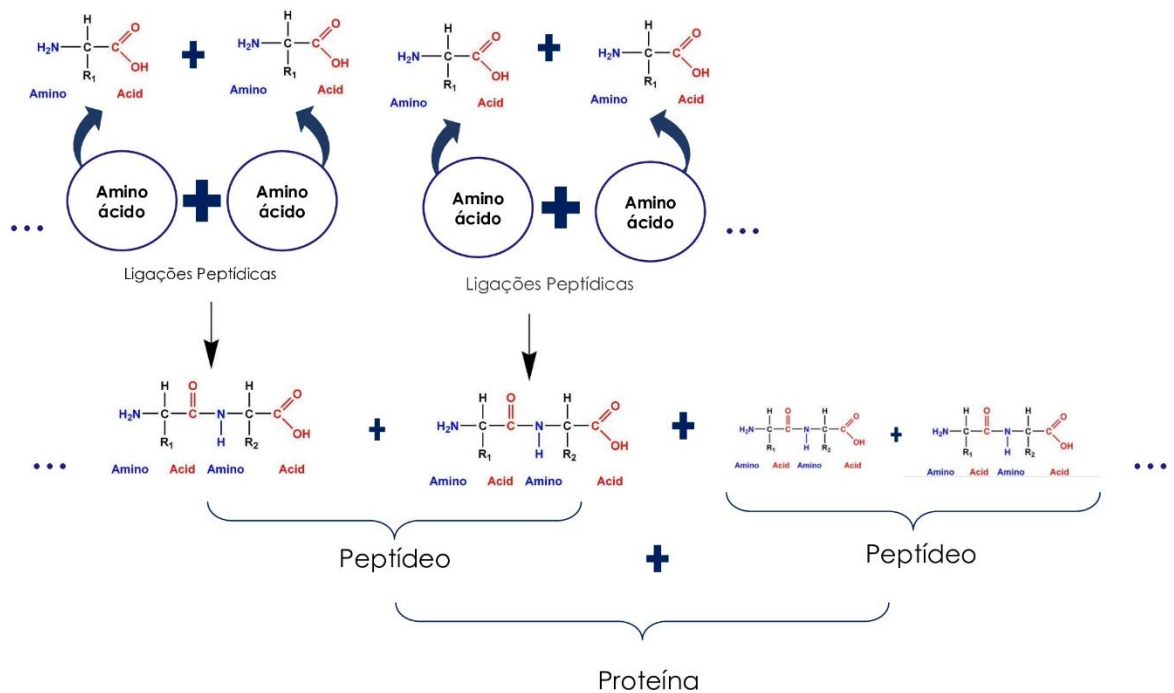
A RP-HPLC é definida como um método de separação de componentes de uma amostra por meio do processo de migração de solutos que ocorre em uma fase móvel líquida e os componentes presentes em determinada amostra são seletivamente retidos por uma fase estacionária. A depender das interações entre as fases e os solutos presentes na amostra ocorre a sua retenção com maior ou menor facilidade em diferentes locais da coluna, de acordo com a afinidade, sendo que, quanto maior for a interação com a fase móvel, menor será o tempo que o soluto levará para sair da coluna. Assim, ao se obter informações como a posição do pico ao longo do tempo de retenção e a altura ou área do pico da amostra investigada é possível avaliar os perfis dos constituintes por meio da análise dos cromatogramas (TIMON et al., 2018).

Esta técnica tem sido utilizada na avaliação de peptídeos presentes em queijos, utilizados como marcadores moleculares das características do produto, já que estes podem ser característicos de uma determinada região de onde é produzido, podendo a RP-HPLC ser utilizada para Indicações Geográficas ou diferenciação de queijos de acordo com sua origem (GONÇALVES et al., 2016, FONTENELE et al., 2017)

Peptídeos são compostos resultantes da união entre dois ou mais aminoácidos, por meio de ligação peptídica e a junção de diversos fragmentos de peptídeos formam as proteínas (Figura 4), sendo que estas frações peptídicas podem ser utilizadas para identificação e diferenciação de derivados lácteos. Em queijos, as proteínas e suas frações sofrem degradações, processo denominado de proteólise, que consiste na quebra de sua estrutura tridimensional e,

consequentemente, em mudanças conformacionais, dando origem a peptídeos de menor massa molecular e aminoácidos livres (DA SILVA, 2012).

Figura 4. Desenho esquemático relativo à estrutura de peptídeos e proteínas



Fonte: Lima et al. (2017)

As proteínas do leite são consideradas umas das mais importantes fontes de peptídeos, assim como os queijos. (TIMÓN et al., 2014). Além dos efeitos benéficos para o organismo após a ingestão, reações proteolíticas podem ocasionar a formação e/ou degradação de peptídeos que auxiliem na identificação de queijos com características próprias, não só como marcadores referentes a cada amostra, como também na caracterização da individualidade do produto, sendo que a identificação de peptídeos pode auxiliar na rastreabilidade de queijos (GONÇALVES et al., 2016)

RP-HPLC tem sido comumente aplicada para analisar características dos perfis peptídeos do queijo Coalho produzidos de diferentes locais do Nordeste por meio de estudos exploratórios, a fim de obter marcadores moleculares por região para auxiliar em indicações geográficas e/ou caracterizar os peptídeos, como ocorreu nos estudos de Silva et al. (2016), Fontenele et al. (2017) e Dias et al. (2019).

Silva et al. (2016) realizaram um estudo do perfil peptídico de queijos Coalho de seis cidades da região semi-árida do Pernambuco utilizando a RP-HPLC e os resultados mostraram que foram encontrados variedades de peptídeos oriundos de fragmentos da α -, β - e κ -caseínas, conhecidos pela literatura e 40 peptídeos não foram identificados mas foram considerados importantes para contribuir com a qualidade e características sensoriais do queijo Coalho e servirem como marcadores moleculares ou como uma impressão digital (*fingerprints*) para a caracterização e controle de qualidade deste queijo.

Fontenele et al. (2017) buscaram identificar peptídeos de queijos Coalho da região de Jaguaribe, Ceará, Brasil, como etapa para a Designação de Origem Protegida (DOP). Quando aplicada a RP-HPLC observou-se que o perfil peptídico dos queijos produzidos na região estudada se assemelharam, porém diferiram de queijos do Estado de Pernambuco. Com o sequenciamento dos peptídeos por espectrometria de massas foi possível identificar os peptídeos, que em sua maioria eram oriundos da β -caseína.

Embora tenha sido utilizada a RP-HPLC para esta finalidade, ainda são poucos os estudos que associam a técnica cromatográfica às análises quimiométricas que poderiam auxiliar na diferenciação de queijos. No estudo de Guerreiro et al. (2013) verificou a autenticidade de 13 queijos portugueses com DOP utilizando RP-HPLC e Análise de Componentes Principais (ACP). Para a pesquisa, 12 picos do perfil peptídico dos queijos foram comparados com padrões de caseína dos leites utilizados para a produção de cada queijo e por meio do ACP foi possível identificar as similaridades entre as frações peptídicas dos leites e queijos, permitindo a identificação da origem dos queijos.

Assim, mostra-se que RP-HPLC é uma técnica de separação de compostos muito utilizada em queijos, e isso se deve, entre outros fatores, à sua boa sensibilidade, fácil adaptação e grande aplicabilidade. Esta técnica é considerada altamente discriminante e importante para avaliação da autenticidade e qualidade de queijos (KOKAK et al., 2020).

2.4.2. Técnicas Espectroscópicas no Infravermelho: NIR e MIR

Diversas metodologias tem sido aplicadas para discriminação de queijos em relação a sua origem, a exemplo da eletroforese, cromatografia e espectrometria de massa, no entanto, são métodos trabalhosos, de custo elevado e, apesar de sensíveis são inviáveis quando o fluxo de trabalho é rápido e a mão-de-obra é reduzida (ESTEKI et al., 2018). A espectroscopia no infravermelho representa uma boa alternativa para esta investigação por ser uma técnica rápida, não destrutiva, que não necessita de pré-preparo da amostra e não demanda o uso de

reagentes, proporcionando análise de múltiplos componentes com economia de tempo e de custo, além da versatilidade dos equipamentos e obtenção da impressão digital, sendo uma valiosa ferramenta de triagem ou estudo preliminar (PASQUINI, 2018).

A espectroscopia estuda a interação da radiação eletromagnética com a matéria que ocasionam movimentos vibracionais e rotacionais pela absorção de energia dos compostos químicos. Os grupos funcionais das moléculas tem frequência vibracional única e o conjunto destes grupos resulta em uma impressão digital que pode ser aplicada para confirmar a identidade de queijos (LOHUMI et al., 2015).

Os espectros de absorção, emissão e reflexão no infravermelho (IR) de espécies moleculares se originam de variações de energia produzidas por transições moleculares de um estado de energia vibracional ou rotacional para outro. A frequência da radiação absorvida corresponde à frequência da vibração molecular responsável pela absorção, que é limitada principalmente às espécies moleculares que possuem pequenas diferenças de energia (KAROUI et al., 2017).

Para uma molécula absorver radiação IR ocorre uma variação no momento dipolo durante seu movimento rotacional-vibracional, causando variações nas posições e amplitude dos movimentos dos átomos, que não são fixos e oscilam continuamente. As vibrações podem ser classificadas nas categorias de estiramento e deformação, em que uma vibração de estiramento envolve uma variação contínua na distância interatômica ao longo do eixo de ligação entre dois átomos e as vibrações de deformação são caracterizadas pela variação no ângulo entre duas ligações (KAMAL e KAROUI, 2015).

Na região do IR, maior destaque tem sido dado às técnicas espectroscópicas no Infravermelho Próximo (NIR) e Médio (MIR), as quais, associadas com a quimiometria, tem sido utilizadas com sucesso para a autenticação de queijos, por meio de análises qualitativas e quantitativas (RODRIGUEZ-SOANA et al., 2011; KAMAL e KAROUI et al., 2015; MEDINA et al., 2019).

As informações estruturais fornecidas pelos espectros do NIR são decorrentes da transição de dois ou mais níveis de energia (sobretons) devido à anarmonicidade das vibrações fundamentais. As bandas apresentam-se mais largas, menos intensas e mais sobrepostas que na região MIR, e se relacionam com combinações e ressonâncias de ligações do H com O, N e C (C-H, N-H e O-H) (Tabela 1).

Tabela 1. Bandas e associações de grupos funcionais nas regiões NIR e MIR em queijos.

NIR (780 – 2500 nm)		
Comprimento de onda (nm)	Associação	Referência
982, 1456, 1940	O–H, água	Alinovi et al.(2019); Cevoli et al.(2013a)
926, 1208-1214, 1390, 1728, 1762, 1878–1886, 2070, 2308, 2234-2348	C–H /C=O, gordura	Lenart et al. (2012); Andueza et al. (2013); Holroyd et al. (2013)
1480–1550, 1502, 1584, 1620–1700, 2056, 2174	N–H, proteína	Lenart et al. (2012); Holroyd et al. (2013); Alinovi et al. (2019)

MIR (4000-400 cm⁻¹)		
Número de onda (cm ⁻¹)	Associação	Referência
3700-3000	O-H, água	Lerma-Garcia et al. (2010); Leite et al. (2019)
2922,2852, 1460-1400, 951,64-721	C-H, gordura	Cuibus et al. (2014); Andrade et al. (2018); Leite et al. (2019)
2200, 2924-1750, 1147-1000, 951,64 - 721	C=O, gordura	Andrade et al. (2018); Rodriguez-Soana et al. (2006)
1647-1550, 1700-1490	C=O/C-N/N-H, amidas I e II	Andrade et al. (2018); Jesus et al. (2020)
1377 -1321, 1490–950	C-O/C-OH/ C-H, carboidratos	Martin-del-campo et al. (2007); Andrade et al. (2018)

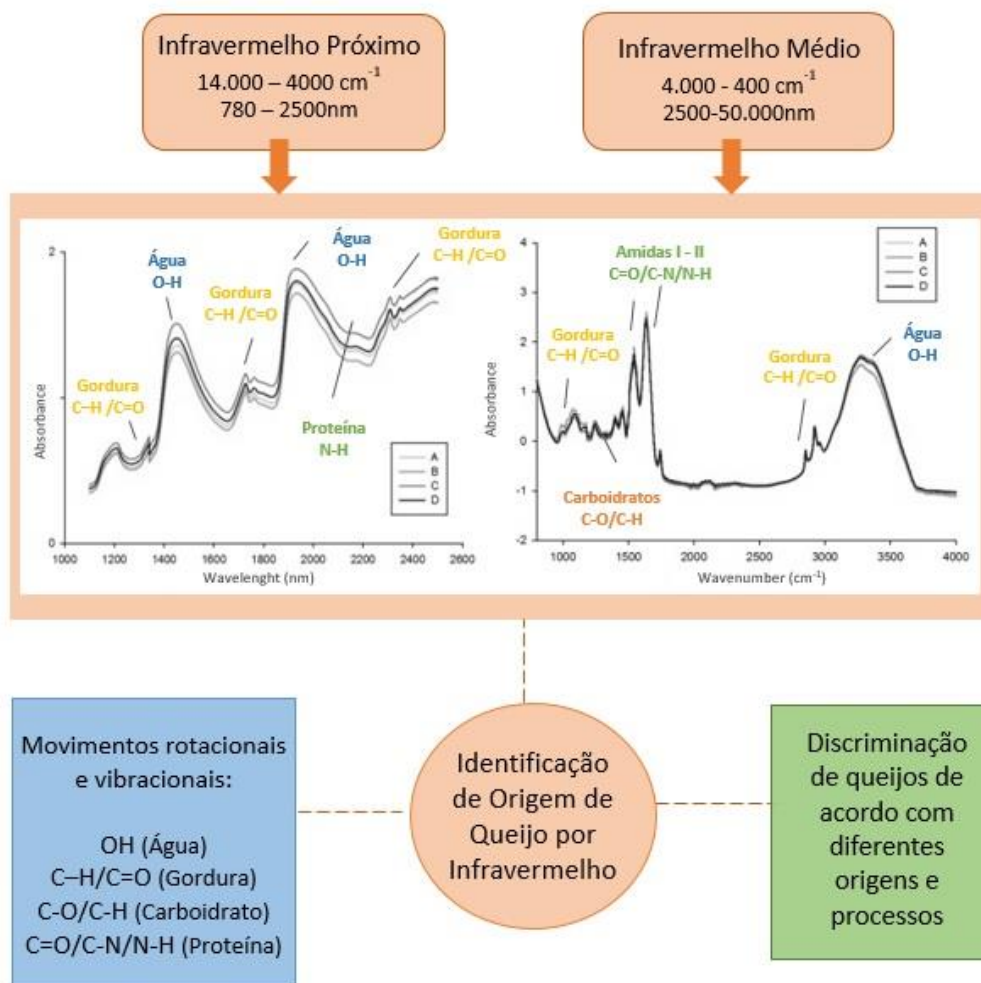
Os espectros do MIR ocorrem pelas vibrações moleculares fundamentais rotacionais-vibracionais e possuem bandas mais intensas, relativas ao O-H, C-H, C=O, C-N, N-H. A introdução da técnica de Infravermelho com Transformada de Fourier-Reflectância Total Atenuada (FTIR-ATR) tem favorecido o uso do infravermelho para análises de queijos, principalmente na região MIR, por permitir análises ainda mais rápidas, devido à leitura ser realizada na porção mais superficial da amostra e às análises ocorrerem simultaneamente através do interferômetro (RODRIGUEZ-SAONA et al., 2006; MARTÍN-DEL-CAMPO et al., 2007a; LEI et al., 2019).

Os interferômetros são constituídos de um divisor de feixes, um espelho fixo e um espelho móvel. A radiação incidente é dividida entre os dois espelhos e se recombinam, levando a uma diferença entre os caminhos ópticos que passam pelo interferômetro. O feixe resultante entra em contato com a amostra, onde ocorrem as absorções, transmissões e/ou reflexões, gerando o interferograma. Ao se aplicar a Transformada de Fourier ocorre a conversão dos dados do interferograma em um gráfico que representa a quantidade de radiação detectada em função da frequência da radiação (número de onda), chamado de espectro, sendo possível a realização de análises mais rápidas (CEVOLI et al., 2013a).

A discriminação da origem de queijos por meio do MIR ou NIR tem se baseado na análise do comportamento espectral ou de bandas específicas, uma vez que estas refletem as

variações ocorridas nos aspectos físico-químicos, texturais ou de composição (GORI et al., 2012). As bandas originadas pela vibração e rotação dos grupos funcionais relativos à água (umidade ou atividade de água) e à gordura tem sido utilizadas para indicar diferenças quanto ao tipo de processamento e ao leite utilizado, assim como das proteínas/amidas que permitem a detecção de peptídeos específicos de uma região podendo ocorrer variações na absorção destas bandas (Figura 5) (KAROUI et al., 2005b; SARA et al., 2018).

Figura 5. Espectros característicos de queijo nas regiões do infravermelho próximo e médio e a discriminação da origem.



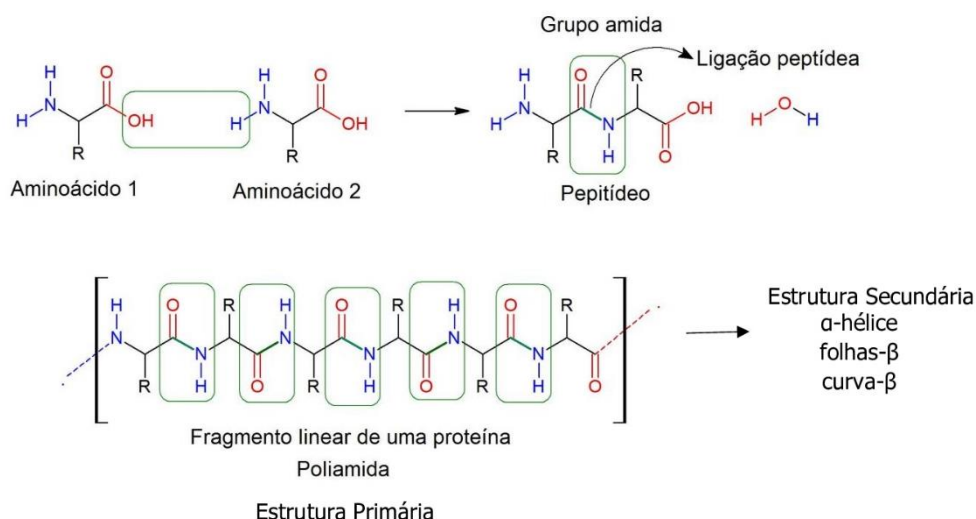
Fonte: Bergamachi et al. (2019)

A verificação da autenticidade de queijos por meio da análise de adulterantes e verificação dos estágios de maturação também já foram realizados anteriormente por meio destas técnicas. Adição ou substituição de componentes proibidos pela legislação que podem levar a variações do perfil lipídico, protéico, de carboidrato (lactose) ou alterações na umidade do queijo, podem ser verificadas por meio das bandas relativas à água, gordura,

proteínas/amidas e carboidratos (SOTO-BARAJAS et al., 2013; LEITE et al., 2019; VISCONTI et al., 2020). Enquanto que as características físico-químicas e texturais do queijo determinadas por diferentes estágios de maturação podem ser analisadas pelas bandas referentes à gordura (triacilglicerídeos e ligação ésteres), carboidratos (lactose), umidade (hidroxilas) e proteínas (amidas) para a identificação de peptídeos, próprios do processo de proteólise (ALINOVI et al., 2019; JESUS et al., 2020; ANDRADE et al., 2018).

A hidrólise das caseínas e formação dos peptídeos dos queijos podem gerar efeitos difentes na rotação e vibração dos grupos funcionais das amidas dos peptídeos, detectáveis por meio da absorção no IR e, segundo Glassford et al. (2013) e Wang et al. (2011), as amidas no espectro do IR também são sensíveis a mudanças na conformação das estruturas secundárias como α -hélice, folhas β (Figura 6).

Figura 6. Desenho esquemático sobre os grupos amidas dos peptídeos e estrutura secundária das proteínas.



Fonte: Glassford et al. (2013)

A aplicação do IR para avaliação das proteínas já foi realizada em queijos suíços (RODRIGUEZ-SOANA et al., 2006; KOCA et al., 2007), Mussarela (SARA et al., 2018), Gouda, Pecorino (ANDRADE et al., 2018), Cheddar (WANG et al., 2011), Cantal (LOUDIYI et al., 2018) para avaliação da autenticidade e verificação do estágio e tempo de maturação de queijos, contudo são escassos os estudos que utilizam peptídeos solúveis extraídos de queijos para a sua discriminação e classificação de acordo com a sua origem.

O MIR e NIR associados com a quimiometria já foram aplicados anteriormente em produtos lácteos como leite fluido, leite em pó, manteiga e soro de queijo para a predição da composição química/físico-química (MELFSEN et al., 2012), quantificação de adulterantes e reconstituintes (WU et al., 2008; Botelho et al., 2015; ANDRADE et al., 2019; CONCEIÇÃO et al., 2019) e identificação da mistura de leite de espécies diferentes (SILVA et al., 2020), assim a aplicação de ambas as técnicas para a discriminação e identificação de origem de queijos tem ganhado destaque (OTTAVIAN et al., 2012; GONZÁLEZ-MARTÍN et al., 2014; BERGAMASCH et al., 2020) e para conhecer os principais estudos utilizando esta abordagem, faz-se necessário o entendimento sobre a quimiometria e as principais análises multivariadas.

2.5. Quimiometria e discriminação de queijos por origem

Os dados espectrais obtidos na análise por infravermelho possuem inúmeras variáveis, com diversas informações de origem química e física, complexas, altamente correlacionadas (multicolinearidade), distribuídas ao longo de todo o espectro (LEI et al., 2019). A aplicação e o sucesso dos métodos envolvendo a espectroscopia de infravermelho depende diretamente da aplicação de técnicas multivariadas adequadas, sem as quais a espectroscopia por infravermelho teria aplicação limitada. Com a análise multivariada é possível promover a redução da dimensionalidade e a extração das informações essenciais do conjunto de dados. Isso permite a utilização da espectroscopia do infravermelho na autenticidade e na identificação da origem dos queijos em termos de procedência geográfica, do processo de fabricação, determinação de parâmetros de qualidade, dados de composição e informações declaradas de maneira não autêntica no rótulo dos queijos (KAMAL e KAROUI et al., 2015; ABBAS et al., 2018; MEDINA et al., 2019).

A análise do IR associada a quimiometria envolve etapas essenciais como: (a) preparo da amostra, mesmo que seja mínimo; (b) obtenção e (c) tratamento dos espectros e (d) análise multivariada (LOHUMI et al., 2015; ESTEKI et al., 2018; PASQUINI, 2018).

Para a maioria das pesquisas o preparo da amostra de queijo é mínimo e o que normalmente ocorre é a redução do seu tamanho por meio da moagem (VISCONTI et al., 2020; LOUDIYI et al., 2018). A obtenção e tratamento dos espectros, em alguns casos, ocorre com os espectros brutos ou é realizado o seu pré-processamento com a aplicação de tratamentos de suavização da linha de base ou correção dos parâmetros de luz, como *Multiplicative Scatter Correction* (MSC), *Standard Normal Variate* (SNV), primeira e

segunda derivada para a remoção dos desvios de linha base não lineares ocasionados pelo espalhamento multiplicativo da luz (CEVOLI et al., 2013a; GONZÁLEZ-MARTÍN et al., 2014; ANDRADE et al., 2018).

A aplicação da análise multivariada pode ocorrer por meio do uso de métodos qualitativos, de classificação e reconhecimento de padrões, e de métodos quantitativos, de regressão. Os métodos qualitativos podem ser aplicados por meio do método de aprendizado supervisionado ou não supervisionado. Os não supervisionados agrupam o conjunto de dados sem a definição anterior de categorias específicas ou padrões, como a Análise de Componentes Principais (ACP), enquanto que, os métodos supervisionados (Análise Linear Discriminante - ALD) possuem uma etapa de treinamento/calibração, baseada na atribuição prévia de classes, a fim de construir modelos matemáticos que serão usados para prever objetos desconhecidos e alocá-los em grupos mais prováveis de pertencer, por meio de correlações entre as classes, que são mutuamente independentes (ESTEKI et al., 2018).

Para a organização dos conjuntos de dados (treinamento e validação) e seleção de variáveis podem ser aplicados o método aleatório ou o algoritmo *Kennard-Stone* que garante que as amostras mais representativas sejam selecionadas, através de uma varredura uniforme dos dados espectrais (BOTELHO et al., 2013).

As pesquisas que envolvem a identidade de origem de queijos, em sua maioria, iniciam com a análise exploratória dos dados não supervisionados (ACP) e seguem com etapas de aprendizado supervisionado (LDA), quando o objetivo principal abrange a caracterização do produto e diferenciação entre eles (PILLONEL et al., 2007; GONZÁLEZ-MARTÍN et al., 2011a; CEVOLI et al., 2013a), ou também, podem ser conduzidas diretamente pela aplicação de métodos lineares ou não lineares para a classificação de compostos, como as Redes Neurais Artificiais (RNA) (GUERRA et al., 2014; SANCHEZ et al., 2018a; BERGAMASCHI et al., 2020).

2.5.1. Análise de Componentes Principais (ACP)

A ACP é uma das ferramentas mais importantes na quimiometria, pois se configura como a base do reconhecimento de padrões, classificação e calibração multivariada. É utilizada com o objetivo de reduzir a dimensionalidade do conjunto de dados, visualizar a sua estrutura por meio do desenvolvimento de modelos gráficos, classificar as amostras de interesse em diferentes grupos de acordo com a similaridade e/ou diferenças das características avaliadas (MINGOTI, 2007).

Fundamenta-se essencialmente na redução da complexidade dos dados originais por meio da sua transformação em um menor conjunto de dados. Ocorrem combinações lineares do conjunto original de variáveis, que na maioria dos casos, possuem grandes matrizes de dados (como os espectroscópicos, por exemplo) gerando outras matrizes menores (de variância e covariância ou correlação) com dados ortogonais, não correlacionadas capazes de diferenciar amostras de interesse (FERREIRA, 2011; KAMAL e KAROUI, 2015).

Inicialmente, ocorre a transformação da matriz de dados originais em uma matriz de correlação, seguida da obtenção dos autovalores e seus respectivos autovetores normalizados e são obtidos os componentes principais. Cada CP gerado contém uma quantidade máxima de variação em relação aos dados originais e não apresentam correlação entre si, ou seja, as informações totais dos dados originais estão contidas nos componentes principais gerados e cada componente retém, em ordem decrescente, uma porcentagem da variância original (PACHECO et al., 2013).

Além de seu uso como um método de agrupamento de dados, a ACP permite a realização de uma análise rigorosa das variáveis avaliadas, agrupando-as e detectando aquelas que pouco contribuem para o entendimento sistêmico dos dados e aquelas com maior importância do ponto de vista estatístico, que possuem maior peso (*loadings*) na combinação linear dos primeiros CP, sendo possível utilizar um menor número de variáveis, com menor perda possível de informações (MINGOTI, 2007).

A ACP foi utilizada nos estudos de Cevoli et al. (2013a), Andrade et al. (2018), Leite et al. (2019), Alinovi et al. (2019) e Pax et al. (2019) com o objetivo de avaliar a identificação, separação e/ou diferenciação de queijos submetidos a análises de MIR ou NIR de diferentes variedades, de origens distintas e/ou para verificar a sua autenticidade e obtiveram sucesso na diferenciação, sendo observada a formação de grupos no espaço bi e tri dimensionais.

Karaziack (2016) avaliou o comportamento espectral no Infravermelho próximo (NIR) dos queijos Cheddar, Mussarela, Prato, Requeijão e queijo Coalho associado a análise dos componentes químicos, físico-químicos e às propriedades tecnológicas associadas ao ACP no intuito de verificar a diferenciação destas variedades de queijo sendo possível visualizar as diferenças espectrais entre eles ao se localizarem em quadrantes distintos no gráfico.

2.5.2. Análise Linear Discriminante (ALD)

A ALD é um dos métodos supervisionados mais utilizados para análises e autenticação de alimentos, envolvendo a caracterização, detecção de adulteração e identificação de origem (GONZÁLEZ-MARTÍN et al., 2011a; GORI et al., 2012; BERGAMASCH et al., 2020). É uma técnica estatística de classificação de amostras que tem por objetivo permitir a sua discriminação de dois ou mais grupos pré-definidos (JIN e AN, 2011).

A ALD é dividida em etapa de treinamento e validação, em que no treinamento se atribuem os objetos a grupos conhecidos, a fim de construir modelos matemáticos de classificação por meio de correlações entre as classes que serão subsequentemente utilizados para prever objetos desconhecidos e alocá-los no grupo que tem maior probabilidade de pertencer, na etapa de validação, sendo etapas mutuamente independentes (ESTEKI et al., 2018).

Ocorre a identificação de características similares das amostras e alocação em seus determinados grupos por meio da obtenção de uma função linear discriminante que estabelece relações entre uma variável dependente e variáveis independentes, e também pela criação de índices que permitem classificar novas amostras nos grupos previamente definidos, identificando grupos similares e classificando novos casos, onde a inserção é feita no grupo em que o caso tem maior probabilidade de pertencer, com base nas características do novo grupo (MINGOTI, 2007).

Esta análise multivariada se caracteriza por formar uma combinação linear das variáveis originais, com separação máxima das populações estudadas, sendo capaz de maximizar a razão entre as somas dos quadrados entre grupos e a soma de quadrados dentro dos grupos (DAS e NENADIC, 2008). Um dos métodos utilizados na aplicação da ALD é a validação cruzada ou *cross-validation* que é capaz de aleatorizar os dados no próprio processo de análise e tem por objetivo localizar o erro médio de validação estimado para o modelo treinado e a cada subconjunto de treinamento, um novo modelo é treinado e validado, sendo medida a capacidade preditiva do modelo pelo cálculo das estimativas de erro de validação. Geralmente é utilizado para se obter melhores valores da estimativa da precisão e produzir um desempenho de generalização satisfatório e com confiabilidade (HAIR JR. et al., 2010; PESTANA e GAGEIRO, 2014).

Os estudos de Pillonel et al. (2003), Lerma-García et al. (2010) e Bergamash et al. (2020) utilizaram a espectroscopia associada à ALD para discriminar queijos provenientes de diferentes países/regiões, processo de fabricação e sistema de agricultura utilizado, obtendo

taxas de classificação correta de 100%, >95% e 73,5% na etapa de validação, respectivamente.

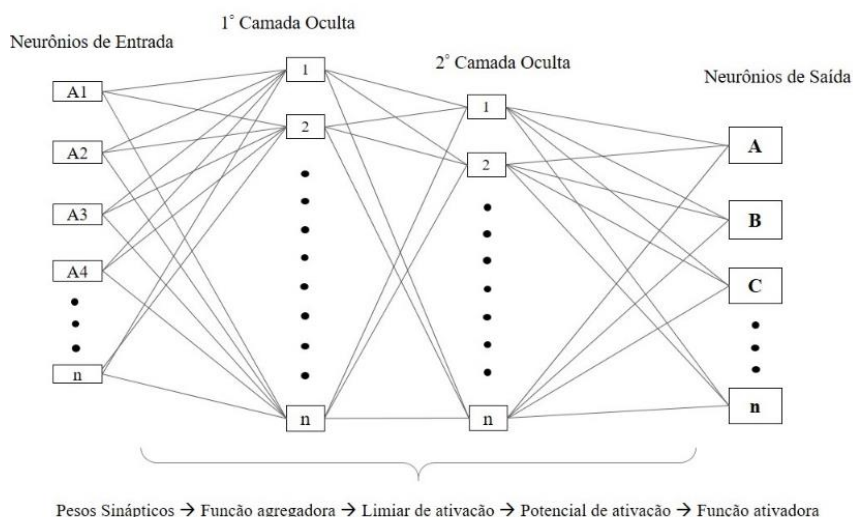
2.5.3. Redes Neurais Artificiais

As RNA consistem em modelos computacionais inspirados no sistema nervoso, capazes de estimar, classificar, otimizar dados e realizar o processo de aprendizagem a partir de dados reais. A aplicação das redes em relação aos modelos empíricos revela vantagens por capturar relações funcionais entre variáveis de entrada e saída e acumular conhecimentos por meio do processo de aprendizagem para, posteriormente, disponibilizá-las para predição ou classificação de quaisquer dados fornecidos a ela, representando uma ferramenta valiosa na avaliação da qualidade e autenticidade de alimentos. As características mais atrativas das RNA estão associadas com a elevada habilidade em mapear sistemas não-lineares, aprendendo os comportamentos envolvidos a partir de informações obtidas previamente (SINGH et al., 2009).

Os neurônios artificiais representam um conjunto de unidades de processamento que são interligadas por conexões matemáticas, formando subgrupos estruturais correspondentes às camadas de entrada, camadas ocultas e de saída. Os sinais captados através dos neurônios na camada de entrada são transferidos para as camadas intermediárias e ponderados através dos pesos sinápticos até a camada de saída, processamento que ocorre em paralelo, em todos os neurônios, sendo distribuída a informação automaticamente para todas as unidades que compõem a rede (SILVA et al., 2010).

Os neurônios são compostos pela função agregadora, limiar de ativação, potencial de ativação, função de ativação e saída, que se refere ao grupo que se deseja classificar ou prever. A função agregadora recebe os sinais e realiza a soma dos produtos destes sinais, enquanto que o limiar de ativação é uma constante que permite a passagem da informação para a função de ativação, responsável por transmitir as somas ponderadas de informações. O potencial de ativação está relacionado ao valor de saída da função geradora e de entrada da função de ativação, que é responsável por modificar o valor do potencial de ativação para a obtenção da resposta no neurônio de saída, para se obter a resposta que se busca (Figura 7) (ELMOLLA et al, 2010).

Figura 7. Rede Neural Artificial e unidades de processamento do neurônio artificial



Fonte: Silva et al. (2010)

As redes podem ser organizadas com diferentes configurações, sendo as redes do tipo *Perceptron Multilayer* (MLP) muito utilizadas para a solução de vários problemas que envolvem altos graus de não-linearidade. Para o processo de aprendizagem, os algoritmos de aprendizagem operam de maneira diferente e nas redes de multicamadas comumente se utiliza do algoritmo *Backpropagation*, no qual o aprendizado se dá por um processo de retropropagação do erro. O *Resilient Propagation* uma versão aperfeiçoada do algoritmo *Backpropagation*, atualmente também é bem difundido e tem por objetivo tornar o processo de convergência mais eficiente (KHATAEE et al., 2010).

As RNA já foram aplicadas anteriormente em produtos lácteos na detecção de fraude em leite fluido, por meio da mistura de leite de diferentes espécies (SILVA et al., 2020) e na detecção de adulterantes e reconstituintes como uréia, bicarbonato de sódio, hidróxido de sódio e peróxido de hidrogênio (CONCEIÇÃO et al., 2019) associados ao FTIR-ATR. Foi obtida classificação de até 100% para detecção de adulteração de leite de vaca em búfala e maior que 76,6% para todos os adulterantes, respectivamente, demonstrando que é uma ferramenta que pode ser utilizada na verificação da autenticidade de produtos lácteos.

Em queijos, Soto-Barajas et al. (2013) utilizaram as RNA junto ao NIR para verificar o nível de adulteração de queijos Zamorano adulterados com misturas de leite de vaca, ovelha e cabra, obtendo-se 75% de classificação correta na etapa de validação. Vásquez et al. (2018) realizaram a predição da textura de queijos suíços durante o processo de maturação utilizando perfis espectrais e como resultado, foi possível utilizar os modelos de redes neurais para prever as propriedades de textura desse tipo de queijo ao longo do período de maturação.

2.6. Estado da Arte: aplicação do MIR e NIR associado à quimiometria para discriminação da origem de queijos

A espectroscopia NIR tem sido largamente aplicada para identificação de origem em queijos (Capítulo V - Table 2), de acordo com diversas abordagens, no entanto, estudos envolvendo queijo Coalho ainda não foram realizados. A maioria das investigações com o NIR para esta perspectiva envolveu a diferenciação em relação à procedência geográfica, como países e regiões diferentes, principalmente de queijos com origem protegida (PILLONEL et al., 2003; KAROUI et al., 2005b; CATTANEO et al., 2008; OCA et al., 2012). O tipo de processamento e as cadeias de produção (KAROUI et al., 2006; COZZI et al., 2009), o regime de alimentação dos animais (ANDUEZA et al., 2013; BERGAMASCHI et al., 2020) e a sazonalidade (GONZÁLEZ-MARTÍN et al., 2011b; GONZALEZ-MARTÍN et al., 2014) também foram critérios utilizados para a diferenciação dos queijos.

A utilização do NIR para esta finalidade ocorreu com amostras raladas, compostas pelo queijo inteiro como apresentado por Cozzi et al. (2009) e Andueza et al. (2013) e pela casca ou miolo para queijos com características distintas em sua parte interna e externa devido ao processo de maturação, como observado por Karoui et al. (2005b) e Bergamaschi et al. (2020).

Quanto a obtenção e tratamento dos espectros, a maioria dos autores utilizou os espectros brutos, a exemplo de Pillonel et al. (2003) e Karoui et al. (2005b), enquanto que Oca et al. (2012) aplicaram os tratamentos de correção de luz *Standard Normal Variate* (SNV) e Cevoli et al. (2013a) e Cevoli et al. (2013b) utilizaram o *Multiplicative Scatter Correction* (MSC), sendo observada a redução no número de variáveis latentes na aplicação da análise multivariada e maior percentual de explicação da variabilidade dos dados originais.

A composição química e as características físico-químicas dos queijos são refletidos nos espectros do NIR, parâmetros que contribuíram para diferenciação destes em diversos estudos. González-Martín et al. (2011a) e Oca et al. (2012) apontaram que as diferenças espectrais podem ter relação com o tipo de forragem consumida pelos animais, condições da pastagem, raça e estágio de lactação animal ou também com o tratamento térmico utilizado para o leite. Cozzi et al. (2009) utilizaram o NIR como uma alternativa às análises químicas para discriminar queijos Asiago d'Alleva produzidos em regiões de alpes, montanhas e várzeas da Itália e aplicando o ACP foi possível visualizar a formação de grupos distintos no espaço bidimensional. Observou-se que as bandas relacionadas com o estiramento e

deformação de grupos CH e CH₂ das moléculas de lipídeos contribuíram com a indicação geográfica destes queijos e na visualização das diferenças existentes no teor dos ácidos graxos.

Os métodos quimiométricos comumente utilizados para a diferenciação entre as amostras em relação à sua proveniência ocorreu principalmente pela Análise Linear Discriminante e Análise Fatorial Discriminante (ALD/AFD) e o ACP. Karoui et al. (2005b) diferenciaram queijos Emmental de regiões da Europa por meio do NIR e das características físico-químicas, e aplicando ALD/AFD foi obtido entre 86,8%-100% de classificação correta. Resultado semelhante foi obtido por Karoui et al. (2006) ao aplicar o AFD junto ao NIR em queijos de zonas de produção diferentes tendo como resultado percentual de classificação correta de 90,7% e 80,6% da calibração e validação, respectivamente.

Cevoli et al. (2013a) aplicaram ACP e RNA utilizando o NIR e o MIR (FTIR) a fim de classificar queijos Parmigiano Reggiano, que possuem DOP de acordo com a conformidade do conteúdo de casca, critério que é exigido pela legislação (18%) para obtenção da origem protegida. Com a ACP foi possível a diferenciação dos queijos e o modelo de RNA foi capaz de classifica-los corretamente em seus respectivos grupos, obtendo 95,5% e 96,7% de classificação para o NIR e MIR, respectivamente, demonstrando que ambas as técnicas possuem boa capacidade preditora e são adequadas para a classificação e discriminação de queijos produzidos em locais distintos, principalmente quando se utiliza ACP e RNA.

A espectroscopia MIR foi empregada para identificação de origem em pesquisas científicas por meio de diversas abordagens, sendo observado que a técnica FTIR-ATR apresentou maior aplicação entre 2003 e 2020, sendo a ALD e o ACP as ferramentas quimiométricas mais exploradas para discriminar os queijos (Capítulo V - Table 2). Queijos com DOP como Gruyère e L'Etivaz tiveram sua origem investigada por Karoui et al. (2005a) e Karoui et al. (2007) e ambos os estudos utilizaram os espectros brutos, sem tratamento prévio para a aplicação da análise multivariada. Aplicou-se o AFD nos escores da ACP, nas regiões espectrais 900-1500 cm⁻¹ (relacionada com as ligações de C, H e O, referente aos carboidratos), 1500-1700 cm⁻¹ (referentes às amidas I e II) e 2800-3000 cm⁻¹ (correspondente aos grupos metil e metileno dos ácidos graxos), obtendo taxas de classificação correta, variando entre 80% e 90,9%. Os resultados encontrados por Gori et al. (2012) indicaram que dos 36 queijos analisados por MIR, ALD e ACP classificaram com sucesso os queijos Parmigiano-Reggiano e tipo Grana ralados oriundos da Itália, Europa Central e Norte da Europa, sendo que ao aplicar o ALD foi obtido 100% de classificação dos grupos.

A origem geográfica de queijos Emmental foi identificada por meio do MIR tendo como base a sazonalidade nos estudos de Pillonel et al. (2003), Karoui et al. (2004a), Karoui et al. (2004b), Karoui et al. (2005b), enquanto que Picque et al. (2002) diferenciaram estes queijos com base na origem do leite utilizado na produção, sendo que a aplicação da ALD junto aos dados obtidos por MIR proporcionou a classificação correta dos queijos variando entre 76,7% e 100%.

Nesse sentido, observa-se que a aplicação de técnicas MIR e NIR junto a análises quimiométricas vem sendo realizada em diversos tipos de queijo e em distintos lugares do mundo, sendo obtidos resultados satisfatórios, podendo também serem consideradas alternativas pertinentes para a indicação geográfica de queijos Coalho.

3. REFERÊNCIAS

- ABBAS, O.; ZADRAVEC, M.; BAETEN, V.; MIKUŠ, T.; LEŠIĆ, T.; VULIĆ, A.; PRPIĆ, J.; JEMERŠIĆ, L.; PLEADIN, J. Analytical methods used for the authentication of food of animal origin. **Food Chemistry**, v. 246, n. 25, p. 6-17, 2018.
- ADAB. Agência de Defesa Agropecuária da Bahia. Inspeção de produtos de origem agropecuária. Relatório anual, 2017. Acesso em Janeiro de 2018.
- ALEWIJN, M.; WEHRENS, R.; SASKIA, M.; RUTH, V. Robust detection methodology of milk heat treatment in cheese based on volatile profile fingerprinting. **International Dairy Journal**, v. 85, n. 1, p. 211-218, 2018.
- ALINOVI, M.; MUCCHETTI, G.; TIDONA, F. Application of NIR spectroscopy and image analysis for the characterisation of grated Parmigiano-Reggiano cheese. **International Dairy Journal**, v. 92, n 1, p. 50-58, 2019.
- ANDRADE, J.; PEREIRA, C. G.; ALMEIDA JUNIOR, J. C.; VIANA, C. C. R.; NEVES, L. N. O.; SILVA, P. H. F.; BELL, M. J. V.; ANJOS, V. C. FTIR-ATR determination of protein content to evaluate whey protein concentrate adulteration. **LWT- Food Science and Technology**, v. 99, n. 1, p. 166-172, 2019.
- ANDRADE, J.; PEREIRA, C. G.; RANQUINE, T.; AZARIAS, C. A.; BELL, M. J. V.; ANJOS, V. C. Long-Term Ripening Evaluation of Ewes' Cheeses by Fourier-Transformed Infrared Spectroscopy under Real Industrial Conditions. **Journal of Spectroscopy**, v. 2018, n. 1, p. 1-9.
- ANDUEZA, D.; AGABRIEL, C.; CONSTANT, I.; LUCAS, A. Using visible or near infrared spectroscopy (NIRS) on cheese to authenticate cow feeding regimes. **Food Chemistry**, v.14, n. 1, p. 209-214, 2013.
- BERGAMASCHI, M.; CIPOLAT-GOTET, C.; CECCHINATO, A.; SCHIAVON, S.; BITTANTE, G. Chemometric authentication of farming systems of origin of food (milk and ripened cheese) using infrared spectra, fatty acid profiles, flavor fingerprints, and sensory descriptions. **Food Chemistry**, v. 305, n. 1, p. 125480.
- BEZERRA, T. K. A.; ARCANJO, N. M. O.; ARAÚJO, A. R. R.; QUEIROZ, A. L. M.; OLIVEIRA, M. E. G.; GOMES, A. M. P.; MADRUGA, M. S. Volatile profile in goat coalho

cheese supplemented with probiotic lactic acid bacteria. **LWT - Food Science and Technology**, v. 76, p. 209-215, 2017.

BOTELHO, B. G.; MENDES, B. A. P.; SENA, M. M. Development and analytical validation of robust near-infrared multivariate calibration models for the quality inspection control of Mozzarella cheese. **Food Analytical Methods**, v. 6, n. 3, p. 881-891, 2013.

BOTELHO, B. G., REIS, N., OLIVEIRA, L. S., & SENA, M. M. Development and analytical validation of a screening method for simultaneous detection of five adulterants in raw milk using mid-infrared spectroscopy and PLS-DA. **Food Chemistry**, 181(1), 31-37, 2015.

BOURNE, M. C. **Food Texture and Viscosity: Concept and Measurement**. 2. Ed. New York, USA: Elsevier Science and Technology Books, 2002, 423p.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria do Desenvolvimento Agrário. Instrução Normativa Nº 30, de 26 de junho de 2001. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Manteiga da Terra ou Manteiga de Garrafa; Queijo de Coalho e Queijo de Manteiga. **Diário Oficial da União**. Brasília, 16 de julho de 2001.

CATTANEO, T. M. P.; BARZAGHI, S. Outer Product Analysis Applied to near Infrared and Mid Infrared Spectra to Study a Spanish Protected Denomination of Origin Cheese. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, v. 17, n. 3, p. 135-140, 2009.

CATTANEO, T. M. P.; TORNELLI, C.; ERINI, S.; PANARELLI, E. V. Relationship between Sensory Scores and near Infrared Absorptions in Characterising Bitto, an Italian Protected Denomination of Origin Cheese. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, v. 16, n. 3, p. 173-178, 2008.

CEVOLI, C.; FABBRI, A.; GORI, A.; CABONI, M. F.; GUARNIERI, A. Screening of grated cheese authenticity by nir spectroscopy. **Journal of Agricultural Engineering**, v. XLIV, n. s2, p. 264-267, 2013b.

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

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, n. 4, p.780-785, 2019.

COROIAN, A.; TRIF, M.; COROIAN, C. O.; MIREȘAN, V.; RĂDUCU, C.; DĂRĂBAN, S. Qualitative evaluation of buffalo cheese using FTIR spectroscopy. **International Journal of the Bioflux Society**, v. 4, n. 2, p. 66-70, 2012.

COZZI, G.; FERLITO, J.; PASINI, G.; CONTIERO, B.; GOTTARDO, F. Application of Near-Infrared Spectroscopy as an Alternative to Chemical and Color Analysis To Discriminate the Production Chains of Asiago d'Allevato Cheese. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 24, p. 11449-11454, 2009.

CUIBUS, L.; MAGGIO, R.; MUREȘAN, V.; DIACONEASA, Z.; FETEA, F.; SOCACIU, C. Preliminary Discrimination of Cheese Adulteration by FT-IR Spectroscopy. **Food Science and Technology**, v.71, n. 24, p. 142-146, 2014.

DA SILVA, R. A. **Caracterização microbiológica, físico-química, proteômica e bioativa de queijos de Coalho Artesanal produzidos na Região Agreste do Estado de Pernambuco-Brasil**. Tese (Doutorado). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Pernambuco, 195 f., 2012.

DANEZIS, G. P.; PAPPAS, A. C.; TSIPLAKOU, E.; PAPPA, E. C.; ZACHARIOUDAKI, M.; TSAGKARIS, A. S.; PAPACHRISTIDIS, C. A.; SOTIRAKOGLU, K.; ZERVAS, G.; GEORGIU, C. A. Authentication of Greek Protected Designation of Origin cheeses through elemental metabolomics. **International Dairy Journal**, v. 104, n. 1, p. 104599, 2020.

DAS, K. e NENADIC, Z. Approximate information discriminant analysis: A computationally simple heteroscedastic feature extraction technique. **Pattern Recognition**, v. 41, n. 5, p. 1548-1557, 2008

DIAS, C.; MENDES, L. Protected Designation of Origin (PDO), Protected Geographical Indication (PGI) and Traditional Speciality Guaranteed (TSG): A bibliometric analysis. **Food Research International**, v. 103, n. 1, 492-508, 2018.

DIAS G M P, SILVA F O, PORTO T S, HOLANDA M T AND PORTO A L F. Perfil dos peptídeos bioativos obtidos de queijos de coalho com potencial antimicrobiano. **Pesquisa Agropecuária Pernambucana**, v. 24, p. e1961242019, 2019.

ELMOLLA, E. S.; CHAUDHURI, M.; ELTOUKHY, M. M. The use of artificial neural network (ANN) for modeling of COD removal from antibiotic aqueous solution by the Fenton process. **Journal of Hazardous Materials**, v. 179, n. 1-3, p. 127-134, 2010.

EMBRAPA (2014) Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Características predominantes de bioma, clima, relevo e solos nos estados do Maranhão, Tocantins, Piauí e Bahia [Internet document] URL <https://www.embrapa.br/en/international> Accessed 30/08/2020.

ESTEKI, M.; SHAHSAVARIA, Z. SIMAL-GANDARA, J. Use of spectroscopic methods in combination with linear discriminant analysis for authentication of food products. **Food Control**, v. 91, n. 1, p. 100-112.

EU (2011). Commission Regulation (EC) N° 1129/2011. Official Journal of European Union. L 365 295/1. Retrieved from <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:295:0001:0177:EN:PDF> Acesso em 07/11/2020.

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

FOGAÇA, D. L. **Avaliação de propriedades mecânicas, físico-químicas e influência do tipo de acidificante e tempo de armazenamento visando à aplicação no controle do processo de produção de queijos de coalho**. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, Bahia. 75f., 2014.

FONTAN, G. C. R. **Queijo de coalho light: produção, caracterização físico-química, sensorial e reológica**. Tese (doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais. 86f., 2013.

FONTENELE, M. A.; BASTOS, M. S. R.; SANTOS, K. M. O, BEMQUERER, M. P.; EGITO, A. S. Peptide profile of Coalho cheese: A contribution for Protected Designation of Origin (PDO) **Food Chemistry**, v. 219, p. 382–390, 2017.

FREITAS FILHO, J. R.; SOUZA FILHO, J. S.; OLIVEIRA, H. B. ANGELO, J. H. B.; BEZERRA, J. D. C. Avaliação da qualidade do queijo “coalho” artesanal fabricado em Jucati – PE. **Extensio: Revista Eletrônica de Extensão**, v. 6, n. 8, p. 35-48, 2009.

GLASSFORD, S. E.; BYRNE, B.; KAZARIAN, S. G. Recent applications of ATR FTIR spectroscopy and imaging to proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1834, p. 2849–2858.

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.

GONZÁLEZ-MARTÍN, M. I.; HERNÁNDEZ-HIERRO, J. M.; REVILLA, I.; VIVAR-QUINTANA, A.; GONZÁLEZ-PÉREZ, C.; GARCÍA, L. G. ORTEGA, I. A. L. Differentiation of organic and non-organic ewe's cheeses using main mineral composition or near infrared spectroscopy coupled to chemometric tools: A comparative study. **Talanta**, v. 85, n. 4, p. 1915-1919, 2011a.

GONZÁLEZ-MARTÍN, I.; HERNÁNDEZ-HIERRO, J. M.; SALVADOR-ESTEBAN, J.; GONZÁLEZ-PÉREZ, C.; REVILLA, I.; VIVAR-QUINTANA, A. Discrimination of seasonality in cheeses by near-infrared technology. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 6, p. 1064-1069, 2011b.

GONZÁLEZ-MARTÍN, I.; HERNÁNDEZ-HIERRO, J. M.; GONZÁLEZ-PÉREZ, C.; REVILLA, I.; VIVAR-QUINTANA, A.; ORTEGA, I. L. Potential of near infrared spectroscopy for the analysis of volatile components in cheeses. **LWT - Food Science and Technology**, v. 55, n. 2, p. 666-673, 2014.

GORI, A.; MAGGIO, R. M.; CERRETANI, L.; NOCETTI, M.; CABONI, M. F. Discrimination of grated cheeses by Fourier transform infrared spectroscopy coupled with chemometric techniques. **International Dairy Journal**, v. 23, n. 2, p.115-120, 2012.

GUERRA, E.; GORI, A.; CEVOLI, C.; LOSI, G.; CABONI, M. F. Lipid fraction of creams collected in the Parmigiano-Reggiano cheese production area in response to extruded linseed supplementation of dairy cows' diets: GC-FID and FT-MIR evaluation. **International Journal of Dairy Technology**, v. 67, n. 4, 510-520, 2014.

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, n. 3-4, p. 1526-1532, 2013.

HAIR JR, J. F.; BLACK, W. C.; BABIN, B. J.; ANDERSON, R. E. **Análise Multivariada de Dados**. 6.ed. Porto Alegre: Bookman, 2009, 688p.

HOLROYD, J. S. E. The use of near infrared spectroscopy on milk and milk products. **Near Infrared Spectroscopy**, v. 21, p. 311-322, 2013.

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

INPI – Instituto Nacional de Propriedade Industrial. Pedidos de indicação geográfica concedidos e em andamento. Disponível em: <http://www.inpi.gov.br/menuservicos/indicacao-geografica/pedidos-de-indicacao-geografica-no-brasil>. Acesso em 31 de julho de 2019.

JABRI, M.; SANCHEZ, M.-P.; TROSSAT, P.; LAITHIER, C.; WOLF, V.; GROSPERRIN, P.; BEUVIER, E.; ROLET-RÉPÉCAUD, O.; GAVOYE, S.; GAÜZÈRE, Y.; BELYSHEVA, O.; NOTZ, E.; BOICHARD, D.; DELACROIX-BUCHET, A. Comparison of Bayesian and partial least squares regression methods for mid-infrared prediction of cheese-making properties in Montbéliarde cows. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 8, p. 6943-6958, 2019.

JABRI, M.; TROSSAT, P.; WOLF, V.; BEUVIER, E.; ROLET-RÉPÉCAUD, O.; GAVOYE, S.; GAÜZÈRE, Y.; BELYSHEVA, O.; GAUDILLIÈRE, N.; NOTZ, E.; GROSPERRIN, P.; LAITHIER, C.; DELACROIX-BUCHET, A. Mid-infrared spectrometry prediction of the cheese-making properties of raw Montbéliarde milks from herds and cheese dairy vats used for the production of Protected Designation of Origin and Protected Geographical Indication cheeses in Franche-Comté. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 7, 5992-6002, 2020.

JESUS, J. C.; SILVA, G. J.; GONÇALVES, B. R. F.; SOUZA, M .R.; SANTOS, L. S.; FERRÃO, S. P. B. Quick identification of the time of maturation of artisanal Minas cheese by FTIR-ATR spectroscopy and multivariate techniques. **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 31, n. 10, p. 2001-2011, 2020.

JIN, J.; AN, J. Robust discriminant analysis and its application to identify protein coding regions of rice genes. **Biosciences Matemática**, v. 232, n. 2, p.96-100, 2011.

KAMAL, M.; KAROUI, R. Analytical methods coupled with chemometric tools for determining the authenticity and detecting the adulteration of dairy products: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 46, p. 27-48, 2015.

KARAZIACK, C. B. **Determinação da composição e propriedades funcionais de queijos por imagem hiperespectral de infravermelho próximo.** Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 58f., 2016.

KAROUI, R.; DUFOUR, É.; PILLONEL, L.; PICQUE, D.; CATTENOZ, T.; BOSSET, J. O., Fluorescence and infrared spectroscopies: A tool for the determination of the geographic origin of Emmental cheeses manufactured during summer. **Le Lait**, v. 84, n. 4, p. 359-374, 2004a.

KAROUI, R.; DUFOUR, É.; PILLONEL, L.; PICQUE, D.; CATTENOZ, T.; BOSSET, J. O. Determining the geographic origin of Emmental cheeses produced during winter and summer using a technique based on the concatenation of MIR & fluorescence spectroscopic data. **European Food Research and Technology**, v. 219, n. 2, p. 184-189, 2004b.

KAROUI, R.; BOSSET, J. O.; MAZEROLLES, G.; KULMYRZAEV, A.; & DUFOUR, É. Monitoring the geographic origin of both experimental French Jura hard cheeses and Swiss Gruyère and L'Etivaz PDO cheeses using mid-infrared and fluorescence spectroscopies: A preliminary investigation. **International Dairy Journal**, v. 15, n. 1, p. 275–286, 2005a.

KAROUI, R., DUFOUR, E., PILLONEL, L., SCHALLER, E., PICQUE, D., CATTENOZ, T. & BOSSET, J. The potential of combined infrared and fluorescence spectroscopies as a method of determination of the geographic origin of Emmental cheeses. *International Dairy Journal*, 15(3), 287-298, 2005b.

KAROUI, R.; MOUAZEN, A. M.; DUFOUR, I.; PILLONEL, L.; PICQUE, D.; BOSSET, J. O. Mid infrared spectrometry: A tool for the determination of chemical parameters of Emmental cheeses produced during winter. **Le Lait Dairy Science and technology**, v. 86, p. 83–97, 2006.

KAROUI, R.; MAZEROLLES, G.; BOSSET, J.; BAERDEMAEKER, J.; DUFOUR, E. Utilisation of mid-infrared spectroscopy for determination of the geographic origin of Gruyère PDO and L'Etivaz PDO Swiss cheeses. **Food Chemistry**, v. 105, n. 2, p. 847-854, 2007.

KAROUI, R. (2017). **Methodologies for the characterization of the quality of dairy products.** In F. Toldrá (Eds.) *Advances in Food & Nutrition Research* (pp. 2-345).

KHATAEE, A. R.; ZAREI, M.; POURHASSAN, M. Bioremediation of malachite green from contaminated water by three microalgae: Neural network modeling. **Clean-Soil, Air, Water**, v. 38, n. 1, p. 96-103, 2010.

KOCA, N.; RODRIGUEZ-SAONA, L. E.; HARPER, W. J.; ALVAREZ, V. B. Application of Fourier Transform Infrared Spectroscopy for Monitoring Short-Chain Free Fatty Acids in Swiss Cheese. *Journal of Dairy Science*, 90(8), 3596-3603, 2007.

KOKAK, A; SANLI, T; ANLI, E.A Role of using adjunct cultures in release of bioactive peptides in whitebrined goat-milk cheese, **LWT - Food Science and Technology** 123 (2020) 109127.

LEI, T.; SUN, D-W. Developments of Nondestructive Techniques for Evaluating Quality Attributes of Cheeses: A Review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 88, n. 1, p. 527-542, 2019.

LEITE, A. I. N.; PEREIRA, C. G.; ANDRADE, A.;VICENTINIC, N. M.; BELLA, M. J. V. FTIR-ATR spectroscopy as a tool for the rapid detection of adulterations in butter cheeses. **LWT - Food Science and Technology**, v. 109, p. 63-69, 2019.

LENART, J.; SZIGEDI, T., DERNOVICS, M.; FODOR, M. Application of FT-NIR spectroscopy on the determination of the fat and protein contents of lyophilised cheeses. **Acta Alimentaria**, v. 41, p. 351-362, 2012.

LERMA-GARCÍA, M. J.; GORI, A.; CERRETANI, L.; SIMÓ-ALFONSO, E. F.; CABONI, M. F. Classification of Pecorino cheeses produced in Italy according to their ripening time and manufacturing technique using Fourier transform infrared spectroscopy. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n 10, p. 4490-4496, 2010.

LIMA, M. S. F.; SILVA, R. A.; LIMA FILHO, J.L.; PORTO, A. L. F. Queijo de coalho artesanal: fonte alternativa de peptídeos antimicrobianos. **Brazilian Journal of Food Technology**. v.20, e2016193, 2017

LOHUMI, S.; LEE, S.; LEE, H.; CHO, B.-K. A review of vibrational spectroscopic techniques for the detection of food authenticity and adulteration. **Trends in Food Science & Technology**, v. 45, n. 1, p. 85-98, 2015.

LOUDIYI, M.; KAROUI, R.; RUTLEDGE, D. N.; LAVIGNE, R.; MONTEL, M. C.; AÏT-KADDOUR, A. Contribution of fluorescence spectroscopy and independent components

analysis to the evaluation of NaCl and KCl effects on molecular-structure and fat melting temperatures of Cantal-type cheese. **International Dairy Journal**, v. 73, n.1, p. 116-127, 2017.

MACHADO, G. M.; COSTA, R. G. B.; COSTA JUNIOR, L. C. G.; SOBRAL, D.; TAVEIRA, L. B.; SOUZA, B. M. Aspectos físico-químicos de queijo de coalho fabricado com o uso de ácido láctico. **Alimentos e Nutrição**, v. 22, n. 3, p. 421-428, 2011.

MAMEDE M. E. O.; VIANA, A. C.; SOUZA, A. L. C.; FARIAS, S. A. O.; ARAUJO, P. A. Estudo das características sensoriais e da composição química de queijo de coalho industrializado. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, n. 3, p. 364-370, 2010.

MAPA. MINISTÉRIO DE AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - Relatórios de produtos por UF. Brasília: MAPA, 2017.

MARTÍN-DEL-CAMPO, S. T.; PICQUE, D.; COSÍO-RAMÍREZ, R.; CORRIEU, G. Evaluation of Chemical Parameters in Soft Mold-Ripened Cheese During Ripening by Mid-Infrared Spectroscopy. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 6, p. 3018-3027, 2007b.

MCSWEENEY, P. L. H.; OTTOGALLI, G.; FOX, P. F. **Diversity of Cheese Varieties: An Overview**. In P. Fox, P. McSweeney, T. Cogan, & T. Guinee (Eds.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology* (pp 1-23), 2004.

MEDEIROS, M. L., PASSADOR, C. S.; PASSADOR, J. L. Implications of geographical indications: a comprehensive review of papers listed in CAPES' journal database. **Revista de Administração e Inovação** 13 315–329, 2016.

MEDINA, S.; PERESTRELO, R.; SILVA, P.; PEREIRA, J. A. M.; CÂMARA, J. S. Current trends and recent advances on food authenticity technologies and chemometric approaches. **Trends in Food Science & Technology**, v. 85, n.1, p. 163-176, 2019.

MELFSEN, A.; HARTUNG, E.; HAEUSSERMANN, A. Accuracy of in-line milk composition analysis with diffuse reflectance near-infrared spectroscopy. **Journal of Dairy Science**, 95 6465, 2012.

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

NIELSEN, S. D.; BEVERLY, R. L.; QU, Y.; DALLAS, D. C. Milk bioactive peptide database: A comprehensive database of milk protein-derived bioactive peptides and novel visualization. **Food Chemistry**, v. 232, p. 673-682, (2017).

OCA, M. L.; ORTIZ, M. C.; SARABIA, L. A.; GREDILLA, A. E.; DELGADO, D. Prediction of Zamorano cheese quality by near-infrared spectroscopy assessing false non-compliance and false compliance at minimum permitted limits stated by designation of origin regulations. **Talanta**, v. 99, p. 1, 558-565, 2012.

OTTAVIAN, M.; FACCO, P.; BAROLO, M.; BERZAGHI, P.; SEGATO, S.; NOVELLI, E.; BALZAN, S. Near-infrared spectroscopy to assist authentication and labeling of Asiago d'allevato cheese. **Journal of Food Engineering**, v. 113, n. 2, p. 289-298, 2012.

PACHECO, J.; CASADO, S.; PORRAS, S. Exact methods for variable selection in principal component analysis: Guide functions and pre-selection. **Computational Statistics and Data Analysis**, v. 57, n. 1, p. 95-111, 2013.

PASQUINI, C. (2018). Near infrared spectroscopy: A mature analytical technique with new perspectives - A review. **Analytica Chimica Acta**. v. 1026, n. 1, p. 8-36.

PAX, A. P.; ONG, L.; VONGSVIVUT, J.; TOBIN, M. J.; KENTISH, S. E.; GRAS, S. L. The characterisation of Mozzarella cheese microstructure using high resolution synchrotron transmission and ATR-FTIR microspectroscopy. **Food Chemistry**, v. 291, p. 214-222, 2019.

PESTANA, M. H.; GAGEIRO, J. N. **Análise de Dados para Ciências Sociais**. 2 ed. Lisboa: Sílabo, 2014, 1233 p

PICQUE, D.; CATTENOZ, T.; CORRIEU, G. Discrimination of Emmental cheeses by infrared spectroscopy. **Milk Science International - Milchwissenschaft**, v. 57, n. 4, p. 202-204, 2002.

PILLONEL, L.; DUFOUR, E.; SCHALLER, E.; BOSSET, J. O.; DE BAERDEMAEKER, J.; KAROUI, R. Prediction of colour of European Emmental cheeses by using near infrared spectroscopy: a feasibility study. **European Food Research and Technology**, v. 226, n. 1-2, p. 63-69, 2007.

PILLONEL, L.; LUGINBÜHL, W.; PICQUE, D.; SCHALLER, E.; TABACCHI, R.; BOSSET, J. O. Analytical methods for the determination of the geographic origin of

Emmental cheese: Mid- and near-infrared spectroscopy. **European Food Research and Technology**, v. 216, n. 2, p. 174-178, 2003.

QUEIROGA, R. C. R. E.; SANTOS, B. M., GOMES, A. M. P.; MONTEIRO, M. J.; TEIXEIRA, S. M.; SOUZA, E. L.; PEREIRA, C. J. D.; PINTADO, M. M. E. Nutritional, textural and sensory properties of Coalho cheese made of goats', cows' milk and their mixture. **LWT – Food Science and Technology**, v. 50, p. 538-544, 2013.

RODRIGUEZ-SAONA, L. E.; ALLENDORF, M. E. Use of FTIR for Rapid Authentication and Detection of Adulteration of Food. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 2, n. 1, p. 467-483, 2011.

RODRIGUEZ-SAONA, L. E.; KOCA, N.; HARPER, W. J.; ALVAREZ, V. B. Rapid Determination of Swiss Cheese Composition by Fourier Transform Infrared/Attenuated Total Reflectance Spectroscopy. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 5, p. 1407-1412, 2006.

SANCHEZ, M. P.; EL JABRI, M.; MINÉRY, S.; WOLF, V.; BEUVIER, E.; LAITHIER, C.; DELACROIX-BUCHET, A.; BROCHARD, M.; BOICHARD, D. Genetic parameters for cheese-making properties and milk composition predicted from mid-infrared spectra in a large data set of Montbéliarde cows. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 11, p. 10048-10061, 2018a.

SANCHEZ, M. P.; WOLF, V.; EL JABRI, M.; BEUVIER, E.; ROLET-RÉPÉCAUD, O.; GAÛZÈRE, Y.; MINÉRY, S.; BROCHARD, M.; MICHENET, A.; TAUSSAT, S.; BARBAT-LETERRIER, A.; DELACROIX-BUCHET, A.; LAITHIER, C.; FRITZ, S.; BOICHARD, D. Short communication: Confirmation of candidate causative variants on milk composition and cheesemaking properties in Montbéliarde cows. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 11, p. 10076-10081, 2018b.

SANTOS, B. M.; OLIVEIRA, M. E. G.; SOUSA, Y. R. F.; MADUREIRA, A. R. M. F. M.; PINTADO, M. M. E.; GOMES, A. M. P. Caracterizacao físico-química e sensorial de queijo de coalho produzido com mistura de leite de cabra e de leite de vaca. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**. v. 70, n. 3, p. 302-10, 2011.

SANTOS, L. S.; CARDOZO, R. M. D.; NUNES, N. M.; INÁCIO, A. B.; PIRES, A. C. S. PINTO, M. S. Easy classification of traditional Minas cheeses using artificial neural networks and discriminant analysis. **International Journal of Dairy Technology**, v. 70, p. 1-7, 2017.

SARA, S.; DAVIDE, P.; DOMENICO, V.; LUCIO, C.; PATRIZIA, P. Determining the authenticity of pdo buffalo mozzarella: an approach based on Fourier Transform Infrared (MIR- FTIR) spectroscopy and on chemometric tools. **International Journal of Latest Research in Science and Technology**, v. 7, n. 2, p. 1-6, 2018.

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

SILVA, R. A.; BEZERRA, V. S.; PIMENTEL, M. C. B., PORTO, A. L. F.; CAVALCANTI, A. M. T. H.; FILHO, J. L. L. Proteomic and peptidomic profiling of Brazilian artisanal ‘Coalho’ cheese. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, p. 337-4344, 2016.

SILVA, L. K. R.; GONÇALVES, B. R. F.; HORA, F. F.; SANTOS, L. S.; FERRÃO, S. P. B. Spectroscopy Method (FTIR-ATR) and chemometric tools to detect cow’s milk addition to buffalo’s milk. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, v. 19, n. 1, p. 11-20, 2020.

SILVA R. A.; LIMA, M. S. F.; VIANA, J. B. M.; BEZERRA, V. S.; PIMENTEL, M. C. B.; PORTO, A. L. F.; CAVALCANTI, M. T. H.; LIMA FILHO, J. L. Can artisanal “Coalho” cheese from Northeastern Brazil be used as a functional food? **Food Chemistry**, v. 135, p. 1533–1538, 2013.

SINDILEITE. **Sindicato das Indústrias de Laticínios e Produtos Derivados do Leite do Estado da Bahia**, 2018 Disponível em: <<http://www.sindicatodaindustria.com.br/sindileiteba/>> Acesso em: Outubro de 2019.

SINGH, K. P. et al. **Artificial neural network modeling of the river water quality: A case study**. Ecological Modelling, n. 220, v. 6, p. 888-895, 2009.

SOTO-BARAJAS, M. C.; GONZÁLEZ-MARTÍN, M. I.; SALVADOR-ESTEBAN, J.; HERNÁNDEZ-HIERRO, J. M.; MORENO-RODILLA, V.; VIVAR-QUINTANA, A. M.; CURTO-DIEGO, B. Prediction of the type of milk & degree of ripening in cheeses by means of artificial neural networks with data concerning fatty acids and near infrared spectroscopy. **Talanta**, v. 116, n. 1, p. 50-55, 2013.

SOUSA, A. Z. B.; ABRANTES, M. R.; SAKAMOTO, S. M.; SILVA, J. B. A.; LIMA, P. O.; LIMA, R. O.; ROCHA, M. O. C.; PASSOS, Y. D. B. Aspectos físico-químicos e microbiológicos do queijo tipo coalho comercializado em estados do nordeste do Brasil **Arquivos do Instituto de Biologia**, v.81, n.1, p. 30-35, 2014.

- TIMÓN, M. L.; PARRA, V.; OTTE, J.; BRONCANO, J. M.; PETRON, M. J. Identification of peptides radicals elimination (<3 kDa) Burgos cheese type. **LWT - Food Science and Technology**, v. 57, n. 1, p. 359-365, 2014.
- TIMÓN, M. L.; ANDRÉS, A. I.; OTTE, J.; PETRÓ, M. J. Antioxidant peptides (<3 kDa) identified onhard cow milk cheese with rennet from different origin **Food Research International**, v.120, p. 643-649, 2018.
- 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, n. 1., p. 8-15, 2018.
- VISCONTI, L. G.; RODRÍGUEZ, M. S.; ANIBAL, C. V. Determination of grated hard cheeses adulteration by near infrared spectroscopy (NIR) and multivariate analysis. **International Dairy Journal**, v. 104, n. 1, p. 104647, 2020.
- WANG, F.; LIU, A-P.; REN, F-Z.; ZHANG, X-Y.; STEPHANIE, C.; ZHANG, L-D.; GUO, H-Y FTIR Analysis of Protein Secondary Structure in Cheddar Cheese during Ripening. **Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi**, v. 31, p. 1786-1789, 2011.
- WILKINSON, J.; CERDAN, C.; DORIGON, C. Geographical Indications and “Origin” Products in Brazil–The Interplay of Institutions and Networks. **World Development**, v. 98, n. 1, p. 82-92, 2017.
- WOODCOCK, T.; FAGAN, C. C.; O'DONNELL, C. P.; DOWNEY, G. Application of near and mid-infrared spectroscopy to determine cheese quality and authenticity. **Food and Bioprocess Technology**, v. 1, p. 117-129, 2008.
- WU, D.; FENG, S.; HE, Y. Short-wave near-infrared spectroscopy of milk powder for brand identification and component analysis. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 3, 939-949, 2008.

Capítulo II

Objetivos

1. OBJETIVOS

1.1. Objetivo Geral

Utilizar o infravermelho próximo (NIR) e médio (MIR), perfis proteômicos avaliados por MIR e cromatografia (RP-HPLC) e medidas analíticas associados à quimiometria para discriminar a origem geográfica de queijos Coalho.

1.2. Objetivos Específicos

- Caracterizar os queijos Coalho por meio da composição e propriedades físico-químicas de umidade, cinzas, extrato seco total (EST), proteína, gordura no extrato seco (GES), acidez titulável, pH, e medidas de cor instrumental;

- Avaliar as propriedades tecnológicas dos queijos Coalho por meio da Análise de Perfil de Textura (APT) e derretimento;

- Analisar as amostras de queijo Coalho por meio das técnicas espectroscópicas de infravermelho médio (MIR) e próximo (NIR);

- Realizar a extração de Peptídeos Solúveis em Água (PSA) de queijos Coalho e avaliá-los por meio das técnicas espectroscópica (MIR) e cromatográfica (RP-HPLC);

- Aplicar análises quimiométricas Análise de Componentes Principais (ACP), Análise Linear Discriminante (ALD) e Redes Neurais Artificiais (RNA) aos dados espectroscópicos, cromatográficos e às medidas analíticas para discriminar e classificar os queijos de acordo com sua origem geográfica.

Capítulo III

Artigo 1

Discrimination of Coalho cheese origin by near and middle infrared spectroscopy and analytical measures

Artigo submetido ao periódico *International Journal of Dairy Technology*, Aceito para publicação em 13 de Janeiro de 2021

DOI: 10.1111/1471-0307.12767

Title Page

Discrimination of Coalho cheese origin by near and middle infrared spectroscopy and analytical measures

Discrimination of Coalho cheese origin

LARISSA K R SILVA^{1,2}, JOSANE C JESUS¹, REBECA R V ONELLI¹, DANIELE G CONCEIÇÃO¹, LEANDRO S SANTOS¹ and SIBELLI P B FERRÃO^{1*}

¹*Program in Food Engineering and Science, State University of Bahia Southwest, Campus Universitário, CEP 45700-000, Itapetinga, Bahia, Brazil*

²*Center for Biological and Health Sciences, Federal University of Western Bahia, Campus Universitário, CEP 47810-047, Barreiras, Bahia, Brazil*

**Author for correspondence:*

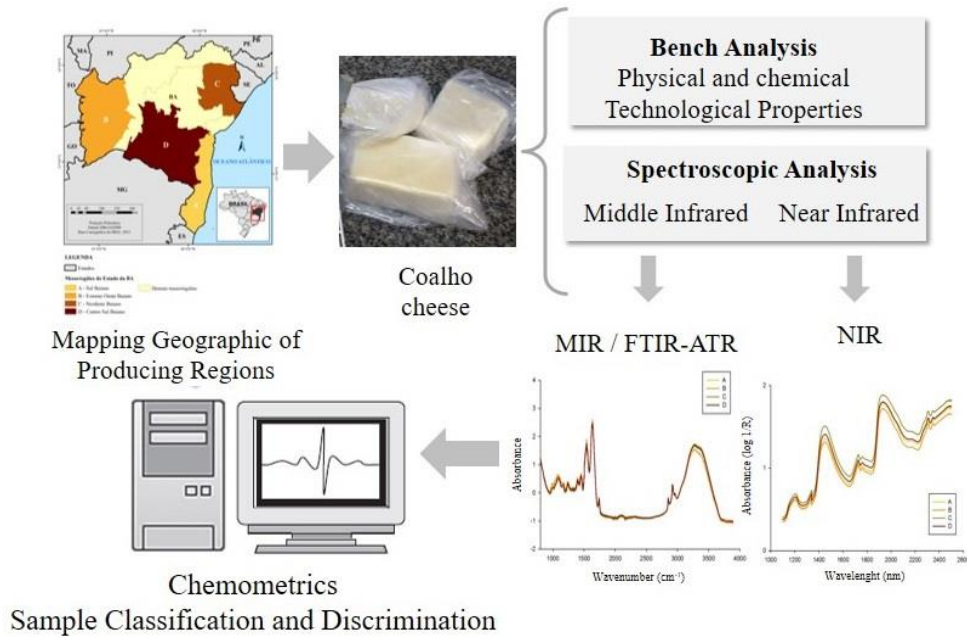
Sibelli Passini Barbosa Ferrão

Program in Food Engineering and Science, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 45700-000, Itapetinga, Bahia, Brazil

e-mail: sibpass@yahoo.com.br

Tel.: +55 77 32618653.

Graphical Abstract



Abstract

The discrimination of traditional Coalho cheese by origin is important to ensure authenticity. The middle and near infrared spectroscopy and analytical measures associated with different chemometric approaches were used to characterize and discriminate Coalho cheese from different regions of Bahia, Brazil. Principal Component Analysis and Linear Discriminant Analysis were able to show the difference between cheeses and the better discrimination was observed using near infrared, with forming distinct groups by region and correct classification up to 90%. The infrared spectroscopy, especially the near, showed to be very useful in the quick discrimination of cheeses according to their origin.

Keywords: dairy products, traditional, multivariate analysis, chemometrics

INTRODUCTION

As in other countries, in Brazil there is the production of typical Brazilian cheeses, such as Minas padrão, “Minas curado”, Butter cheese and Coalho cheese. Among these, the Coalho cheese is very widespread, mainly in the Northeast region of Brazil (Souza *et al.* 2014; Fontenele *et al.* 2017).

The production and consumption of Coalho cheese has gained space across the country, and the State of Bahia stands out in this production, since it has one of the most important dairy production in the Northeast, contributing with a significant portion in the expansion of Coalho cheese production in the Brazil (IBGE 2018).

Coalho cheese is a product obtained through the coagulation of milk by the action of rennet and among its particularities, it has a composition of medium to high moisture and fat content. Another important feature is the firm texture, related to the mechanical properties of greater chewiness, hardness and cohesiveness, in addition to the slightly acidic flavor and the non-melting during heating. It is consumed entirely, roasted and is considered an indispensable ingredient in the preparation of many typical northeastern dishes (Queiroga *et al.* 2013).

Brazilian legislation establishes the minimum product identity standards with long ranges of variation for fat content (35-60 g/100 g) and moisture (36-54.9 g/100 g), being produced Coalho cheese with different characteristics, even if produced in different regions, however, within the legal aspects (Brasil 2001).

The fact that Coalho cheese has been manufactured for more than a century has led to variations in its processing over time, which have spread to each region in a specific way. The Bahia has an extensive territorial area and the different producing regions have unique and specific characteristics such as soil and climate conditions and different animal breeds that influence the composition of the raw material and natural milk microbiota that generate specific biochemical changes. This set of factors will determine the physicochemical and functional attributes of Coalho cheese, which must be established in order to characterize and identify the particularities of the cheese produced in each region (Oliveira *et al.* 2012; Embrapa 2014).

Coalho cheeses with unique characteristics, which meet consumers' expectations for composition, texture or use appeal due to the original characteristics of a place, encourage product diversification and promote greater market reach (Souza *et al.* 2014). The analysis of the discrimination of cheeses by region represents their distinction in terms of quality and uniqueness, in addition to valuing their commercialization (Santos *et al.* 2017).

There are several traditional analytical methods for evaluating the composition and properties of cheeses, and there is a growing demand for fast, easy-to-perform techniques that require little sample preparation, good sensitivity and low operating cost, reducing the use of reagents. Thus, the spectroscopic study in middle infrared (MIR) and near (NIR) has stood out in the analysis of cheeses for presenting such advantages (Lei *et al.* 2019; Priyashantha *et al.* 2020; Jesus *et al.* 2020). These techniques are extensively explored, especially when associated with chemometric analysis, since it is possible to extract information based on the chemical composition and conformation of the cheese's components from the vibration of the functional groups that are part of the structure of these constituents, generating specific spectra, making it possible to achieve precise answers in the discrimination of samples quickly (Jesus *et al.* 2020; Gonçalves *et al.* 2020).

Spectroscopic techniques MIR and NIR were used in order to analyze the authenticity, perform the identification, separation and/or differentiation of the cheeses, according to the type of processing, composition and/or geographic location, such as Pecorino and Gouda (Andrade *et al.* 2018), Parmigiano (Cevoli *et al.* 2013; Alinovi *et al.* 2019), Butter cheese (Leite *et al.* 2019), Mozzarella (Pax *et al.* 2019), among others cheeses from different origins. Cattaneo *et al.* (2008) applied NIR spectroscopy to determine the geographical origin of Italian Bitto cheese, Sara *et al.* (2018) performed the discrimination and authentication of Buffalo Mozzarella with Protected Designation of Origin (PDO) in Italy, while Karoui *et al.* (2005) used MIR and NIR spectroscopy to discriminate Emmental cheese from different geographical origins in Europe.

In view of the great cultural and economic importance of Coalho cheese for the Northeastern region of Brazil and the advantages of using spectroscopic techniques, the objective was to apply MIR and

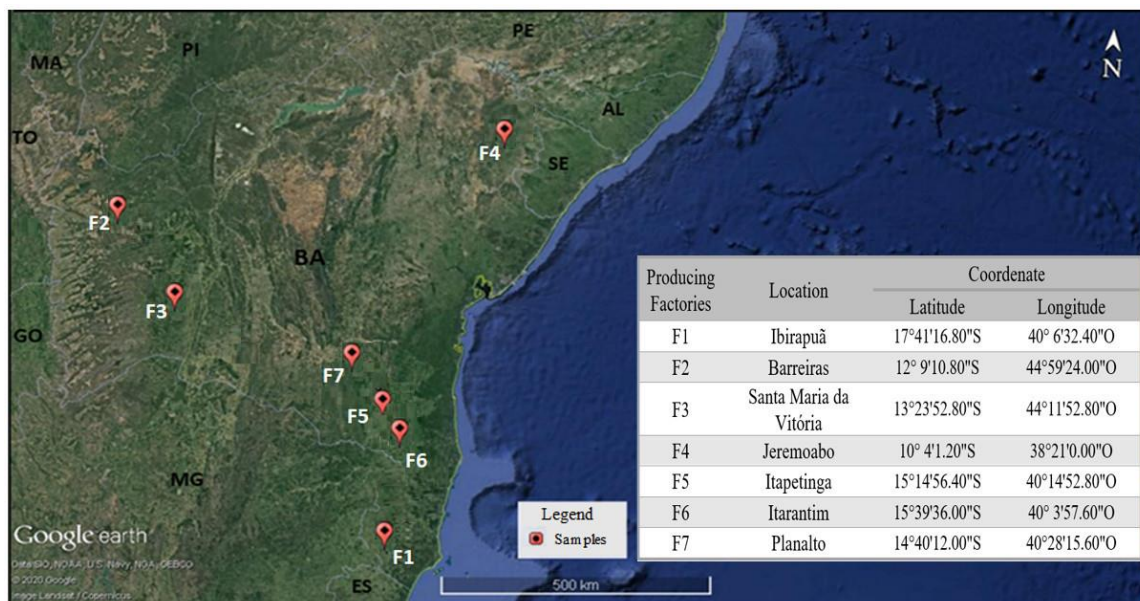
NIR spectroscopic techniques, and chemometrics analysis to characterize and discriminate Coalho cheese from different origins.

MATERIAL AND METHODS

Samples

After a study on the production of Coalho cheese in the State of Bahia, Brazil, geographic mapping was carried out, and the dairy producers of this type of cheese, registered by the Agência de Defesa Agropecuária da Bahia, state inspection agency, and with state or federal inspection seal, that were representative for each region in terms of producing companies were identified. The sampling was based on studies by Karoui *et al.* (2005), Cattaneo *et al.* (2008) and Sara *et al.* (2018). The official mesoregions of Bahia were considered, divided by the Brazilian Institute of Geography and Statistics (IBGE 1990) based on economic, cultural, climatic and also considered the biome aspects of the State (Embrapa 2014). Samples were collected between January 2018 and June 2019 from a total of seven dairy producers under official inspection (F1-F7), located in the producing mesoregions: South (n=10, F1), Far West (n=20, F2-F3), Northeast (n=10, F4) and South Center (n=30, F5-F7), totaling n=70 experimental units. The longitude and latitude coordinates of each producing factories are shown in Figure 1. 10 samples of each dairy, with different lots and expiration dates, were collected individually and periodically, month by month, in order to reach the whole year production and season variations, to ensure repeatability of the experiment. Coalho cheeses are semi-hard and unripened cheeses, of medium to high humidity, semi-fat to fat, slightly acid flavor, produced with whole bovine pasteurized milk, enzymatically coagulated (rennet of microbial origin), of cooked dough, with temperature of curd cooking between 45°C - 55°C, submitted to salting, drying, pressing, followed by packing and for this type of cheese, unripened, there is no addition of starter cultures and the storage occur under 6°C - 10°C on 10 days until commercialization (Brasil 2001).

Figure 1. Geographic location of the producing factories of coalho cheese in the State of Bahia, Brazil



Samples in 500 g bars, vacuum packed were obtained with up to 10 days of manufacture, transported in thermal boxes and kept refrigerated (6 °C) until twentieth day of refrigeration and they were frozen at -20 °C until the time of analysis, for standardization of proteolytic reactions. The South and Northeast regions had only one dairy producer of Coalho cheese, registered by the inspection agency, which produces this type of cheese with state or federal inspection seal, criteria adopted for the development of the study, and also, the raw material used originates from a set of regional producers. For this reason they are representative of the region in relation to sampling and sufficient to characterize and differentiate the regions. Dairy factories that produce artisanal cheeses, illegally, without inspections or certifications were not considered.

Chemical, physicochemical and technological properties analysis

Moisture (AOAC 926.08), fixed mineral residue (AOAC 935.42), fat in dry extract (AOAC 920.125), total protein (AOAC 920.123), total dry extract by difference and titratable acidity

(AOAC 920.124) were analyzed in triplicate, according to Association of Official Analytical Chemists (AOAC 2016). The pH was determined using the digital pH meter with glass electrode, calibrated with solutions of pH 7.00 and 4.01 (QUIMIS model). Measurements of instrumental color were performed, in triplicate, on the L*, a*, b* System, on a Colorquest XE colorimeter (HunterLab, Sunset Hills Reston, VA, USA), illuminant D65 and 10 ° observer, using the CIELAB system (CIE 1996). The water activity (a_w) was measured using Aqualab Series 4TE electronic water activity meter with accuracy of ± 0.015 and detection range of (0.03 to 1.0) a_w .

The Texture Profile Analysis (TPA) were performed in quintuplicate (Queiroga *et al.* 2013), with samples of 25x20 mm (high x diameter) using the Texture Analyzer TA.HD Plus (Stable Micro Systems, UK), with a 25 kg load cell (20 °C), preliminary tests were performed for the definition of the parameters. During the tests, the samples were compressed by a stainless steel parallel compression plate (100 mm), with double compression. The speeds of test, pre-test and return were of 2.0 mm/s, compression of 50 %, data acquisition rate of 200 points per second, and the response parameters analyzed were hardness, elasticity, cohesiveness and chewiness.

The melting capacity test was performed in triplicate with samples with 7x36 mm (high x diameter). These samples were placed in a Petri dish and submitted at 107 °C/7 minutes in an oven and kept for 30 minutes at room temperature (24 °C) (Machado *et al.* 2011). The diameter of the cheese was measured before and after heating, obtaining the initial diameter (D_i) and the final diameter (D_f), determined by average of the diameters measured for 4 different directions (45°). The melting capacity was calculated using the equation:

$$MC (\%) = \frac{(D_f^2 - D_i^2)}{D_i^2} \times 100 \%$$

Spectroscopic study

Middle Infrared

The spectra were obtained using Attenuated Total Reflection Fourier Transform (ATR-FTIR) Spectrometer, equipment model AgilentCary® 630 (Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA), in

the MIR region, 4000-600 cm^{-1} , with a resolution of 4 cm^{-1} , 64 scans with diamond crystal cell, under room temperature (24 °C). To the reading, each cheese it was grated in its external and internal portions, representing the entire sample, considering that there is no bark formation for this type of cheese. Were placed on the surface of the ATR diamond 1 g grated samples and pressed through the attached pressure clamp. Before each collection, a background spectrum reading was performed and each spectra was obtained in, approximately, 30 seconds being analyzed in duplicate. The maximum absorbance associated with the wavenumber range were used as variables for statistical analysis (Silva *et al.* 2020).

Near infrared

Spectra were collected using NIR Spectrometer (SpectraStar 2500XL, Unity Scientific, Brookfield, CT, USA) equipped with a tungsten halogen lamp as light source, an indium–gallium–arsenide (InGaAs) detector. For the analysis, 20 g of grated samples (external and internal portions) were placed in the sample container and scanned in the range of 1100-2500 nm at 1 nm intervals, under room temperature (24 °C). The signals were generated in reflectance (%R) mode and transformed into absorbance by using $\log 1/R$. The Unity InfoStar V3.11.3 software was used for spectrometer configuration, control, and data acquisition (Cattaneo *et al.* 2008; Cevoli *et al.* 2013).

Data analysis

The data were obtained using multivariate analysis and were organized in matrices ($m \times n$), m lines corresponding to the treatments and n columns related to the variables of interest. The matrices used were: chemical and physicochemical composition (matrix A_1), technological properties (matrix A_2), absorbance data of bands of MIR (matrix A_3) and NIR (matrix A_4). The data were standardized ($\mu=0$, $\sigma=1$, where μ : mean and σ : standard deviation) and for spectroscopic analysis, data were pre-processed using the Standard Normal Variate (SNV) in order to reduce non-linear deviations from the baseline, common in reflectance measurements (Alinovi *et al.* 2019). The

matrices were submitted to Principal Component Analysis (PCA) and Linear Discriminant Analysis (LDA), using the software Statistical Analysis System, Student version (SAS 2018).

PCA was performed to transforming the original set of variables into orthogonal axes, the principal components and identifying the measures responsible for the greatest variation in the results. It is an exploratory technique that allows the verification of the dispersion and the formation of groups according to the degree of similarity between the samples. The covariance matrices (S) was used and the number of Principal Components (PCs) was determined considering the criterion of interpretable factors, the eigenvalue diagram (screeplot) and the variance of the original data with representation >70 % (Silva *et al.* 2020).

LDA was used to discriminate and classify the samples based on the described data matrices. The matrices data were randomized with Kennard-Stone algorithm by the software Matlab 8.1 (Math Works Inc. Natick, USA). The cross-validation method was used, adequate for the number of samples used, in which there is no previous division of data in training and validation. The k-fold technique was applied to estimate the average validation error for the trained model. This technique randomly divided the set of data into k-folds, k-1 were used in the training phase and the rest in the test phase. For each subset of training, a new model was trained and validated and the predictive accuracy of the model was calculated using the validation error estimates, seeking to produce satisfactory and reliable generalization performance. To verify the efficiency of the LDA, the percentage of classification correctness was used, in which corresponded to the data correctly classified in their respective groups (Santos *et al.* 2017).

RESULTS AND DISCUSSION

Chemical, physicochemical and technological properties analysis

The results of chemical composition, physicochemical characteristics and technological properties of the studied cheeses by region are presented in Table 1.

Table 1. Analytical measures of coalho cheese by mesorregion from Bahia, Brazil

Parameters	A		B		C		D		
	Min-Max	Means \pm SD	Min-Max	Means \pm SD	Min-Max	Means \pm SD	Min-Max	Means \pm SD	
Chemical composition and Physicochemical characteristics	Moisture (g/100g)	42.65-49.40	45.13 \pm 1.0	37.46-46.79	46.31 \pm 1.2	45.18-46.79	46.65 \pm 0.9	40.11-51.34	44.03 \pm 1.4
	FMR (g/100g)	3.97-6.51	4.64 \pm 0.8	2.61-3.25	2.91 \pm 0.4	3.78-4.65	4.09 \pm 0.5	3.12-4.07	3.79 \pm 0.3
	TDE (g/100g)	50.60-57.34	54.87 \pm 1.0	50.16-56.58	53.69 \pm 0.9	48.66-54.81	53.34 \pm 0.9	57.95-62.54	59.96 \pm 1.9
	Protein (g/100g)	21.90-28.94	26.40 \pm 1.1	18.04-28.40	25.63 \pm 1.3	18.12-22.98	21.99 \pm 1.1	18.67-28.27	25.84 \pm 1.8
	Fat (g/100g)	47.71-49.38	48.85 \pm 0.9	54.75-60.01	59.33 \pm 1.2	39.22-47.26	46.62 \pm 0.8	48.36-53.92	52.21 \pm 1.9
	Lactic acid (g/100g)	0.11-0.18	0.15 \pm 0.0	0.17-0.25	0.18 \pm 0.0	0.07-0.12	0.09 \pm 0.0	0.08-0.17	0.14 \pm 0.0
	pH	6.03-7.06	6.41 \pm 0.3	5.79-6.87	6.03 \pm 0.4	6.35-7.09	6.75 \pm 0.3	6.49-6.80	6.65 \pm 0.5
	a _w	0.97-0.98	0.97 \pm 0.0	0.98-0.99	0.98 \pm 0.0	0.96-0.97	0.96 \pm 0.0	0.97-0.99	0.97 \pm 0.0
	a*	1.05-1.98	1.34 \pm 0.3	2.36-3.86	3.12 \pm 0.8	0.74-1.92	1.36 \pm 0.7	2.90-3.79	3.03 \pm 0.9
	b*	15.19-20.56	18.46 \pm 1.6	18.37-24.64	22.17 \pm 1.8	15.50-18.60	16.85 \pm 1.2	17.63-19.80	18.82 \pm 1.1
	L*	55.82-67.26	61.17 \pm 2.3	59.12-75.57	60.20 \pm 2.6	67.14-83.83	73.31 \pm 2.2	52.90-63.13	55.41 \pm 2.6
	Melting (%)	12.33-18.83	14.21 \pm 1.2	17.53-24.50	19.90 \pm 2.1	10.73-12.56	12.35 \pm 2.2	10.57-13.44	12.76 \pm 1.8
Technological Properties	Hardness (N)	16.01-22.47	18.06 \pm 2.0	9.92-15.93	10.26 \pm 1.5	14.52-19.53	17.51 \pm 1.4	14.97-18.02	16.36 \pm 1.6
	Cohesiveness	0.46-0.70	0.55 \pm 0.0	0.57-0.69	0.59 \pm 0.2	0.47-0.63	0.53 \pm 0.1	0.30-0.63	0.44 \pm 0.0
	Elasticity (mm)	7.64-8.62	8.18 \pm 0.3	6.15-7.94	6.96 \pm 0.6	7.93-8.70	8.21 \pm 0.7	7.72-8.56	8.12 \pm 0.5
	Chewiness (mJ)	68.26-91.20	77.86 \pm 3.6	31.78-47.46	38.66 \pm 3.5	68.78-97.20	82.34 \pm 3.6	56.20-89.48	64.74 \pm 3.3

A: South Mesoregion; B: Far West Mesoregion; C: Northeast Mesoregion; D: South Center Mesoregion; Min-Max=Minimum-Maximum values, SD: standard deviation FMR=fixed mineral residue; TDE=total dry extract; Fat expressed in dry extract; L*=brightness parameter; a*/b*=chromaticity coordinates. ST=standard deviation; a_w=water activity; Cohesiveness=Adimensional parameter.

An important variability was observed for most parameters evaluated in relation to Coalho cheeses in the studied regions, a behavior also observed for Coalho cheeses produced in the states of Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte and Ceará (Souza *et al.* 2014; Fontenele *et al.* 2017).

According to the legal parameters of identity and quality of Coalho cheese, they can be classified as medium to high moisture (36-54.9 g/100 g) and semi-fat to fat (35-60 g/100 g). The cheeses studied are in accordance with these classifications, although they presented a wide range of variation for the fat content and moisture, between 39.22-60.01 g/ 100g and 37.46-51.34 g / 100, respectively, with classifications of fatty and semi-fatty cheeses and medium to high moisture. Despite the difference in the features of the cheeses, which presented considerable variation, all met the recommended criteria (Brasil 2001).

The results of the analytical measures showed variations by geographic region, which occurred mainly in relation to chemical and physical-chemical aspects, with emphasis on the parameters of fat, pH, acidity, a_w and b^* value. The Northeast cheeses mesoregions presented the minimum values of fat and a_w while the Far West cheeses, maximum values. Regarding the pH value, the South, Center South and Northeast cheeses showed maximum pH values in relation to cheeses from the Far West (Table 1).

This variability probably occurred due to peculiar characteristics of the regions (biome) the cheeses came, as variations in the composition of the bovine milk used as raw material among the evaluated mesoregions, which is related to the breed of the animal, lactation stage, climate conditions (hot and humid, rainy or dry) and distinct botanical composition of the soil (forest, grass or cerrado areas) that affect the animals feeding, and, among other aspects, with the process of production, resulting in cheeses with distinct and often desirable characteristics, since it characterizes the *terroir* of this product.

The main differences between cheeses can be viewed in the infrared spectra, since the analytical measures can reflect on the absorption of specific functional groups, and be evidenced with the application of multivariate analyzes (Lei *et al.* 2019).

Spectral Characterization: MIR and NIR

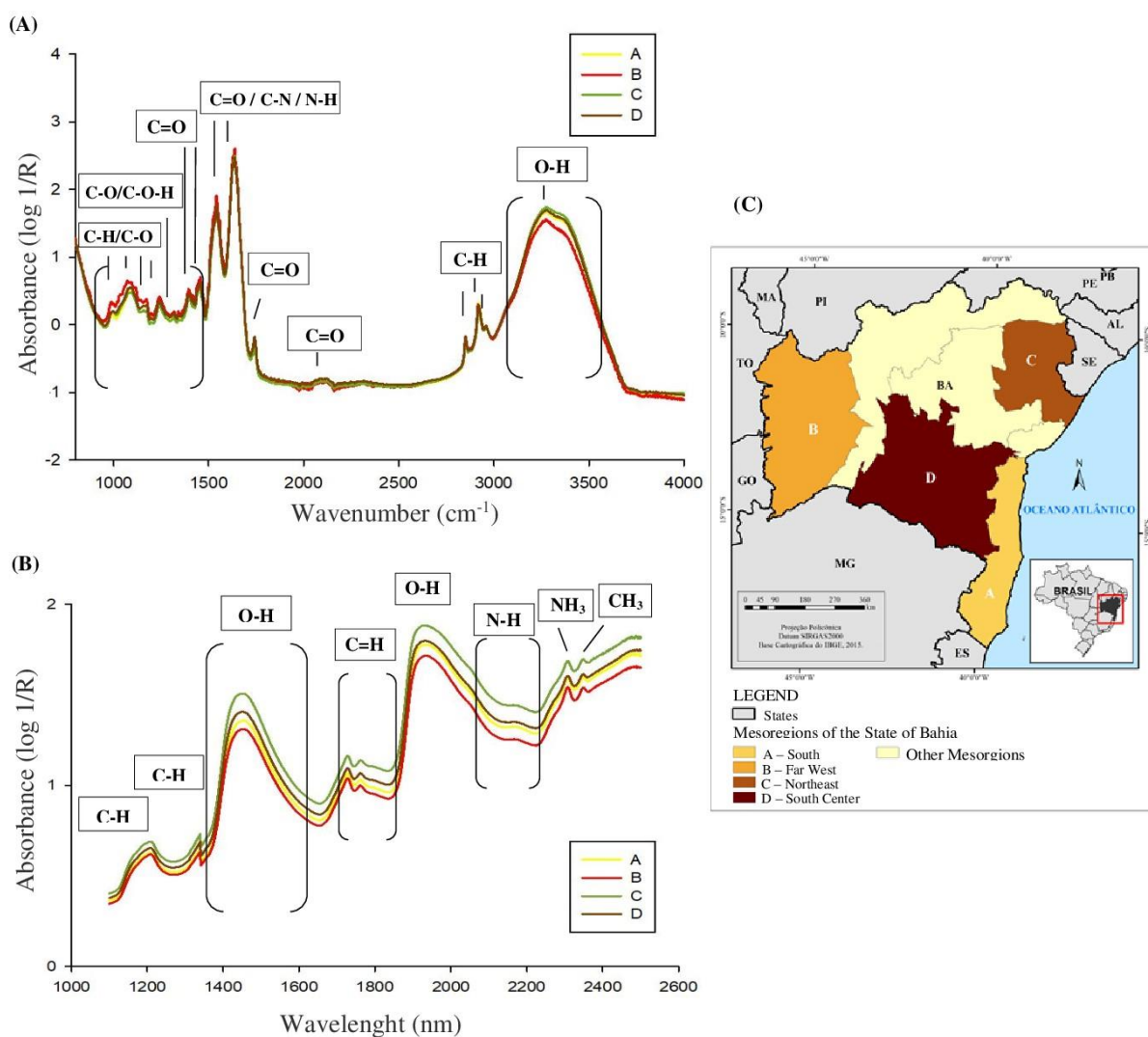
The spectroscopic profiles of Coalho cheeses were obtained in the region MIR and NIR. For the MIR was possible to identify, between 4000-600 cm^{-1} , 15 absorption bands (Andrade *et al.* 2018; Leite *et al.* 2019; Pax *et al.* 2019) and in the NIR region, 9 absorption bands were observed between 1100-2500 nm (maximum absorbance) that corresponded to absorption attributed to the vibrations of the functional groups (Figure 2) (Cevoli *et al.* 2013; Alinovi *et al.* 2019; Priyashantha *et al.* 2020). The intensity of the absorption of the bands reflect the amount of the component present in the analyzed product (Andrade *et al.* 2018), being possible to verify if there are differences between the spectra. It is clear that the differences between the cheeses by regions were best evidenced when the NIR was used.

In the spectra of MIR (Figure 2A), in 3245 cm^{-1} was observed a band of vibrations of the O-H, due to symmetric and asymmetric axial deformation, indicative of the presence of water (Leite *et al.* 2019), where the spectrum from the Far West and Northeast presented different intensities and those from the South and South Center showed similar behavior (Figure 2A). Between 1400-951 cm^{-1} were found vibrations of stretching of the C-H/C-O/C=O (fat) and in 1321 cm^{-1} , bonds C-O/C-OH (carbohydrates). Differences were observed in the intensity of the spectrum, lower intensity of samples of the Far West and greater intensity in those of the Northeast. The regions 1630-1540 cm^{-1} , related to stretching vibrations of the functional groups C=O/C-N and N-H/C-N, indicative of the proteins (Amides I-II) (Leite *et al.* 2019; Pax *et al.* 2019), showed no differences in intensity between samples.

In the NIR spectra (Figure 2B) the bands are usually wider, bell-shaped, less intense and more overlapping than in the MIR region, providing more complex structural information, for they can excite the combination of bonds vibrations and overtones with harmonic or anharmonic vibration, since the vibrational behavior of bonds at wavelength ranges (Cattaneo *et al.* 2008). Broad and intense bands were observed around 1453-1933 nm, related to the functional group O-H. Most of the bands obtained were associated with combinations of bonds vibrations and overtones of the

groups C-H and CH₃ related to fat, in 1210 nm, 1340 nm, 1728 nm, 1764 nm and 2349 nm, and two bands in 2174 nm and 2308 nm associated with groups N-H and NH₃ related to proteins (Amides/Amines) in cheese (Cevoli *et al.* 2013; Alinovi *et al.* 2019; Priyashantha *et al.* 2020).

Figure 2. Coalho cheeses spectra from the mesoregions of Bahia obtained by (A) MIR and (B) NIR; (C) Geographic location of Bahia mesoregions producing coalho cheese



According to Pasquini (2018) and Lei *et al.* (2019), among the existing non-destructive spectroscopic techniques, the NIR has been applied more than MIR for the analysis, determination and quantification of macronutrients or macro properties (such as fat, protein and water content) in

complex and heterogeneous samples such as cheese. This is because the absorption bands are combinations of fundamental vibrations and for this reason, their molar absorptivities are low and the detection limits are reduced and, therefore, has low sensitivity.

The difference between the cheeses was best observed, mainly between 1400-1650 nm (O-H), 1700-1850 nm (C-H) and 2100-2300 nm (NH). Throughout the spectral design, the spectrum of the Northeast region showed greater intensity of absorption, the spectrum of Far West less intensity, and that of South and South Center, more similar intensities, corroborating that the geographic location of these cheeses (Figure 2C) may reflect on their physicochemical characteristics and composition (Karoui *et al.* 2005; Alinovi *et al.* 2019). These spectral differences were evidenced, mainly, due to the regional characteristics of origin of each cheese, as observed by Cattaneo *et al.* (2008), who using the NIR, discriminated 39 Italian Bitto cheeses in relation to the characteristics of the places of origin (alps, mountains or plains).

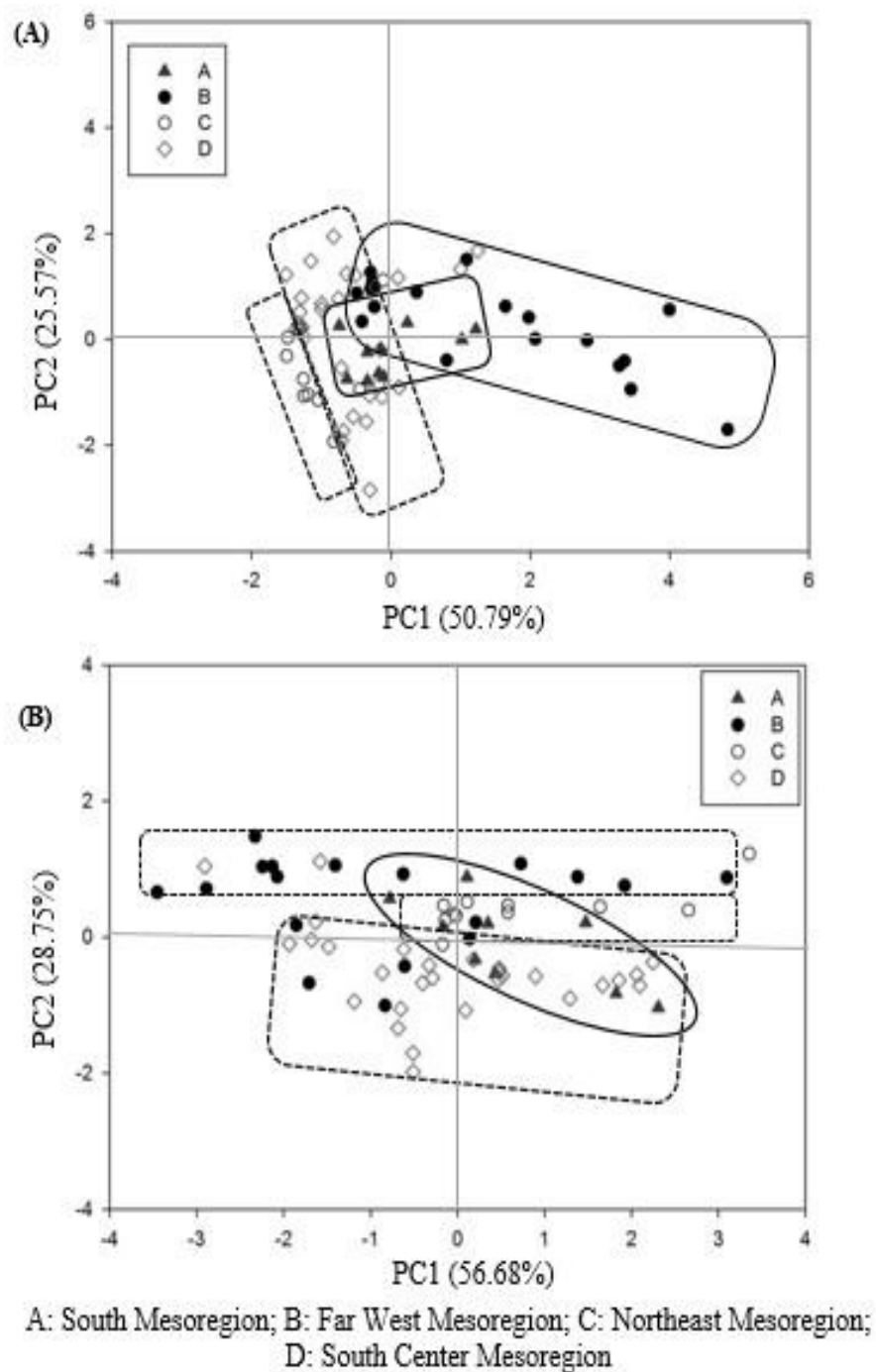
In this study, the Northeast presents typical characteristics of the “sertão” from Bahia, which exhibits peculiar climate and soil conditions, with low precipitation index and long periods of drought, which can affect the characteristics of the raw material used for cheese production. The South and South Center mesoregions present forest biomes in the coastal region and the caatinga, respectively, however, are located closer to each other, sharing similar rainfall and weather characteristics and their humidity and regularity of rainfall allow better conditions for feeding the animals, thus interfering the quality of milk and consequently on the physicochemical characteristics and technological properties of Coalho cheeses produced (Oliveira *et al.* 2012; Embrapa 2014; Fontenele *et al.* 2017).

Chemometric Analysis

Principal Component Analysis

For spatial separation of physicochemical and technological properties samples by PCA, only two PCs were needed to explain >75 % of the total variability of the original data for both groups of data, being effective in reducing its dimensionality (Figure 3).

Figure 3. Graphics of PCA scores from the (A) chemical composition and physicochemical characteristics and (B) technological properties of coalho cheeses from Bahia, Brazil



The results of the PCA showed that it was possible to form groups and discriminate samples by region, according to the composition, mainly for cheeses from the Northeast and Far West that presented in opposite quadrants (Figure 3A), where the variables: b^* (chromaticity coordinate), fat content and pH were important for this differentiation, because displayed a high correlation with PC1, 0.93, 0.67, -0.77, respectively. The a_w also presented variability that helped to separate the groups, but with less effect due to positive correlation (0.89) with PC2.

As for the contribution of PC1, the samples from the Northeast were presented exclusively in the left quadrant, due to a lower fat content, yellow color and higher pH (negative correlation) in relation to the Far West cheeses, especially, that have higher fat content, lower pH and a more yellow color and has the majority of its samples occupying the right quadrant, despite the observed dispersion. The cheeses from the South and South Center mesoregions were located in the center of the graph, it can be inferred that both have similar characteristics, although some samples share similar characteristics to the cheese produced in the Far West.

The a_w , pH, fat content and the b^* chromaticity coordinate are important for the characteristics of the cheese. The moisture interferes with a_w and its variations may be related to the quality of the raw material and to the processing, which involves handling the dough, cooking temperature that affect the process of expelling the whey from the curd (syneresis) in the cooking process, pressing time, among others. They can also influence biochemical parameters, such as the specific microbiota and the enzymatic activity of the cheese, interfering in the organoleptic properties, texture, pH and acidity (Machado *et al.* 2011).

The pH is a decisive factor in the quality and production of the cheese and can interfere in its functional properties such as melting and texture, and important features of Coalho cheese is its well-defined edges and non-melting. Cheeses with lower pH, close to the isoelectric point of caseins, may have less hardness/firmness and chewiness and greater cohesiveness due to greater interaction between proteins, and cheeses with higher pH may have a more hardened texture (Queiroga *et al.* 2013; Brasil 2001).

The b^* represents the intensity of the yellow color, a primary parameter for its acceptability and the color variation between the cheeses contributed to differentiate the samples. It is suggested that the b^* is related to the fat content, since β -carotene, pigmentation responsible for the color, is lipophilic and it has an affinity with the fat micelles. It can be inferred that cheeses with high fat content have a more yellow color, as it was observed with samples from the Far West (Queiroga *et al.* 2013).

Cheeses with high fat and a_w content may have less firm characteristics and less chewiness. The low fat content can lead to increased interaction between proteins, promoting a more dense matrix and, consequently, with greater cohesiveness, chewiness and hardness. Variations in a_w can also affect texture, as a higher water content in the form of pure water results in a softer cheese texture (Oliveira *et al.* 2012).

As for technological properties (Figure 3B), 85.4 % of the explanation of the original data was represented by only two PC, with PC1 significantly and positively related to hardness, chewiness and elasticity (0.91, 0.96, 0.67, respectively) and PC2 with cohesiveness (0.93).

The formation of groups was observed, but with greater dispersion, indicating that a lack of standardization in the production stages between the regions of origin, which may vary, with each batch or production day, reflecting on the dispersive behavior groups. The separation the samples occurred mainly due to the contribution of PC2, correlated with the cohesiveness, where the results pointed differences mainly for cheeses from Far West what showed greater cohesiveness than the others.

This is a reflection of pH values closer to the isoelectric point of the proteins of the cheeses in this region, which favoring the protein-protein interactions, greater strength between the internal bonds matrix and a high degree of aggregation and cohesiveness. In addition, the temperature used to the tests (20 °C) had an important role in the increase in cohesion, since it is possible that there was a large concentration of solid fats, in the form of crystals, in a way that the high fat content may have promoted an increase in cohesiveness, due to less lubrication of the protein matrix. Thus, the effect on the textural properties of the cheese was the result of the impact that both characteristics on the

interaction forces of the matrix and this may explain why it was not possible to observe the same dispersion of the samples in the graphs of composition (Figure 3A) and technological properties (Figure 3B).

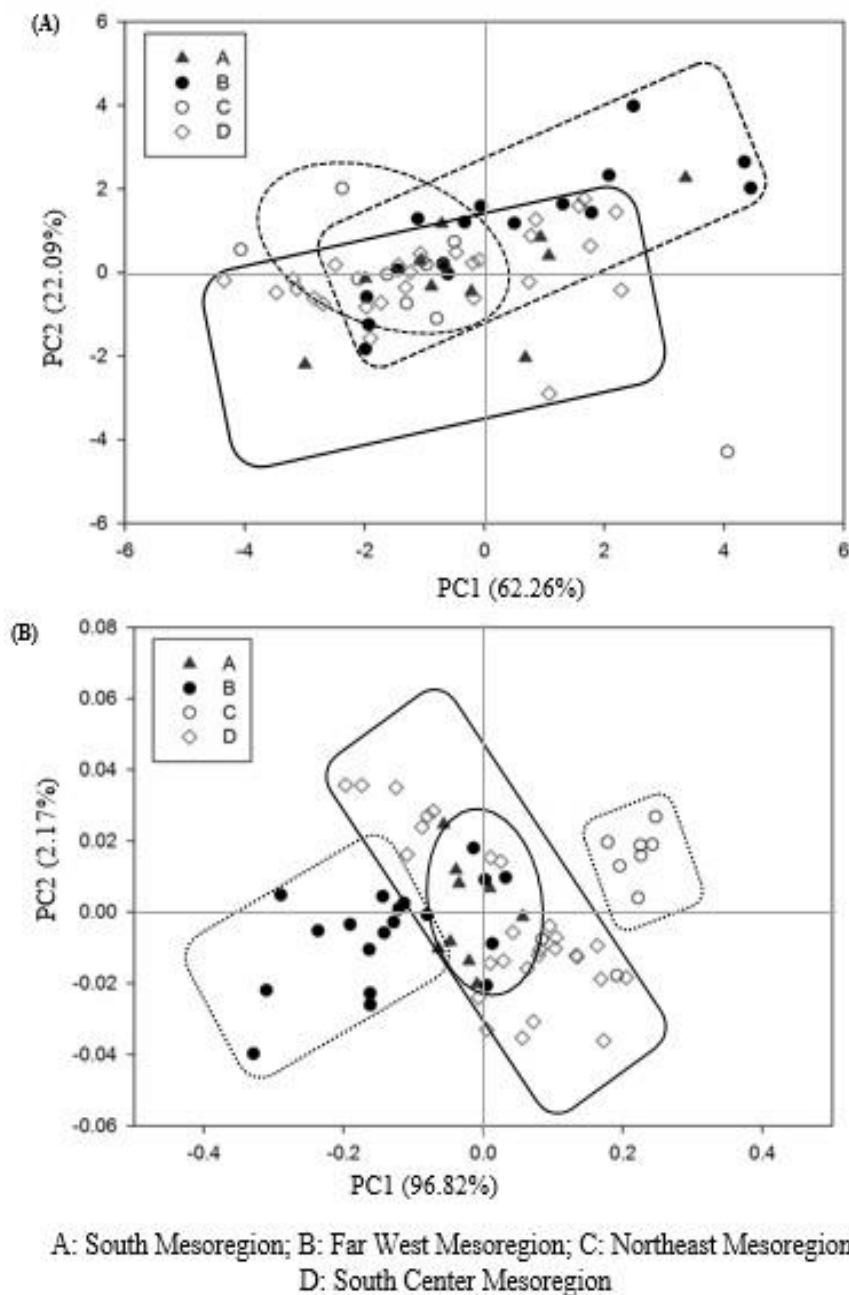
The results showed that samples from the Far West presented a higher percentage of fat, lower pH and greater cohesiveness, distancing from the samples from the Northeast region, which showed lower fat content, higher pH, lower a_w , however there was no great influence on the other technological properties, as observed in the graphic.

Applying PCA to the MIR and NIR spectrum (Figure 4) it was observed that the NIR promoted better separation between cheese from different regions (Figure 4B), confirming that this tool is promising for the evaluation of macro properties of heterogeneous samples and their discrimination (Lei *et al.* 2019).

Spatial separation of MIR was defined by 2 PCs (84.35%), using 13 main bands (Figure 4A). PC1 represented 62.26 % of the total variance and correlated with the regions bands 2945-1747 cm^{-1} (C=O/C-H), 1400-951 cm^{-1} (C-H/C-O/C=O) indicative of the presence of fat, and with the 3245 cm^{-1} band referring to the O-H. The PC2 showed a significant correlation with the functional groups referring to Amides I and II (C=O/C-N/N-H) around 1630-1540 cm^{-1} .

The results obtained showed that there was no formation of homogeneous groups of samples by region for this technique, being observed the large dispersion between the samples, which can be justified by multicollinearity, where fundamental molecular vibrations in the MIR may reflect information from all possible functional groups of bonds, and these may not be associated exclusively with the vibrational modes of a specific molecule, such as amide I, which can be related to the stretching of the carbonyl group and the C-N and to the angular deformation C-N-H, indicating that the analysis with MIR may be more adequate to identify functional groups in cheese samples (Lei *et al.* 2019; Pax *et al.* 2019).

Figure 4. Graphics of the PCA scores from absorbance of the spectrum bands in the MIR (A) and NIR (B) for the coalho cheeses from Bahia, Brazil



The use of NIR (Figure 4B) showed better discrimination and more evident separation between the cheeses by origin, behavior similar to that found by physical-chemical analyzes in the formation of groups. The spectral information of the NIR is generally distributed over the wide wavelength ranges, but sometimes all the information in the spectrum may not be correlated with the

investigated properties (Priyashantha et al. 2020). For this analysis, at first, the entire NIR spectrum (between 1100-2500 nm) was used for the discrimination of the samples, considering the contribution of the different spectral regions and their respective functional groups. However, 3 main spectral regions were used: 1400-1650 nm (O-H), 1700-1850 nm (C-H) and 2100-2300 nm (N-H), and two important criteria were used for that choice. First, these 3 regions are associated with the main components of cheese (fat, protein and water content) which may vary more in relation to origin and / or production processes, for example. Second, the visual analysis of the spectra was also performed and greater variation between these spectral regions was observed, because introducing other regions brought noises and made it difficult to detect differentiation by region. Thus, these specific regions reflected even better the cheeses characteristics and better discrimination was observed. Two PCs (98.99 %) were needed to explain the data variability and all variables used being significantly correlated with PC1 (96.82 %).

The Northeast, Far West and South cheese differentiated between them, occupying different regions in the PCA graph. Due to differences between biomes, climatic conditions and soils in animal production systems, as in the Northeast, Far West and South regions, the composition of the bovine milk used for cheese production may differ, leading to different characteristics in the final product. Cheeses from the South and South Center, regions with more similar soil-climatic conditions, occupied the central region of the graph by PCA, indicating similar spectral behavior, mainly due to the bands related to the hydroxyl vibration, of the water and C-H bonds of the fat (Cevoli *et al.* 2013; Alinovi *et al.* 2019).

The regional characteristics and particularities in processing can affect the fat content and its respective bands in spectral regions, reflecting on the composition and structure of the cheeses, such as dry weather and low frequency of rainfall in the Northeast. Differences in pressing time, cooking time and temperature of the cheese dough that affect the process of syneresis of curd are closely related with the water content, a_w and their respective bands in spectral regions, which also reflects in the characteristics of the cheeses, enabling to group them by region (Embrapa 2014). These

results indicate that with PCA it was possible to identify differences between Coalho cheese by regions and confirm the importance of variables a_w and fat in the discrimination capacity.

Linear Discriminant Analysis

In order to test the accuracy of the analyzes for the distribution of cheeses the LDA was applied. Table 2 shows the percentage of correct classifications for the samples by regions according to the data of the analytical measures and the absorbance of the spectra of MIR and NIR.

The training capacity and validation were verified according to the functions obtained and the classification rate. The discriminant functions generated were able to provide the variables that most influenced the discrimination of cheeses according to their origin. For the composition data matrix, pH, fat and a_w were the ones that most influenced the discrimination of the samples, as well as in the PCA, with classification rate varied of training between 70.97 %-100 %, and the validation rate between 61.29 %-95.00 %, with the Far West, South and Northeast mesoregions having higher classification rates. For technological properties, the Northeast stood out with the highest classification rate for both training and validation, and the variables hardness and chewiness were determinant for this discrimination.

Table 2. Classification of the coalho cheeses origin by mesorregion regarding chemical and physicochemical characteristics, technological properties and spectral data (MIR and NIR) by applying LDA functions.

	Classification rate (T/V)			
	South (n=10)	Far West (n=20)	Northeast (n=10)	South Center (n=30)
Composition	90.00%/80.00%	100.00%/95.00%	80.00%/70.00%	70.97%/61.29%
Technological Properties	60.00%/40.00%	50.00%/40.00%	100.00%/90.00%	64.52%/61.29%
MIR	90.00%/50.00%	80.00%/65.00%	100.00%/80.00%	80.65%/61.29%
NIR	90.00%/90.00%	70.00%/80.00%	90.00%/90.00%	77.42%/70.00%

With MIR, rates of classification between 50 % and 80 % in validation were obtained, and Northeast cheeses (80 %) also presented better discrimination, with the most important variables for discrimination the bands between 2915-1747 cm^{-1} , 1400 cm^{-1} , 1170-971 cm^{-1} related to the vibration of the functional groups C-H, C=O, C-H/C-O, respectively, indicative of the presence of fat.

As with the PCA, with NIR spectroscopic analysis, it was possible to verify a better discrimination between the groups, especially in the spectral regions of: 1400-1650 nm, 1700-1850 nm and 2100-2300 nm, associated with overtones and combination vibrations of the O-H, C-H and N-H bonds, respectively. Based on the coefficients of the generated discriminant functions, it was observed that the bands related to the functional groups associated with fat and water were responsible for the discrimination of the Coalho cheese by producing regions, with the classification rate between 70 %-90 %, where cheeses from the Northeast (90 %), South (90 %) and Far West (80 %) showed better discrimination, regions of different biomes such as the “sertão”, rainy coastline and Brazilian savannah (cerrado), respectively, characteristics that can interfere in the composition of milk and cheeses, making them different from each other.

Thus, the LDA is a good alternative to discriminate cheeses according to the regions of origin, since it has a good capacity to identify and differentiate previously unknown samples (Santos *et al.* 2017), making it possible to consider the use of spectroscopic analysis, especially the NIR, which presented a better classification rate, replacing the other analysis, since the chemical characteristics of Coalho cheese reflected in spectral data.

CONCLUSIONS

The results obtained in this study demonstrated that the spectroscopic technique proved to be efficient in the discrimination of Coalho cheeses from different origins. PCA and LDA were able to

demonstrate difference between the cheeses, and the Northeast, Far West and South samples were different. The variables pH, a_w , fat content and functional groups indicative of the presence of water and fat were decisive in differentiating between samples from different regions. The use of NIR spectroscopy was more efficient in the capacity to discriminate samples, demonstrating a potential to help in the identification of previously unknown samples, since the chemical characteristics of Coalho cheese were reflected in spectral data.

Despite the limited number of samples, satisfactory results in terms of cheese classification were obtained and this work provides an alternative for the fast classification and discrimination of Coalho cheese from different producer regions and it could contribute for Coalho cheese authenticity, enhancing their aggregate value.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge the “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)” and “Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB)” for providing study scholarships.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

DATA AVAILABILITY

Research data are not shared

AUTHOR CONTRIBUTION INDICATION

Larissa Kaully Rosa Silva: Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Project administration, Writing-original draft. **Josane Cardim de Jesus:** Data curation, Investigation.

Rebeca Rodrigues Vieira Onelli: Data curation, Investigation. **Daniele Gomes Conceição:** Data

curation, Investigation. **Leandro Soares Santos:** Conceptualization, Formal analysis, Supervision. **Sibelli Passini Barbosa Ferrão:** Conceptualization, Supervision, Project administration, Writing-review & editing.

REFERENCES

- Alinovi M, Mucchetti G and Tidona F (2019) Application of NIR spectroscopy and image analysis for the characterisation of grated Parmigiano-Reggiano cheese. *International Dairy Journal* **92** 50-58.
- Andrade J, Pereira C G, Ranquine T, Azarias C A, Bell M J V and Anjos V C (2018) Long-Term Ripening Evaluation of Ewes' Cheeses by Fourier-Transformed Infrared Spectroscopy under Real Industrial Conditions. *Journal of Spectroscopy* **2018** 1-9.
- AOAC (2016) *Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis*, 18th ed, Washigton, DC: AOAC International.
- Brasil (2001) Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Manteiga da Terra ou Manteiga de Garrafa; Queijo de Coalho e Queijo de Manteiga. Diário Oficial da União. Instrução Normativa Nº 30, de 26 de junho de 2001 [Internet document] URL <https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/legislacoes/instrucao-normativa-n-30-de-26-de-junho-de-2001,1039.html>. Accessed 30/08/2020.
- Cattaneo T M P, Tornelli C, Erini S and Panarelli E V (2008) Relationship between sensory scores and near infrared absorptions in characterising Bitto, an Italian protected denomination of origin cheese. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* **16** 173-178.
- Cevoli C, Gori A, Nocetti M, Cuibus L, Fiorenza M C and Fabbri A (2013) FT-NIR and FT-MIR spectroscopy to discriminate competitors, non-compliance and compliance grated Parmigiano Reggiano cheese. *Food Research International* **52** 214-220.
- CIE (1996) *Commission Internationale de L'Éclairage. Colorimetry*. 2nd ed Vienna, Áustria: CIE.

Embrapa (2014) Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Características predominantes de bioma, clima, relevo e solos nos estados do Maranhão, Tocantins, Piauí e Bahia [Internet document] URL <https://www.embrapa.br/en/international> Accessed 30/08/2020.

Fontenele M A, Bastos M S R, Santos K M O, Bemquerer M P and Egito A S (2017) Peptide profile of Coalho cheese: A contribution for Protected Designation of Origin (PDO). *Food Chemistry* **219** 382-390.

Gonçalves B R F, Silva G J, Jesus J C, Conceição D G, Santos L S and Ferrão S P B (2020) Fast Verification of Buffalo's Milk Authenticity by Mid-Infrared Spectroscopy, Analytical Measurements and Multivariate Calibration. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **00** 1-8.

IBGE (1990) *Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Divisão regional do Brasil em mesorregiões e microrregiões geográficas*, 1st edn, pp 137. Rio de Janeiro, Brasil: IBGE Press.

IBGE (2018) Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa Pecuária Municipal [Internet document] URL <https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/ppm/quadros/brasil/2018>. Accessed 30/08/2020.

Jesus J C, Silva G J, Gonçalves B R F, Souza M R, Santos L S and Ferrão S P B, (2020) Quick Identification of the Time of Maturation of Artisanal Minas Cheese by FTIR-ATR Spectroscopy and Multivariate Techniques. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **00** 1-12.

Karoui R, Dufour E, Pillonel L, Schaller E, Picque D, Cattenoz T and Bosset J (2005) The potential of combined infrared and fluorescence spectroscopies as a method of determination of the geographic origin of Emmental cheeses. *International Dairy Journal* **1** 287-298.

Lei T and Sun D W (2019) Developments of Nondestructive Techniques for Evaluating Quality Attributes of Cheeses: A Review. *Trends in Food Science & Technology* **88** 527-542.

Leite A I N, Pereira C G, Andrade A, Vicentinic N M and Bella M J V (2019) FTIR-ATR spectroscopy as a tool for the rapid detection of adulterations in butter cheeses. *LWT - Food Science and Technology* **109** 63-69.

Machado G M, Costa R G B, Costa Junior L C G, Sobral D, Taveira L B and Souza B M (2011) Aspectos físico-químicos de queijo de coalho fabricado com o uso de ácido láctico. *Alimentos e Nutrição* **22** 421-428.

Oliveira E M G, Garcia E F, Queiroga R C R E and Souza E L (2012) Technological, physicochemical and sensory characteristics of a Brazilian semihard goat cheese (coalho) with added probiotic lactic acid bacteria. *Scientia Agricola* **69** 370-379.

Pasquini C (2018) Near infrared spectroscopy: A mature analytical technique with new perspectives - A review. *Analytica Chimica Acta* **1026** 8-36.

Pax A P, Ong L, Vongsivut J, Tobin M J, Kentish S E and Gras S L (2019) The characterisation of Mozzarella cheese microstructure using high resolution synchrotron transmission and ATR-FTIR microspectroscopy. *Food Chemistry* **291** 214-222.

Priyashantha H, Hojer A, Saeden K H, Lundh A and Johansson M J (2020) Use of near-infrared hyperspectral (NIR-HS) imaging to visualize and model the maturity of long-ripening hard cheeses. *Journal of Food Engineering* **1** 679-687.

Queiroga R C R E, Santos B M, Gomes A M P, Monteiro M J, Teixeira S M, Souza E L, Pereira C J D and Pintado M M E (2013) Nutritional, textural and sensory properties of Coalho cheese made of goats', cows' milk and their mixture. *LWT - Food Science and Technology* **50** 538-544.

Santos L S, Cardozo, R M D, Nunes, N M, Inácio A B, Pires A C S and Pinto M S (2017) Easy classification of traditional Minas cheeses using artificial neural networks and discriminant analysis. *International Journal of Dairy Technology* **70** 1-7.

Sara S, Davide P, Domenico V, Lucio C and Patrizia P (2018) Determining the authenticity of PDO buffalo mozzarella: an approach based on Fourier Transform Infrared (MIR-FTIR) spectroscopy and on chemometric tools. *International Journal of Latest Research in Science and Technology* **7** 1-6.

SAS (2018) Statistical Analysis System, Student version; SAS Institute Inc., USA.

Silva L K R, Gonçalves B R F, Hora F F, Santos L S and Ferrão S P B (2020) Spectroscopy Method (FTIR-ATR) and chemometric tools to detect cow's milk addition to buffalo's milk. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* **19**:11-20.

Sousa A Z B, Abrantes M R, Skymoto S M, Silva J B A, Lima O P, Lima R N, Rocha M O C and Passos Y D B (2014) Aspectos físico-químicos e microbiológicos do queijo tipo coalho comercializado em estados do nordeste do Brasil. *Arquivos do Instituto Biológico* **81** 30-35 (2014).

Capítulo IV

Artigo 2

Espectroscopia (MIR) e cromatografia (RP-HPLC) aplicadas em peptídios solúveis para discriminação da origem geográfica de queijo Coalho

Title Page

Espectroscopia (MIR) e cromatografia (RP-HPLC) aplicadas em peptídeos solúveis para discriminação da origem geográfica de queijo Coalho

Larissa K. R. Silva^{a,b}, Josane C. Jesus^b, Rebeca R. V. Onelli^b, Daniele G.

Conceição^b, Leandro S. Santos^b, Sibelli P. B. Ferrão^{b*}

^a Center for Biological and Health Sciences, Federal University of Western Bahia, University Campus of Barreiras, 47810-047, Bahia, Brazil

^b Program in Food Engineering and Science, State University of Bahia Southwest, University Campus of Itapetinga, 45700-000, Bahia, Brazil

* Corresponding author:

Sibelli Passini Barbosa Ferrão

Email adress: sibpass@yahoo.com.br

Destaques

- A espectroscopia e cromatografia foram eficientes para discriminar origem de queijo

Coalho;

- Avaliação proteômica junto a quimiometria se mostraram robustos para classificar a origem dos queijos;

- Cinco peptídeos marcadores foram obtidos por RP-HPLC

- O MIR revelou que as amidas evidenciaram diferenças entre os peptídeos por região

RESUMO

Objetivou-se discriminar queijo Coalho de acordo com a sua origem com base em perfis peptídicos, utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC) e espectroscopia no infravermelho médio (MIR) associados a Análise de Componentes Principais (ACP) e Redes Neurais Artificiais (RNA). Os peptídeos solúveis foram extraídos de queijos Coalho obtidos de quatro diferentes mesorregiões da Bahia, Brasil, oriundos de sete laticínios distintos. Foram obtidas 70 amostras coletadas com até 10 dias de fabricação e congeladas com 20 dias até as análises por RP-HPLC e MIR. RP-HPLC indicou cinco peptídeos marcadores para diferenciação dos queijos e o MIR revelou perfis espectroscópicos das amidas com absorções distintas, variando conforme a origem geográfica. Para ambas as técnicas, ACP discriminou corretamente os perfis peptídicos e os modelos de RNA foram eficientes na classificação correta de todos queijos em seus respectivos grupos na validação, associados a baixas taxas de erro ($RMSEV_{RP-HPLC}=0,0165$, $RMSEV_{MIR}=0,0488$). Os resultados mostraram que RP-HPLC e MIR são úteis na discriminação de origem queijo Coalho e o MIR apresentou-se como uma alternativa de menor custo operacional, rápida, eficiente e robusta para esta investigação.

Keywords: proteômica, produtos lácteos, análise multivariada, infravermelho médio, indicação geográfica, quimiometria.

1. Introdução

O queijo Coalho é um queijo não maturado, produzido com leite bovino integral pasteurizado, coagulado enzimaticamente, sem adição de culturas iniciadoras, de massa cozida, comercializado com até 10 dias de fabricação (Brasil, 2001). A origem do queijo tem relação com vários fatores como a localização geográfica, condições climáticas, do

solo, aos processos e tecnologias utilizadas e questões locais que podem atribuir um conjunto de características ao produto que se referem à essência territorial, podendo gerar peptídeos específicos ao produto acabado (Silva et al., 2016; Jabri et al., 2020). É um produto de alto valor comercial e socioeconômico, sendo um dos mais populares queijos brasileiros originados do Nordeste, que ocupa uma posição de destaque devido à sua versatilidade e aceitabilidade (Fontenele et al., 2017).

O estudo do perfil de peptídeos de queijos regionais, como o Coalho, é importante para garantir uma maior valorização do produto, permitir o desenvolvimento regional através da agregação de valor e também proteger os interesses dos produtores e consumidores. A autenticidade tem se mostrado importante em relação à segurança e qualidade de alimentos e o interesse do consumidor por produtos tradicionais de uma região vem crescendo nos últimos anos, demonstrando que a discriminação de sua origem vem apresentando papel relevante na rastreabilidade do produto (Santos et al., 2017). Assim, a realização da análise proteômica associada a estudos analíticos são etapas importantes para a autenticação do produto e contribuição para uma possível obtenção de Denominação de Origem Protegida (DOP) (Dias et al., 2019).

Os peptídeos têm sido amplamente utilizados como marcadores de espécies ou de fraude em queijos e a aplicação destes para identificar a origem e autenticidade dos produtos também tem ganhado destaque (Guerreiro et al., 2013; Pax et al., 2019). Técnicas analíticas como cromatografia, eletroforese e espectrometria de massas já foram utilizadas para a investigações da autenticidade, identificação de origem e a obtenção de DOP em queijos (Silva et al., 2016), no entanto, poucos são os estudos abordando o perfil peptídico de queijo Coalho por meio da cromatografia e a espectroscopia no infravermelho médio (MIR).

O MIR é uma técnica que tem sido utilizada para avaliar micropropriedades de alimentos, que apresenta vantagens, como a fácil execução, rapidez e custos reduzidos, devido a não necessidade do uso de reagentes e precisão na obtenção dos resultados, especialmente, quando associada à análise multivariada (Glassford et al., 2013; Leite et al., 2019).

Já a avaliação de perfis peptídicos de queijos utilizando análises cromatográficas em fase reversa (RP-HPLC) para a investigação da sua autenticidade já foi realizada em queijos como Cheddar (Parente et al., 2012), Terrincho, Serra da Estrela, Nisa, Évora, Serpa (Guerreiro et al., 2013), Parmigiano-Reggiano (Sforza et al., 2012) e Coalho de Pernambuco (Silva et al., 2016; Fontenele et al., 2017). No entanto, apesar da boa sensibilidade da técnica, o RP-HPLC apresenta custo elevado, requer o preparo das amostras e demanda longos períodos na condução das análises.

A técnica de MIR já foi aplicada para identificação de proteínas e peptídeos em alguns queijos como Muçarela (Sara et al., 2018), Gouda, Pecorino (Andrade et al., 2018) e Cheddar (Wang et al., 2011) com o objetivo de avaliar a autenticidade e o estágio de maturação. Estudos abordando a discriminação da origem geográfica utilizando perfis peptídicos em queijos ainda são escassos, principalmente em queijos Coalho e com a aplicação do MIR. Assim, objetivou-se discriminar a origem de queijos Coalho de diferentes locais do Nordeste do Brasil por meio do perfil peptídico identificado por técnicas espectroscópica (MIR) e cromatográfica (RP-HPLC), associadas a análises multivariadas.

2. Material e Métodos

2.1. Origem das amostras

Após a realização do mapeamento geográfico das indústrias de laticínios produtores de queijo Coalho no Estado da Bahia (Brasil) com Selo Inspeção Estadual (SIE) pela Agência de Defesa Agropecuária da Bahia (ADAB) ou com Selo de Inspeção Federal (SIF) pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) foram obtidas as amostras utilizadas para esta pesquisa.

Foram consideradas as mesorregiões oficiais da Bahia, classificadas pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 1990) com base nos aspectos econômicos, culturais, climáticos e de bioma do Estado.

As amostras foram coletadas entre janeiro de 2018 e junho de 2019 de um total de sete laticínios produtores sob inspeção oficial, distribuídos nas mesorregiões produtoras identificadas: Sul (n=10), Extremo Oeste (n=20), Nordeste (n=10) e Centro Sul (n=30), totalizando n=70 unidades experimentais, em que foram coletadas 10 amostras de cada laticínio, com diferentes lotes e prazos de validade, sendo que o Sul e Nordeste possuíam apenas um laticínio produtor de queijo Coalho cadastrado nos órgãos fiscalizadores, critério adotado para o desenvolvimento do estudo. Não foram consideradas os laticínios que produziam queijos sem fiscalização ou certificação.

Os queijos foram coletados de forma individual e periódica, de forma a atingir a produção anual e variações sazonais, garantindo a repetibilidade do experimento. Foram obtidas amostras em barras de 500g, embaladas a vácuo e com até 10 dias de fabricação, transportadas em caixas térmicas e mantidas sob refrigeração (6 °C) por até 20 dias, quando foram congeladas a -20°C e mantidas até o momento das análises, para padronização de reações proteolíticas.

2.2. Extração dos peptídeos solúveis em água (PSA)

Os PSA foram extraídos de acordo com metodologia adaptada de Gonçalves et al. (2016). Amostras de queijo Coalho raladas (10g) foram homogeneizadas em 50 mL de água ultrapura (Milli-Q, Millipore Corp., Bedford, MA, USA) utilizando mesa agitadora (Q226K, Quimis, Diadema, SP, Brasil) a 200 rpm por 1 hora. Os extratos contendo os PSA foram centrifugados (Sorvall, Newtown, CT, USA) por 3 vezes, por 20 minutos cada centrifugação, a 4000g e $4^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$. O sobrenadante foi filtrado após cada centrifugação, em papel filtro quantitativo (Whatman n° 41, Cytiva, São Paulo, SP, Brasil) e os extratos contendo PSA foram congelados em ultrafreezer (modelo Alfa Mare, Uberaba, MG, Brasil) a $-80^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 horas e liofilizados (liofilizador Terroni, modelo LV 2000, Brasil) a $-30^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ e 0.040 mBar por 72h. Após a liofilização, os extratos de PSA foram estocados a $-20^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$.

2.3. Análise cromatográfica

A metodologia utilizada foi descrita por Ong et al. (2007) com modificações. Os extratos de PSA liofilizados foram submetidos à cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (RP-HPLC) utilizando uma coluna C18 (ZORBAX Eclipse Plus C18; 250x4.6mm de diâmetro interno, 5 mm de tamanho de partícula), acoplada a uma pré-coluna (ZORBAX SB-C 18, 4,6mm ID x 12,5mm, 5 μm), conectada ao sistema HP Agilent 1260 Infinity II. Foram utilizadas duas fases móveis, a primeira (A) composta de uma solução de acetonitrila (5%, V/V) (RIEDEL-DE-HAEN) e ácido trifluoroacético (0,1%, V/V) (Dinâmica LTDA) e a segunda fase (B) formada por acetonitrila (50%, V/V) e ácido trifluoroacético (0,1%, V/V). Uma alíquota de 20 μL da amostra foi injetada automaticamente na coluna a um fluxo de 1mL/min na forma de gradiente das fases móveis A e B durante 70 minutos. A análise iniciou com o fluxo de 100% da fase

móvel A e decresceu linearmente durante 60 minutos até que 100% do fluxo fosse representado pela fase B, de 60 a 65 minutos um novo gradiente linear foi realizado de maneira a estabelecer o fluxo a 100% de A que foi mantido até o final da análise (70 minutos). A temperatura da corrida foi mantida a 30°C, a detecção dos peptídeos foi realizada a 215nm em um detector UV-Vis e para avaliação dos cromatogramas foram considerados o tempo de retenção das frações, a área dos picos e seus espectros de UV.

2.4. Análise espectroscópica por MIR

Os extratos de PSA liofilizados foram analisados por MIR em espectrômetro Infravermelho com Transformada de Fourier com Reflexão Total Atenuada (FTIR-ATR) AgilentCary® 630 (Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA) e os espectros foram obtidos na região de 4000-600cm⁻¹, resolução de 4cm⁻¹, 64 scans com célula de cristal de diamante, sob temperatura ambiente (± 24 °C). Para a leitura, 0,5g de cada amostra foi depositada na superfície do diamante ATR e pressionadas por meio da braçadeira de pressão anexa. Após cada coleta, a leitura do espectro de *background* foi realizada e cada espectro foi obtido em aproximadamente, 30 segundos, sendo realizado em duplicata. Utilizou-se o *Agilent MicroLab PC Software*® e as máximas absorbâncias foram utilizadas como variáveis para a análise estatística multivariada.

2.5. Análise Estatística Multivariada

2.5.1. Tratamento de dados

Os dados foram organizados em matrizes $m \times n$ (linhas x colunas): onde m representa os tratamentos e n as variáveis de interesse. Foram utilizadas os dados correspondentes ao percentual de área de cada pico de interesse associado ao tempo de retenção obtido por RP-HPLC (matriz A) e aos dados de absorbância das bandas do MIR (matriz B). Foram

realizadas a Análise de Componentes Principais (ACP) utilizando o software Statistical Analysis System, Student version (SAS 2018) e as Redes Neurais Artificiais (RNA) com o Java Neural Network 1.1 (Wilhelm-Schickard-Institute, Tübingen, Alemanha), baseado no Stuttgart Neural Network Simulator (SNNS) (Fisher, 2001) . Para a análise dos dados obtidos por MIR, os mesmos foram pré-processados por meio da suavização por segunda derivada para reduzir os desvios não lineares de linha de base (Glassford et al., 2013).

2.5.2 Análise de Componentes Principais

ACP é uma técnica exploratória utilizada com o objetivo de verificar as similaridades entre as amostras e de identificar a formação de possíveis grupos pela observação direta do gráfico bidimensional (Jesus et al., 2020). Foi aplicada aos dados do MIR e RP-HPLC por apresentarem inúmeras variáveis que dificultam o emprego de estatística univariada ou a análise visual, sendo preciso reduzir a dimensionalidade dos dados, com mínima perda de informação, o que não é possível utilizando dados originais. Os dados foram padronizados ($\mu = 0$, $\sigma = 1$, onde μ : média e σ : desvio padrão) e um novo sistema de coordenadas com eixos ortogonais foi criado, originando os componentes principais (CP). A matriz de covariância (S) foi utilizada, obtendo-se os autovalores e seus respectivos autovetores normalizados, dando origem aos CP's, que foram determinados considerando o critério de fatores interpretáveis, o diagrama de autovalores (screeplot) e a variância dos dados originais >70% (Silva et al., 2020). A ACP foi utilizada para verificar as variáveis mais importantes e selecionar as que contribuíram significativamente com a discriminação das amostras, sendo avaliadas com base em sua correlação com os CPs e significância ($p < 0,001$) e de acordo com a soma dos quadrados (*somaquad*) dos escores do CP1 e CP2 e aquelas que apresentaram menor correlação e

menor *somaquad* foram excluídos, até se obter as variáveis mais significativas. Foram identificadas as semelhanças e diferenças entre as amostras e os possíveis clusters por meio da observação direta do gráfico de scores.

2.5.3. Redes Neurais Artificiais

A RNA foi aplicada para classificar os dados e otimizá-los por meio do processo de aprendizagem das redes a partir de dados reais, capturando relações funcionais entre variáveis de entrada e saída (Silva et al., 2020). Foi realizada a partir dos dados selecionados pelo algoritmo Kennard-Stone, divididos em 70% para o treinamento e 30% para validação, e normalizados de acordo a Equação 1.

$$y = \frac{x_1 - x_2}{x_3 - x_2} \quad \text{Equação 1}$$

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

Foi aplicada a metodologia de redes supervisionadas Perceptrons Multicamadas, capaz de classificar as amostras e solucionar problemas de altos graus de não-linearidade, para identificar as classes específicas que os queijos pertenciam. Foi aplicada a função de ativação tangente hiperbólica (tanh) em todos os neurônios, conexões feed-forward e algoritmo de treinamento Resilient Propagation que tornou o processo de convergência mais eficiente e robusto (Conceição et al., 2019).

Os modelos de redes foram treinados aplicando 500 ciclos, divididos em 50 iterações, correspondentes às amostras da fase de treinamento. A entrada da rede foi construída pelo conjunto de dados normalizados, foram testados de 10 a 50 neurônios na camada intermediária e utilizadas 4 variáveis de saída (A: Sul, B: Extremo Oeste, C: Nordeste, D: Centro-Sul), construídas por uma matriz identidade correspondente aos grupos estudados (1,0,0,0). Foram testadas 10 diferentes arquiteturas e escolhida a melhor

rede. O sucesso do modelo de classificação foi avaliado de diferentes formas: (a) pela capacidade de classificação, de acordo com o percentual de acertos e (b) pela minimização do Root Mean Square Erros nas etapas de treinamento (RMSET) e validação (RMSEV), Equação 2.

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

3. Resultados e Discussão

3.1. Análise cromatográfica

O perfil peptídico obtido por RP-HPLC apresentou um total de 28 picos (Figura 1S, Arquivo Suplementar) (Tabela 1), observado em todas as amostras avaliadas, com o mesmo tempo de retenção e o mesmo espectro UV (*fingerprint*). As principais diferenças entre os cromatogramas das amostras de PSA dos queijos foram mais evidentes em 14 picos.

Peptídeos separados por RP-HPLC ocorrem por diferença de polaridade e eluem de acordo com a sua afinidade pela coluna. Aqueles que eluem na porção inicial da corrida cromatográfica, em menor tempo de retenção, correspondem àqueles mais polares, mais hidrofílicos, enquanto que aqueles com maior tempo de eluição indicam menor polaridade e maior hidrofobicidade (Picon et al., 2007),

De maneira geral, os picos 2, 3, 5, 6, 10, 13, 14 e 28 (Tabela 1) apresentaram-se com maior área para os queijos da mesorregião Extremo Oeste e do Nordeste, sendo em sua maioria peptídeos, possivelmente, com cadeias laterais mais polares, de caráter hidrofílico por eluíram na porção inicial da coluna cromatográfica. Enquanto que os queijos das mesorregiões Sul e Centro Sul, apresentaram os picos 1, 8, 12, 17, 23, 24 e 27 (Figura 1) com maior área, sendo a maior parte de caráter hidrofóbico, com cadeias laterais menos polares (Nielsen et al., 2017; Timón et al., 2019).

Tabela 1. Áreas dos picos (%) das frações peptídicas dos queijos Coalho de diferentes mesorregiões da Bahia, Brasil, obtidos por RP-HPLC.

Numeração dos picos	Tempo de retenção (minutos)	A	B	C	D
		$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$
1	7,4	0,53 ± 0,35	0,42 ± 0,28	0,28 ± 0,14	0,47 ± 0,39
2	10,5	1,43 ± 0,81	1,35 ± 1,12	1,76 ± 0,34	1,03 ± 0,73
3	12,2	0,26 ± 0,10	1,47 ± 1,02	0,44 ± 0,67	0,52 ± 0,37
4	12,6	1,19 ± 0,73	0,70 ± 0,98	0,71 ± 0,78	0,96 ± 0,71
5	18,5	3,76 ± 2,42	4,20 ± 1,87	5,94 ± 1,52	4,16 ± 1,68
6	19,5	0,28 ± 0,24	0,06 ± 0,03	0,52 ± 0,39	0,11 ± 0,08
7	20,3	0,12 ± 0,10	0,25 ± 0,13	0,24 ± 0,21	0,26 ± 0,25
8	22,4	0,56 ± 0,24	0,20 ± 0,11	0,49 ± 0,20	0,22 ± 0,34
9	23,0	0,75 ± 0,22	0,50 ± 0,45	0,47 ± 0,15	0,35 ± 0,26
10	25,0	0,50 ± 0,34	2,42 ± 2,16	0,37 ± 0,28	0,42 ± 0,21
11	26,5	0,86 ± 0,33	0,29 ± 0,22	0,42 ± 0,53	0,62 ± 0,45
12	27,5	2,91 ± 1,03	1,09 ± 1,29	0,88 ± 0,67	1,16 ± 0,47
13	28,4	1,44 ± 1,67	1,28 ± 1,14	2,80 ± 1,44	1,08 ± 0,54
14	29,7	1,32 ± 0,40	2,82 ± 2,32	2,16 ± 2,12	0,82 ± 0,40
15	31,1	0,75 ± 0,31	0,18 ± 0,20	0,35 ± 0,38	0,45 ± 0,34
16	31,6	1,49 ± 0,52	0,47 ± 0,41	0,78 ± 0,27	0,50 ± 0,39
17	32,5	1,68 ± 0,80	0,64 ± 0,40	1,12 ± 0,73	1,21 ± 0,50
18	34,4	0,32 ± 0,28	0,82 ± 0,76	1,02 ± 0,34	0,52 ± 0,45
19	35,2	0,80 ± 0,31	0,65 ± 0,59	0,70 ± 0,32	0,80 ± 0,36
20	36,3	0,40 ± 0,31	0,26 ± 0,23	0,26 ± 0,23	0,27 ± 0,26
21	38,2	4,63 ± 1,21	2,99 ± 2,06	4,91 ± 1,74	3,76 ± 1,22
22	39,1	0,53 ± 0,35	0,48 ± 0,47	1,47 ± 1,29	1,07 ± 0,63
23	46,6	2,50 ± 2,87	1,26 ± 1,08	1,51 ± 1,18	2,17 ± 1,44
24	47,5	3,89 ± 2,83	1,57 ± 0,86	3,52 ± 0,63	3,33 ± 1,76
25	48,4	2,83 ± 2,04	2,99 ± 1,94	5,44 ± 1,74	3,75 ± 2,72
26	49,1	3,47 ± 2,50	1,44 ± 1,39	3,12 ± 1,91	3,97 ± 2,80
27	50,2	4,73 ± 2,34	4,03 ± 3,00	0,04 ± 0,04	2,48 ± 1,95
28	50,7	1,02 ± 0,42	2,16 ± 2,24	8,06 ± 1,96	2,21 ± 1,12

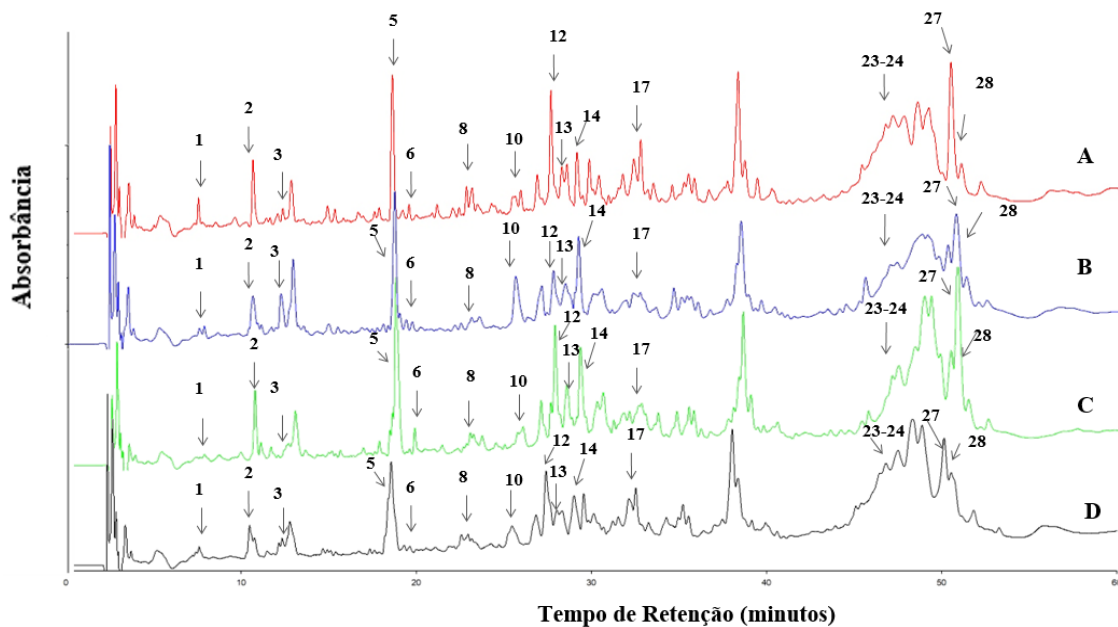
A: Mesorregião Sul; B: Mesorregião Extremo Oeste; C: Mesorregião Nordeste; D: Mesorregião Centro Sul; \bar{X} : média da área do pico; SD: desvio padrão; Tempo de retenção expresso em minutos.

Durante a produção do queijo Coalho, o coalho é adicionado para catalisar a hidrólise de Phe₁₀₅-Met₁₀₆ ligada à κ -caseína, que causa desestabilização das micelas de caseína formando a coalhada, matriz contínua de caseína, que após diversas etapas dará origem ao queijo. A proteólise é um processo bioquímico complexo que envolve a degradação

da matriz da caseína, produzindo uma variedade de peptídeos e aminoácidos livres, que incluem peptídeos insolúveis e solúveis em água (Silva et al., 2016).

As proteínas do queijo são originadas do leite utilizado na produção, encontrando-se proteínas micelares como α_{s1} -caseína, α_{s2} -caseína, β -caseína e κ -caseína (Gonçalves et al., 2016). De acordo com a literatura, as frações peptídicas obtidas neste estudo podem estar relacionadas, em sua maioria, aos fragmentos da β -caseína (picos 2, 3, 5, 8, 10, 12, 14, 17, 23, 24 e 28), à α_{s1} -caseína (picos 3, 5, 6, 17, 23 e 24), α_{s2} -caseína (pico 1) e fragmentos da κ -caseína (pico 2) (Figura 1) (Silva et al., 2016; Fontenele et al., 2017; Dias et al., 2019).

Figura 1. Cromatogramas de peptídios solúveis em água de queijos Coalho de diferentes mesorregiões da Bahia, Brasil, separados por RP-HPLC. Mesorregiões A: Sul; B: Extremo Oeste; C: Nordeste; D: Centro Sul.



Diferenças no processo de fabricação dos queijos de cada região onde foram produzidos são fatores que podem levar a diferentes condições proteolíticas nos queijos. A

utilização de coalhos distintos, com poder de coagulação e natureza diferentes (origem animal, vegetal ou microbiana), e também, variações em agentes proteolíticos endógenos ativos como as enzimas naturais do leite, a plasmina, podem diferir de acordo com a origem de produção dos queijos, influenciando diretamente na formação de peptídeos (Dias et al., 2019).

Neste estudo, os queijos foram produzidos com coalho de origem animal e microbiana e variaram quanto ao poder coagulante. Segundo Timón et al. (2014) e Timón et al. (2019) enzimas de distintas naturezas se diferem em relação à sua especificidade e, conseqüentemente, à proteólise primária da caseína. Além disso, Jesus et al. (2020) relatam que a temperatura de cozimento e o tempo de prensagem, se automática ou manual também afetam a umidade e atividade de água (a_w) e, assim, a atividade proteolítica e enzimática do queijo, devido ao meio úmido favorecer a proteólise.

Os queijos da mesorregião Extremo Oeste foram produzidos com coalho de origem microbiana e alto poder coagulante (1.200 IMCU/mL), com enzima obtida por cepa de *Rhizomucor miehei*, coagulante de atividade proteolítica mais acentuada em relação aos de origem animal e também de maior especificidade, capaz de gerar peptídeos mais hidrofílicos, devido a perda reduzida de nitrogênio no momento da proteólise (Timón et al., 2014). Além disso, o Extremo Oeste é a única região que realiza o processo de prensagem de forma manual, o que favorece uma maior retenção de água, aumento de umidade do queijo e, conseqüentemente, da sua atividade proteolítica. Na mesorregião Nordeste coalho similar foi utilizado para a produção dos queijos, revelando características semelhantes em seu perfil peptídico.

Os queijos da mesorregião Sul foram produzidos com coalho de origem bovina composto por 80% de pepsina e 20% de quimosina e menor poder coagulante (320 IMCU/ml). A pepsina bovina é uma enzima menos específica, pois pode hidrolisar

excessivamente as caseínas e continuar degradando rapidamente a cadeia de aminoácidos durante a coagulação do leite, podendo provocar maiores perdas de nitrogênio e gordura durante a produção e obter peptídeos de natureza hidrofóbica (Nielson et al., 2018).

Além disso, a etapa final de cozimento da massa dos queijos do Sul ocorre sob alta temperatura ($>55^{\circ}\text{C}$), o que promove a rápida sinerese da coalhada e com isso a redução da lactose residual, havendo assim menor produção de ácido láctico na massa da coalhada. Estes fatores resultam na redução do teor de água do queijo e levam a redução de acidez e aumento de pH, o que interfere na umidade, a_w e na natureza dos diferentes peptídeos obtidos (Furtado 2019).

Os queijos do Centro Sul, embora sejam produzidos com coagulante de origem microbiana (*Rhizomucor miehei*), apresentam alguns peptídeos semelhantes ao Sul devido o coalho apresentar atividade coagulante similar (250 IMCU/ml), associado a um maior tempo de coagulação, além de passarem pelo mesmo processo de prensagem, levando a produção de alguns peptídeos de natureza semelhante.

O tipo e a quantidade dos peptídeos gerados nos queijos também podem ter variado em decorrência das diferentes condições climáticas de cada mesorregião, do solo, da forragem ofertada aos animais da raça e estágio de lactação que podem levar a variações relacionadas à sua microbiota e às enzimas, naturalmente presentes no leite (Dias et al., 2019).

A mesorregião Extremo Oeste possui bioma de cerrado com clima quente e chuvas esparsas e, o Sul apresenta zona de mata e clima úmido com regularidade nas chuvas, mais similar ao Centro Sul, enquanto que o Nordeste possui clima seco e chuvas escassas. Todas as variações por região podem influenciar na composição proteica do leite e dos queijos, pois a forragem ofertada ao animal sofre influência desses aspectos exógenos interferindo significativamente na composição do leite utilizado como matéria

prima para o queijo. Além disso, esses aspectos associados a técnicas de produção locais levam a características diferentes do produto final e peptídeos específicos

.

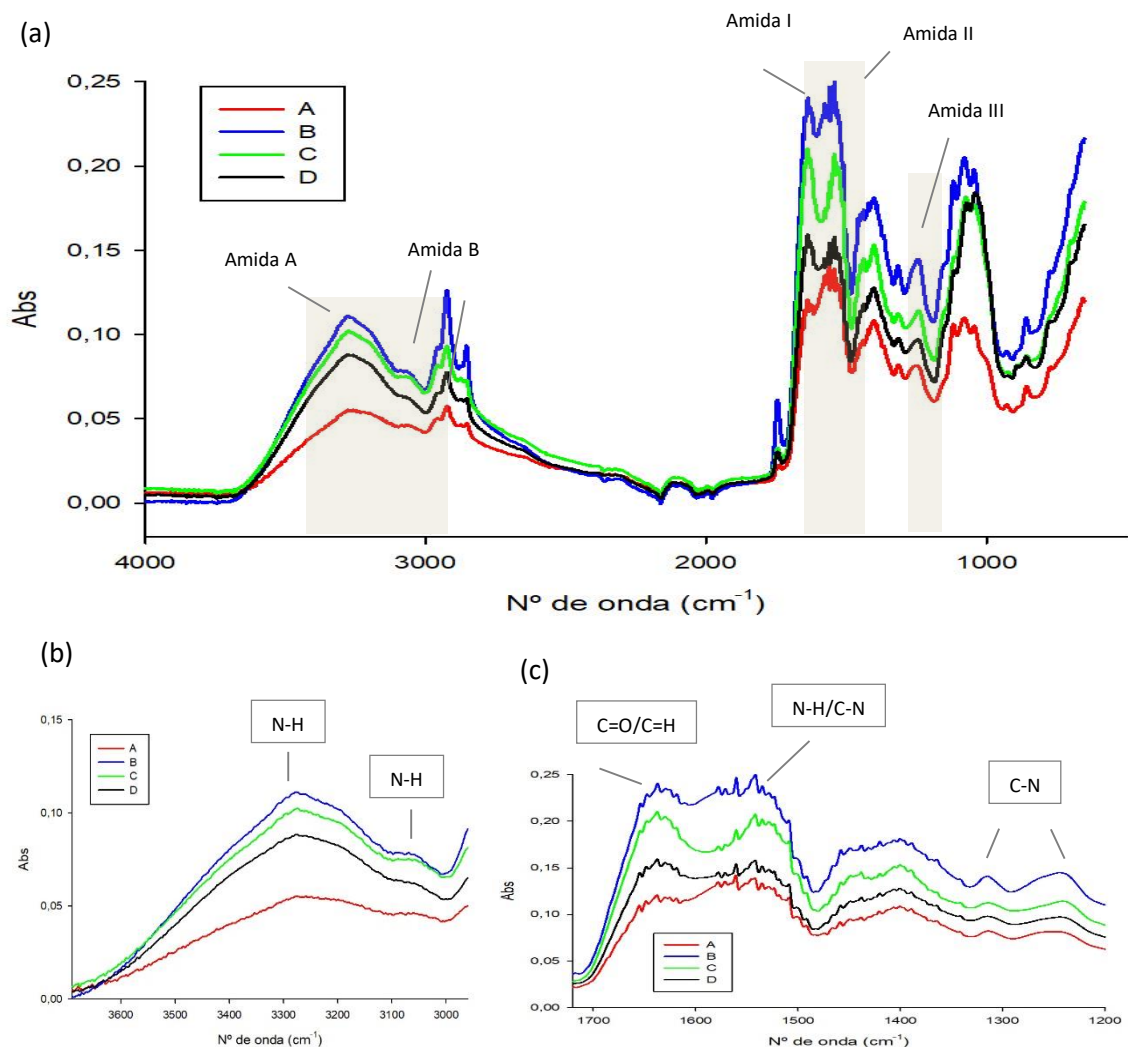
3.2. Análise espectroscópica por MIR

A partir dos espectros obtidos por MIR dos peptídeos solúveis dos queijos Coalho foram observadas 18 bandas em cinco regiões principais (Figura 2), relativas a vibrações e rotações de grupos funcionais que correspondem às amidas A e B ($3030-3500\text{ cm}^{-1}$) (Wang et al., 2011), amida I ($1654-1618\text{ cm}^{-1}$) e II ($1577-1508\text{ cm}^{-1}$) (Glassford et al., 2013) e amida III ($1320,36\text{ cm}^{-1}$ e $1240,46\text{ cm}^{-1}$) (Goormaghtigh et al., 2006), observando-se diferenças entre os espectros (Figura 2a).

Diferente da separação por RP-HPLC, os espectros do MIR refletem a interação da radiação eletromagnética com os peptídeos dos queijos, gerando movimentos vibracionais e rotacionais únicos resultantes da absorção de energia entre os átomos dos seus grupos funcionais que correspondem a uma “impressão digital” capaz de diferenciar as amostras de acordo com a sua origem (Glassford et al., 2013).

Na região entre $3030-3500\text{cm}^{-1}$ ocorreram vibrações de estiramento simétrico/assimétrico das ligações de N-H relacionadas às amidas A e B, que apresentaram bandas com baixa intensidade e alargamento, o que é justificado pelas ligações de hidrogênio, que são mais fracas em N-H que nas hidroxilas, além disso, ambas refletem a estrutura secundária das proteínas e estão correlacionadas com o conteúdo da estrutura α -hélice (Wang et al., 2011), apresentando-se maior para as mesorregiões do Extremo Oeste e Nordeste e menor para os queijos do Sul e Centro Sul (Figura 2b)

Figura 2. (a) Espectros dos Peptídeos Solúveis em Água (PSA) de queijos Coalho de mesorregiões da Bahia, Brasil, obtidos por MIR. (b) Regiões espectrais ampliadas referentes às amidas A e B (c) Amidas I, II e III. Mesorregiões A: Sul; B: Extremo Oeste; C: Nordeste; D: Centro Sul.



As amidas I e II são importantes regiões da espinha dorsal dos peptídeos, consideradas mais sensíveis às variações proteicas e às diferenças na estrutura secundária da caseína (Barth et al., 2007; Glassford et al., 2013). A amida I está relacionada às vibrações simétricas dos grupos funcionais C=O e C-N, a amida II com a vibração da deformação

angular do N-H e C-N e a amida III com as vibrações das ligações do C-N (Goormaghtigh et al., 2006) (Figura 2c). As amidas refletem o comportamento das estruturas secundárias das proteínas, que a depender da origem dos queijos, apresentam cadeias laterais polipeptídicas e aminoácidos distintos resultando em alterações da α -hélice e folhas β (Ye et al., 2017).

De acordo com Jesus et al. (2020) cadeias laterais de aminoácidos (ácido glutâmico, aspártico, glutamina, asparagina, lisina, arginina e tirosina) podem contribuir para a variação do sinal das amidas no espectro e a depender de sua origem podem apresentar comportamentos distintos.

Neste estudo observou-se que os peptídeos obtidos pela cromatografia refletiram em sua absorção espectroscópica, pois queijos do Sul, que pela cromatografia apresentaram peptídeos mais hidrofóbicos apresentaram bandas com menor absorção no MIR e queijos do Extremo Oeste, com mais peptídeos hidrofílicos, apresentaram bandas com maior absorção espectroscópica.

Isto ocorreu também pois PSA compostos por aminoácidos com cadeias laterais polares (N-H e C=O) e estruturas α -hélice e folhas β estabilizadas pelas ligações de hidrogênio proporcionam maior sensibilidade na região das amidas e interferindo na absorção espectroscópica pelo MIR (Wang et al., 2011).

A análise das amidas tem apresentado destaque na avaliação da estrutura secundária das proteínas de diversos queijos como Cheddar, Gouda, Pecorino e queijo Manteiga (Wang et al., 2011; Andrade et al., 2018; Leite et al., 2019) e no presente estudo observou-se a separação entre as amostras avaliadas com base nestas bandas. Os fatores responsáveis pela sensibilidade conformacional das amidas inclui as diferenças nas forças das ligações de hidrogênio e na transição dipolo, que fornecem informações sobre os arranjos dos peptídeos na cadeia polipeptídica.

3.3. Análise Estatística Multivariada

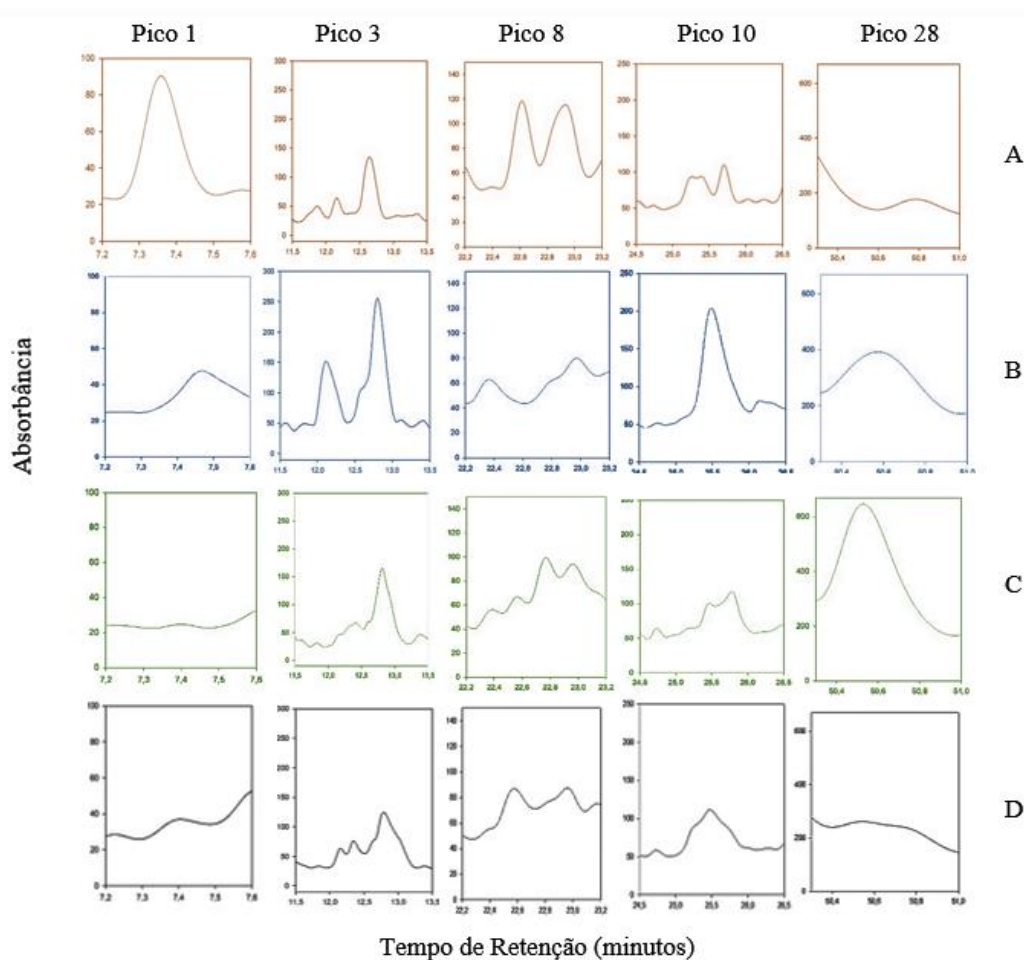
3.3.1 Análise de Componentes Principais

A fim de reduzir a dimensionalidade dos dados originais e verificar as variáveis importantes para a separação dos queijos de acordo com a sua origem, os dados de PSA analisados por RP-HPLC e MIR foram submetidos a ACP. Observou-se a formação de grupos de acordo com a região de origem dos queijos utilizando as duas técnicas analíticas.

A ACP foi aplicada aos dados do RP-HPLC com dois objetivos principais. Primeiro, a ACP foi realizada utilizando o conjunto de dados da matriz A, composta por 28 picos (variáveis), correspondente a todo o cromatograma, onde cada área de pico (%) representou uma variável e cada perfil cromatográfico, uma amostra no conjunto de dados multivariado. Observou-se a correlação das variáveis com os CPs ($p < 0,001$) e a soma dos quadrados (*somaquad*) entre CP1 e CP2 e aquelas que apresentaram menor correlação e menor *somaquad* foram excluídos, até se obter as variáveis mais importantes, e assim 5 picos (1, 3, 8, 10 e 28) (Figura 3) foram mais significativos e refletiram melhor a variância dos dados originais.

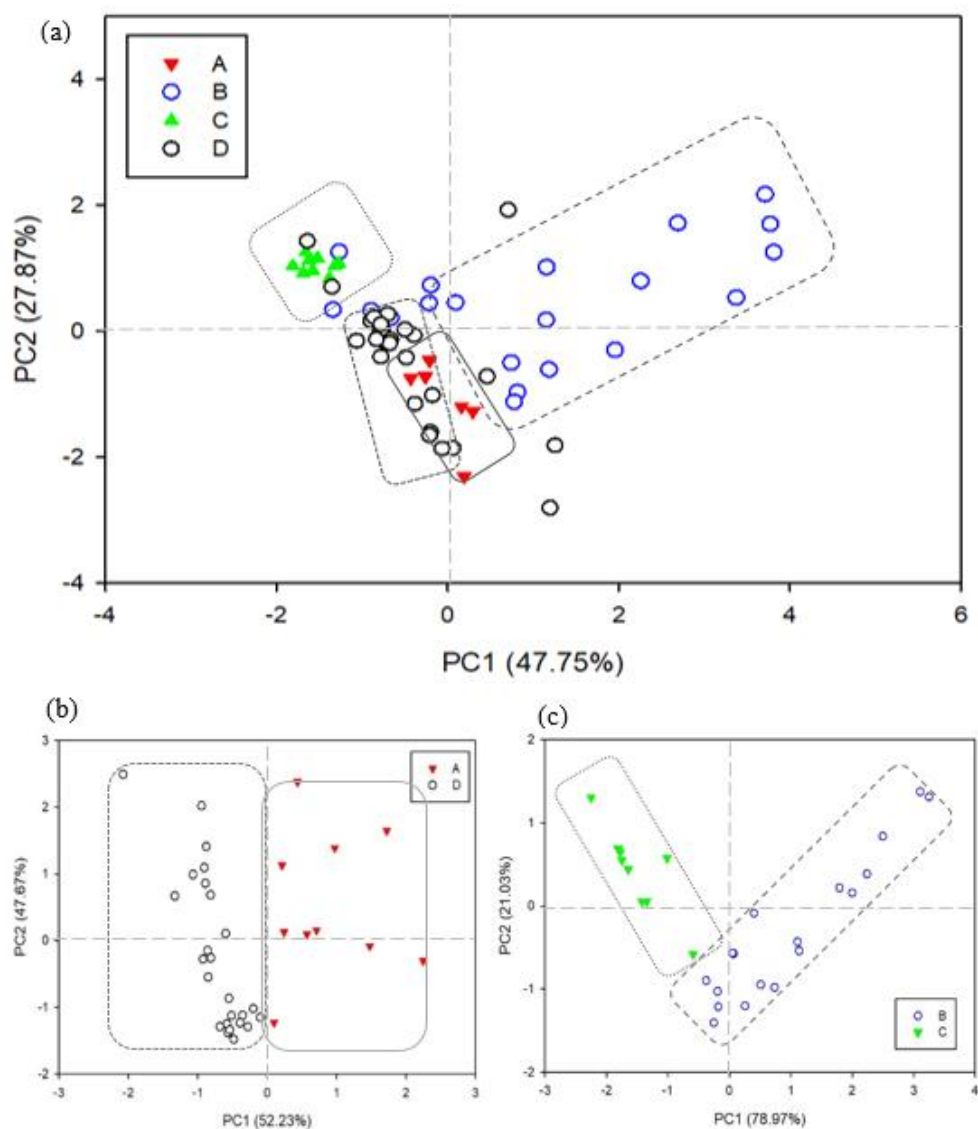
Os picos 1 e 8, com tempos de retenção de 7,4min e 22,4min, respectivamente, apresentaram maior área de pico (%) nas amostras da mesorregião Sul, se diferindo das demais regiões. Os picos 3 e 10, com tempos de retenção 12,2min e 25min, respectivamente, apresentaram maior área de pico para os queijos do Extremo Oeste. O pico 28 (50,7min) apresentou maior área de pico para os queijos do Nordeste e as demais mesorregiões apresentaram menores áreas deste pico (Figura 3). Dessa forma, os picos indicados podem ser usados como marcadores destas regiões sendo considerados eficientes para a discriminação da origem geográfica dos queijos Coalho.

Figura 3. Regiões ampliadas de cromatogramas de cinco peptídios solúveis em água (PSA) de queijos Coalho de diferentes mesorregiões da Bahia, Brasil obtidos por RP-HPLC. Mesorregiões A: Sul; B: Extremo Oeste; C: Nordeste; D: Centro Sul.



Estas 5 variáveis foram aplicadas para ACP, sendo que dois componentes principais (CP) descreveram 75,62% da variância total dos dados, com 47,75% para CP1 e 27,87% para CP2 (Figura 4).

Figura 4. (a) *Score plot* dos peptídeos solúveis em água de queijos Coalho de diferentes mesorregiões referentes aos dados de RP-HPLC; (b) Separação espacial das amostras originadas Sul (A) e Centro-Sul (D); (c) Separação espacial das amostras do Extremo Oeste (B) e Nordeste (C).



Observou-se que a dispersão gráfica dos escores de CP1 e o CP2 das amostras de PSA dos queijos contribuíram para a formação de grupos com base predominante nas

diferentes regiões que os queijos foram produzidos. O CP1 se correlacionou significativamente ($<0,001$) com os picos 3, 8 e 10, com correlação de 0,88, 0,82, 0,81, respectivamente, o que contribuiu para a separação dos PSA dos queijos do Extremo Oeste e Sul, em relação aos do Nordeste e Centro Sul, demonstrando que estes apresentaram-se como marcadores para a diferenciação dos queijos destas regiões (Figura 4a).

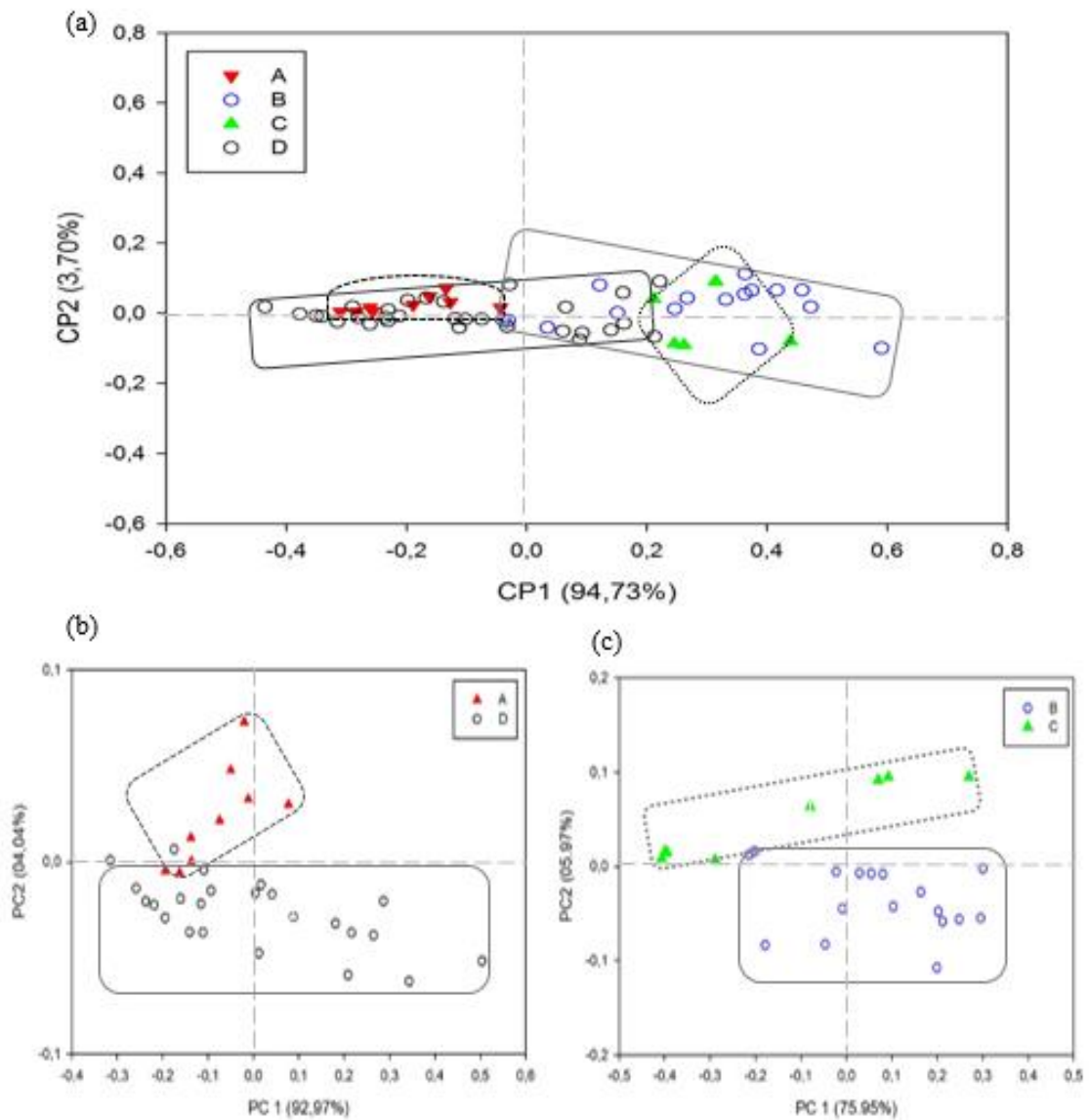
O CP2 se correlacionou negativamente (-0,73) com o pico 1 e positivamente com o pico 28 (0,64), sendo possível visualizar a separação das amostras do Nordeste e Extremo Oeste, que apresentaram-se no quadrante superior, em relação às do Sul e Centro Sul, localizadas no quadrante inferior.

Na segunda abordagem se aplicou ACP com as mesmas variáveis, no entanto, avaliando separadamente os PSA dos queijos do Sul e Centro Sul (Figura 4b) e do Extremo Oeste e Nordeste (Figura 4c) sendo possível evidenciar a separação e obtendo-se maior explicação da variância dos dados originais (100% para ambos). Para a separação das amostras das mesorregiões do Sul e Centro Sul, o CP 1 foi o que promoveu a separação das amostras, sendo o pico 8 o que apresentou maior correlação com o CP1, sendo essencial para esta diferenciação. Para a diferenciação dos queijos do Extremo Oeste e Nordeste, os picos 10 (CP1) e 28 (CP2) foram decisivos, podendo ser considerados marcadores potenciais na discriminação dos queijos oriundos destas regiões.

Observou-se que as amostras de cada região estudada apresentaram-se em quadrantes distintos na análise por ACP, pois diferenças em relação à origem geográfica afetaram as características da matéria prima utilizada para a produção do queijo, e também, processamentos diferentes de cada local foram capazes de influenciar a hidrofobicidade dos PSA obtidos, sendo possível discriminá-los.

A separação espacial dos dados do MIR foi realizada utilizando os dados da matriz B, contendo 18 variáveis/bandas obtidas por meio da análise espectroscópica (Figura 5).

Figura 5. (a) *Score plot* dos peptídeos solúveis em água de queijos Coalho de diferentes mesorregiões referentes aos dados de MIR; (b) Separação espacial das amostras originadas do Sul (A) e Centro-Sul (D); (c) Separação espacial das amostras do Extremo Oeste (B) e Nordeste (C).



Testes foram realizados com bandas específicas, mas quando todo o conjunto de dados foi utilizado a formação de grupos por origem de produção dos queijos foi mais evidente. 2 CP's foram capazes de explicar 98.43% da variância dos dados espectrais, revelando eficácia na redução da sua dimensionalidade.

O CP1 representou 94,73% da variância total e apresentou maior influência na separação dos PSA dos queijos do Sul e Centro Sul (quadrante esquerdo) em relação aos queijos do Nordeste e Extremo Oeste (quadrante direito) (Figura 5a). O CP1 se correlacionou positivamente com todas as amidas (<0,001) sendo que as amidas I ($1629,94\text{cm}^{-1}$) e amida II ($1541,89\text{cm}^{-1}$) estão relacionadas com C=O, C-H, N-H e C-N. As amidas I e II são mais sensíveis à alterações conformacionais da estrutura secundária das proteínas e estão relacionadas com as estruturas de folhas β e α -hélice, as quais apresentaram maior correlação com o CP1, contribuindo de forma mais significativa para a discriminação entre as amostras (Ye et al., 2017)

Quando o ACP foi aplicado, separadamente, nos PSA dos queijos do Sul e Centro Sul (Figura 5b) e do Extremo Oeste e Nordeste (Figura 5c), com as mesmas variáveis, foi possível identificar a diferenciação das amostras destas regiões com variância dos dados originais equivalentes a 97,01% e 91,92%, respectivamente, sendo agrupadas em quadrantes opostos.

Os queijos do Extremo Oeste apresentaram bandas com maiores absorbâncias, devido aos grupos funcionais das cadeias laterais que permitem as ligações de hidrogênio, proporcionando o maior caráter hidrofílico e bandas com maiores intensidades de absorbância, enquanto que os queijos do Sul apresentaram peptídeos mais hidrofóbicos e apresentaram bandas com menor absorção no MIR, o que os diferenciaram em relação aos queijos do Nordeste e Centro-Sul, respectivamente.

Foi realizada a análise conjunta envolvendo os dados de ambas as técnicas (RP-HPLC e MIR), no entanto melhores resultados foram obtidos de maneira independente. Assim, com a aplicação do ACP, o uso do RP-HPLC mostrou ser uma técnica adequada para discriminação dos queijos, apresentado uma clara separação gráfica dos peptídeos dos queijos, em contrapartida, a técnica espectroscópica MIR pode ser utilizada como uma alternativa estratégica para a diferenciação dos queijos Coalho por origem, com análises rápidas, não destrutivas, limpas, sem a necessidade de uso de reagentes e custos reduzidos.

3.3.2. *Redes Neurais Artificiais*

As RNA foram aplicadas aos dados cromatográficos e espectrais dos PSA dos queijos e permitiram a classificação em relação a origem das amostras. Para o RP-HPLC, foram utilizados 5 neurônios de entrada, equivalentes aos picos considerados marcadores das regiões estudadas, enquanto que para o MIR, a camada de entrada foi composta por 18 neurônios, relativos às 18 bandas associadas a vibração dos grupos funcionais C=O, C-N, N-H e C-N correspondentes às amidas. Foram realizados testes com 10 configurações distintas para ambas as técnicas, com 2 camadas intermediárias variando entre 10 e 50 neurônios e 4 neurônios na camadas de saída, equivalentes às mesorregiões estudadas (Figura 6).

A rede de melhor configuração apresentou 50 e 40 neurônios na 1ª e 2ª camada oculta, respectivamente para ambas as técnicas aplicadas e foram obtidos $RMSET_{RP-HPLC}=0,0479$, $RMSET_{MIR}=0,1153$, $RMSEV_{RP-HPLC}=0,0165$, $RMSEV_{MIR}=0,0488$ e 100% de taxa de classificação na etapa de validação para os todos os grupos analisados (Tabela 2).

Figura 6. Configuração das redes neurais artificiais aplicadas nos dados (a) cromatográficos (RP-HPLC) e (b) espectroscópicos (MIR). Input neurons: P1-P5: picos / B1-B18:bandas; Output neurons: A:Sul, B: Extremo Oeste, C: Nordeste, D: Centro Sul.

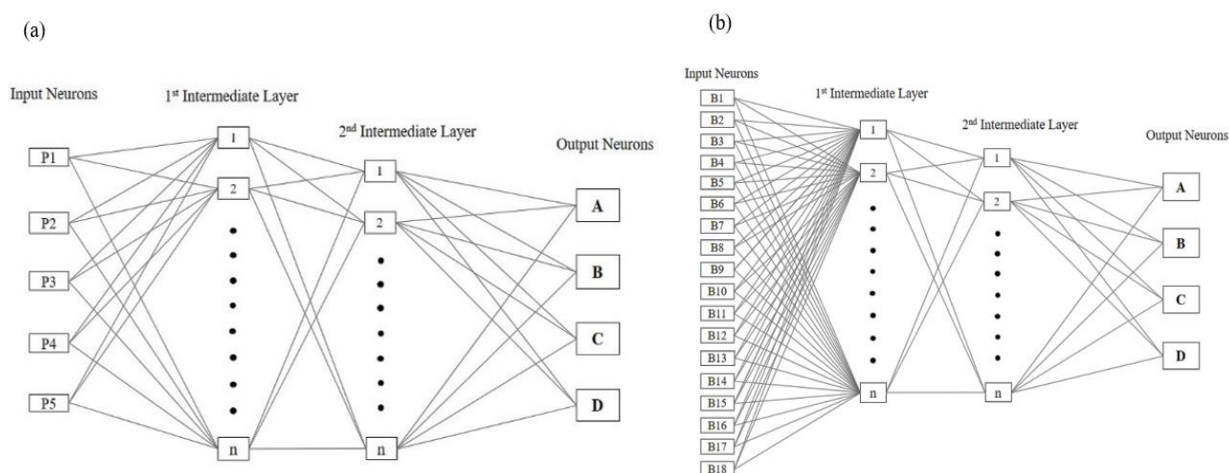


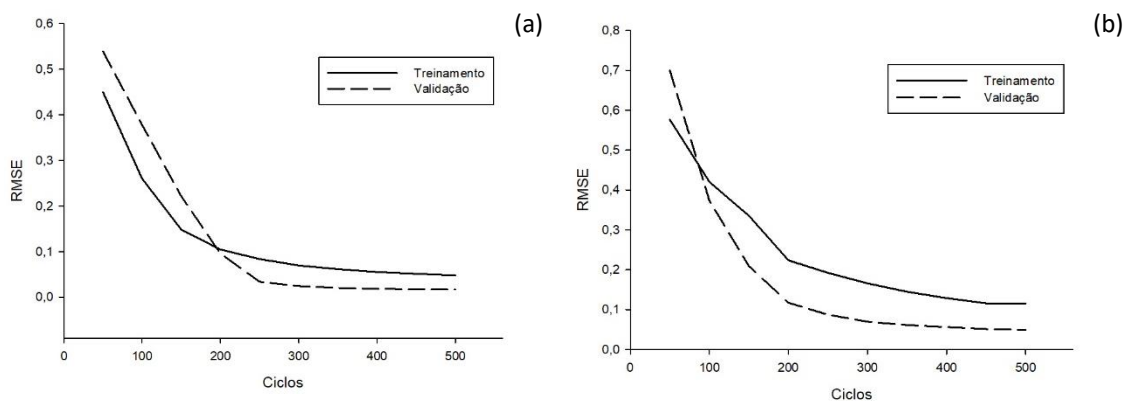
Tabela 2. Percentuais de classificação da configuração de rede neural artificial escolhida referentes aos peptídeos solúveis em água (PSA) de queijos Coalho de diferentes mesoregiões da Bahia, Brasil avaliados por RP-HPLC e MIR

Técnica	Mesoregiões	Taxa de Classificação (%)		RMSET	RMSEV
		Treinamento	Validação		
RP-HPLC	A	100	100	0,0479	0,0165
	B	100	100		
	C	100	100		
	D	100	100		
MIR	A	100	100	0,1153	0,0488
	B	100	100		
	C	85,71	100		
	D	95,45	100		

RMSET: Root Mean Square Error (treinamento); RMSEV: Root Mean Square Error (validação); Taxa de classificação: Acertos/classificação correta. Mesoregiões A: Sul; B: Extremo Oeste; C: Nordeste; D: Centro Sul

Observou-se que o processo de aprendizagem das redes ocorreu de forma efetiva, uma vez que, na fase inicial, o RMSET apresentou-se menor que o RMSEV e ambos reduziram ligeiramente após as primeiras iterações, se tornaram constantes, e ao final o RMSEV tornou-se menor que o RMSET sendo capaz de discriminar corretamente as amostras em seus verdadeiros grupos na etapa de validação (Figura 7).

Figura 7. Gráfico de RMSET e RMSEV em função do número de iterações nas etapas de treinamento e validação das redes de melhor arquitetura testada para (a) RP-HPLC e (b) MIR.



Resultados semelhantes foram obtidos por Cevoli et al. (2013), que aplicaram RNA para discriminação de queijos Parmigiano-Reggiano com DOP, conformes e não-conformes de acordo com o teor de casca permitido e a RNA mostrou-se eficiente, com classificação correta entre 95,5% e 96,7% na etapa de validação. A combinação do MIR com a RNA também foi aplicada por Guerra et al. (2014) para diferenciar este mesmo tipo de queijo com base nas dietas animais ofertadas, com precisão superior a 93%.

As técnicas cromatográfica e a espectroscópica foram úteis para a discriminação de queijo Coalho por origem e com a aplicação das RNA, excelentes taxas de classificação foram obtidas com baixos erros associados, inferindo que a utilização do MIR associada

ao RNA pode ser uma ferramenta analítica suficiente e a mais indicada para a investigação da origem de queijos por ser rápida e robusta.

4. Conclusões

Este estudo indicou a viabilidade e eficiência do uso das técnicas cromatográfica e espectroscópica em PSA para discriminar queijo Coalho de diferentes origens associadas com ferramentas quimiométricas. O uso do RP-HPLC indicou a existência de cinco peptídeos marcadores nas regiões estudadas, a serem diretamente aplicados para otimizar as investigações de amostras desconhecidas.

O mesmo padrão de separação e classificação das amostras foi observado utilizando o MIR associado às técnicas multivariadas, observando-se que o MIR associado ao RNA mostrou ser a melhor alternativa na discriminação de queijos de acordo com o perfil peptídico por serem mais rápidos, robustos e menos onerosos.

Declaração de contribuição dos autores CRediT

Larissa Kauly Rosa Silva: Curadoria de dados, Análise formal, Investigação, Metodologia, Administração do projeto, Redação do manuscrito original. **Josane Cardim de Jesus:** curadoria de dados, investigação. **Rebeca Rodrigues Vieira Onelli:** curadoria de dados, investigação. **Daniele Gomes Conceição:** Curadoria de dados, Investigação. **Leandro Soares Santos:** Conceituação, Análise formal, Supervisão. **Sibelli Passini Barbosa Ferrão:** Conceituação, Supervisão, Administração de projetos, Redação-revisão e edição.

Declaração de Conflito de Interesses

Nenhum.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) pelo financiamento para o desenvolvimento deste trabalho.

Apêndice –Material Suplementar

O material suplementar deste artigo pode ser encontrado em anexo (Figura 1S)

Referências

- Andrade, J., Pereira, C.G., Ranquine, T., Azarias, C.A., Bell, M.J.V., & Anjos VC (2018). Long-Term Ripening Evaluation of Ewes' Cheeses by Fourier-Transformed Infrared Spectroscopy under Real Industrial Conditions. *Journal of Spectroscopy*, 2018, 1-9. <https://doi.org/10.1155/2018/1381864>
- Brasil (2001) Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Manteiga da Terra ou Manteiga de Garrafa; Queijo de Coalho e Queijo de Manteiga. Retrieved from <https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/legislacoes/instrucao-normativa-n-30-de-26-de-junho-de-2001,1039.html>. Accessed December, 30, 2020.
- Barth, A. (2007). Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1767, 1073-1101. <https://doi.org/10.1002/0470027320.s8201>
- Cevoli, C., Gori, A., Nocetti, M., Cuiabus, L., Fiorenza, M. C., & Fabbri, A. (2013). FT-NIR and FT-MIR spectroscopy to discriminate competitors, non-compliance and compliance grated Parmigiano Reggiano cheese. *Food Research International*, 52, 214-220. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.03.016>

- Conceição, D. G., Gonçalves, B. R. F., Hora, F. F., Faleiro, A. S., Santos, L. S., & Ferrão, S. P. B. (2019). Use of FTIR-ATR Spectroscopy Combined with Multivariate Analysis as a Screening Tool to Identify Adulterants in Raw Milk. *Journal of Brazilian Chemical Society*, 30, 780-785. <http://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20180208>
- Dias, G. M. P., Silva, F. O., Porto, T. S., Holanda, M. T., & Porto, A. L. F. (2019). Perfil dos peptídeos bioativos obtidos de queijos de coalho com potencial antimicrobiano. *Pesquisa Agropecuária Pernambucana*, 24, e1961242019. <https://doi.org/10.12661/pap.2019.001>
- Fischer, I., Henecke, F., Bannes, C., & Zell, A. (2001). JavaNNS, Java Neural Network Simulator Version 1.1 (1st ed.). University of Tübingen.
- Fontenele, M. A., Bastos, M. S. R., Santos, K. M. O., Bemquerer, M. P., & Egito, A. S. (2017). Peptide profile of Coalho cheese: A contribution for Protected Designation of Origin (PDO). *Food Chemistry*, 219, 382-390. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.171>
- Furtado, M. M. (2019). *Queijos Semiduros* (1st ed.). Setembro (Chapter 5).
- Glassford, S. E., Byrne, B., & Kazarian, S. G. (2013). Recent applications of ATR FTIR spectroscopy and imaging to proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1834, 2849-2858. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2013.07.015>
- 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. <http://dx.doi:10.1111/ijfs.13128>
- Goormaghtigh, E., Ruyschaert, J.-M., & Raussens, V. (2006). Evaluation of the Information Content in Infrared Spectra for Protein Secondary Structure Determination.

Biophysical Journal Volume, 90, 2946-2957. <http://dx.doi:10.1529/biophysj.105.072017>

Guerra, E., Gori, A., Cevoli, C., Losi, G., & Caboni, M. F. (2014). Lipid fraction of creams collected in the Parmigiano-Reggiano cheese production area in response to extruded linseed supplementation of dairy cows' diets: GC-FID and FT-MIR evaluation. *International Journal of Dairy Technology*, 67, 510-520. <http://dx.doi:10.1111/1471-0307.12153>

Guerreiro, J. S., Barros, M., Fernandes, P., Pires, P., Bardsley, B. (2013). Principal component analysis of proteolytic profiles as markers of authenticity of PDO cheeses. *Food Chemistry*, 136, 1526-1532. <http://dx.doi:10.1016/j.foodchem.2012.02.066>

IBGE (2018) Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa Pecuária Municipal Retrieved from <https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/ppm/quadros/brasil/2018>. Accessed December, 30, 2020.

Jabri, M., Trossat, P., Wolf, V., Beuvier, E., Rolet-Répécaud, O., Gavoye, S., Gaüzère, Y., Belysheva, O., Gaudillière, N., Notz, E., Grosperin, P., Laithier, C., & Delacroix-Buchet, A. (2020). Mid-infrared spectrometry prediction of the cheese-making properties of raw Montbéliarde milks from herds and cheese dairy vats used for the production of Protected Designation of Origin and Protected Geographical Indication cheeses in Franche-Comté. *Journal of Dairy Science*, 103(7), 5992-6002. <http://dx.doi:10.3168/jds.2019-17491>.

Jesus, J. C., Silva, G. J., Gonçalves, B. R. F., Souza, M. R., Santos, L. S., & Ferrão, S. P. B. (2020). Quick identification of the time of maturation of artisanal Minas cheese by FTIR-ATR spectroscopy and multivariate techniques. *Journal Brazilian Chemical Society*, 31(10), 2001-2011. <http://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20200100>

- Leite, A. I. N., Pereira, C. G., Andrade, A., Vicentinic, N. M., & Bella, M. J. V. (2019). FTIR-ATR spectroscopy as a tool for the rapid detection of adulterations in butter cheeses. *LWT - Food Science and Technology*, 109, 63-69. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.04.017>
- Nielsen, S. D., Beverly, R. L., Qu, Y., & Dallas, D. C. (2017). Milk bioactive peptide database: A comprehensive database of milk protein-derived bioactive peptides and novel visualization. *Food Chemistry*, 232, 673-682. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.056>
- 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. <https://doi.org/10.1051/lait:2007004>
- Parente, E., Patel, H., Caldeo, V., Piraino, P. & Mcsweeney, P. L. H. (2012). RP-HPLC peptide profiling of cheese extracts: a study of sources of variation, repeatability and reproducibility. *Food Chemistry*, 131, 1552–1560. <https://doi.10.1016/j.foodchem.2011.10.003>
- Pax, A. P., Ong, L., Vongsivut, J., Tobinc, M. J., Kentisha, S. E., & Gras, S. L. (2019). The characterisation of Mozzarella cheese microstructure using high resolution synchrotron transmission and ATR-FTIR microspectroscopy. *Food Chemistry*, 291, 214–222. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.04.016>
- Picon, A. P., & Gaya, M. (2007). Nunez Lowering hydrophobic peptides and increasing free amino acids in cheese made with a *Lactococcus lactis* strain expressing a mutant oligopeptide binding protein. *International Dairy Journal*, 17, 218-225. <http://dx.doi:10.1016/j.idairyj.2005.09.021>
- Santos, L. S., Cardozo, R. M. D., Nunes, N. M., Inácio, A. B., Pires, A. C. S. & Pinto, M. S. (2017). Easy classification of traditional Minas cheeses using artificial neural

networks and discriminant analysis. *International Journal of Dairy Technology* **70** 1-7.

<https://doi.org/10.1111/1471-0307.12370>

Sara, S., Davide, P., Domenico, V., Lucio, C., & Patrizia, P. (2018). Determining the authenticity of pdo buffalo mozzarella: an approach based on Fourier Transform Infrared (MIR- FTIR) spectroscopy and on chemometric tools. *International Journal of Latest Research in Science and Technology*, 7(2) 1-6.

SAS (2018) Statistical Analysis System, Student version; SAS Institute Inc., USA.

Sforza, S., Cavatorta, V., Lambertini, F., Galaverna, G., Dossena, A., & Marchelli, R. (2012). Cheese peptidomics: A detailed study on the evolution of the oligopeptide fraction in Parmigiano-Reggiano cheese from curd to 24 months of aging. *Journal of Dairy Science*, 95, 3514–3526. <http://dx.doi:10.3168/jds.2011-5046>.

Silva, L. K. R., Gonçalves, B. R. F., Hora, F. F., Santos, L. S., & Ferrão, S. P. B. (2020). Spectroscopy Method (FTIR-ATR) and chemometric tools to detect cow's milk addition to buffalo's milk. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 19(1), 11-20. <https://doi.org/10.24275/rmiq/Alim560>

Silva, R. A., Bezerra, V. S., Pimentel, M. C. B., Porto, A. L. F., Cavalcanti, M. T. H., & Filho, J. L. L. (2016). Proteomic and peptidomic profiling of Brazilian artisanal 'Coalho' cheese. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96, 337-4344. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7640>

Timón, M. L., Parra, V., Otte, J., Broncano, J. M., & Petró, M. J. (2014). Identification of radical scavenging peptides (<3 kDa) from Burgos-type cheese. *LWT - Food Science and Technology*, 57(1), 359–365. <https://doi:10.1016/j.lwt.2014.01.020>

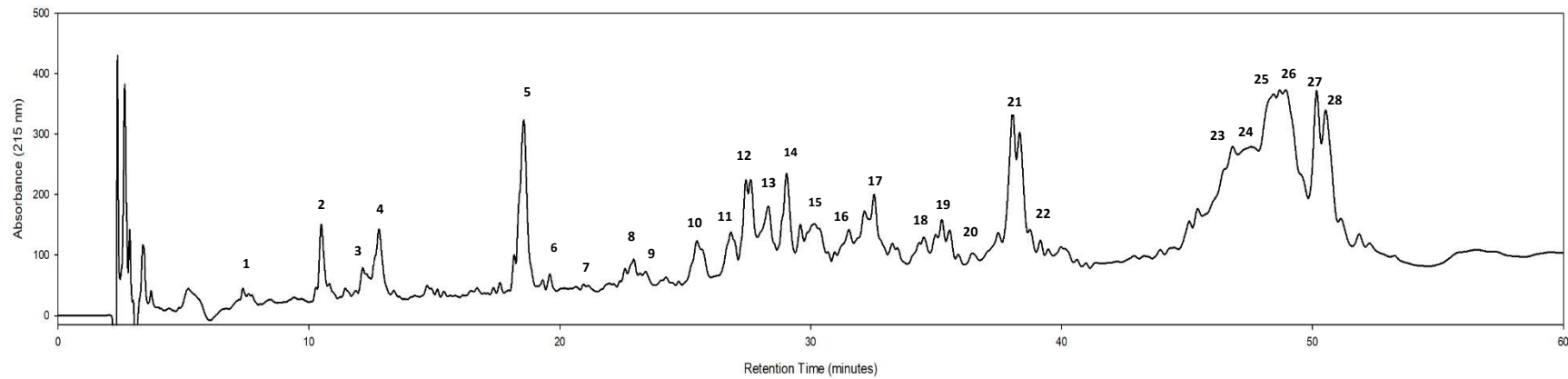
Timón, M. L., Andrés, A. I., Otte, J., & Petró, M. J. (2019). Antioxidant peptides (<3 kDa) identified onhard cow milk cheese with rennet from different origin *Food Research International*. 120, 643-649. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.11.019>

Wang, F., Liu, A-P., Ren, F-Z., Zhang, X-Y., Stephanie, C., Zhang, L-D., & Guo, H-Y. (2011). FTIR Analysis of Protein Secondary Structure in Cheddar Cheese during Ripening. *Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi*, 31, 1786-1789. [https://doi:10.3964/j.issn.1000-0593\(2011\)07-1786-04](https://doi:10.3964/j.issn.1000-0593(2011)07-1786-04)

Ye, M. P., Zhou, R., Shi, Y. R., Chen, H. C. & Du, Y. (2017). Effects of heating on the secondary structure of proteins in milk powders using mid-infrared spectroscopy. *Journal of Dairy Science*, 100, 89-95. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11443>

Apêndice – Material Suplementar

Figure 1S. Separação cromatográfica (RP-HPLC) de peptídeos solúveis em água (PSA) extraídos de queijo Coalho da Bahia, Brasil e número de frações peptídicas obtidas, demonstradas na Tabela 1.



Capítulo V

Artigo 3

Spectroscopic infrared techniques applied to assessment of the cheeses authenticity: A Review

Artigo sob revisão no Periódico *Trends in Food Science & Technology* desde 8 de Janeiro de 2021.

Highlights

- Spectroscopic infrared techniques for cheeses authenticity were revised;
- Evaluation of the authenticity of the cheeses was detailed;
- Chemometric analyzes associated with the use of spectroscopy were elucidated;
- Middle and near infrared applications for cheese evaluation were presented.

Spectroscopic infrared techniques applied to assessment of the cheeses authenticity: A Review

Larissa Kauly Rosa Silva^{1,2}, Leandro Soares Santos¹, Sibelli Passini Barbosa Ferrão^{1*}

¹Program in Food Engineering and Science, State University of Bahia Southwest, University

Campus of Itapetinga, 45700-000, Bahia, Brazil

²Center for Biological and Health Sciences, Federal University of Western Bahia, University

Campus of Barreiras, 47810-047, Bahia, Brazil

Abstract

Background: The cheeses authenticity has become a concern for supervisory authorities as it can affect the market and also the health and safety of the consumer, requiring the application of appropriate techniques to authentication control. Infrared spectroscopy has been shown efficient for cheese authentication due to your high sensitivity and speed, especially when combined with chemometrics.

Scope and Approach: This review presents studies with application of near and middle-infrared on the cheeses origin identification, analysis of adulteration and the monitoring of ripeness stages. Approaches on the authenticity, the principles of techniques and the importance of chemometrics for authentication and sorting cheeses will be explained.

Key Findings and Conclusions: Among the spectroscopic techniques studied, the MIR (FTIR-ATR) was used mainly to identify the origin of the cheese and the NIR (reflectance) in the ripeness of cheeses, and the discriminant analysis and PLS more applied. Comparative and more specific studies using cheeses and extracts of their compounds are necessary to expand the applicability of techniques for product control.

Keywords: origin identification, adulteration, ripeness, dairy products, chemometrics.

1. Introduction

Authenticity is a determinant factor in the quality of cheese, one of the most consumed and requested dairy products in the world (Vásquez *et al.*, 2018; Bergamaschi *et al.*, 2020). Products that have high value or that have a complex processing chain, which involves several steps, such as cheese, are more vulnerable to actions that compromise their authenticity and although there are national and international standards that require the conformity of these products, adulterations are still common (Abbas *et al.*, 2018).

Cheeses can have their authenticity compromised for several reasons, but they are often linked to the financial profit obtained by the intention of improving the perceived product quality or reducing manufacturing or marketing costs. Regardless of the nature of the adulteration, the cheese authenticity determination can be related to: i) identification of its origin, which represents an added value to the specific characteristics of a given region (Ottavian *et al.*, 2012; Oca *et al.*, 2012; Jabri *et al.*, 2020; Danezis *et al.*, 2020); ii) adulteration analysis, which can occur by adding ingredients / adulterants or replacing specific cheese components (Leite *et al.*, 2019; Visconti *et al.*, 2020); and iii) verification of the ripeness time, which corresponds to the age of the cheese and the development of characteristics specific to each stage (Andrade *et al.*, 2018; Alinovi *et al.*, 2019).

With increasing trends in adulteration of cheeses (Jabri *et al.*, 2020; Jesus *et al.*, 2020), the ability to track them rapidly and efficiently is a way to protect the consumer and assist the authorities in controlling the circulation of these products in the market. A number of methods based on electrophoretic, chromatographic and spectrometric techniques (Gan *et al.*, 2016) have already been applied to assess the authenticity of cheeses, however, despite their good sensitivity, they have a high cost, require the preparation of the samples and demand long periods in the conduction of the analysis.

The use of spectroscopic methods such as near infrared (NIR) and mid-infrared (MIR) is promising to face the challenges of authentication and quality assurance of cheese, since they provide rapid

analysis, of relatively low cost, which do not require use of reagents, therefore it is a potential alternative for routine analysis in industries and reference laboratories, especially when associated with chemometrics, which have already been used in the evaluation of the quality and authenticity of foods, including milk products, such as cheese (Karoui *et al.*, 2017).

The analytical information contained in the infrared spectrum has a large number of variables of a complex chemical nature and highly correlated, which require the development of methods of interpretation and classification (Lerma-García *et al.*, 2010a; Cevoli *et al.*, 2013a), discrimination or regression models (González-Martín *et al.*, 2014; Currò *et al.*, 2017), arranged in multivariate techniques, useful for determining authenticity.

The objective of this review is to present studies that address the application of MIR and NIR spectroscopic techniques to assess the authenticity of cheeses. The particularities of authentication related to the identification of origin, causes of adulteration, ripeness time, and the principles of the techniques and the importance of their application together with chemometric analysis will also be elucidated.

2. Cheese Authenticity

Cheese is one of the oldest and most traditional foods produced in the world, very important for human consumption, due to its high content of proteins, lipids, vitamin A and minerals, such as calcium and phosphorus (Vásquez *et al.*, 2018). There are more than 1000 varieties of cheese produced in different countries (McSweeney *et al.*, 2004), each with their peculiarities, formats, textures and flavors and, due to their demand, some have an important role in production and exportation in the dairy market, with great added commercial value (Bergamaschi *et al.*, 2020). Of the cheese-exporting countries between 2015 and 2019, the Europeans corresponded to more than 40% of the world market, with a revenue of US\$ 840 million, which added to the world's, reached

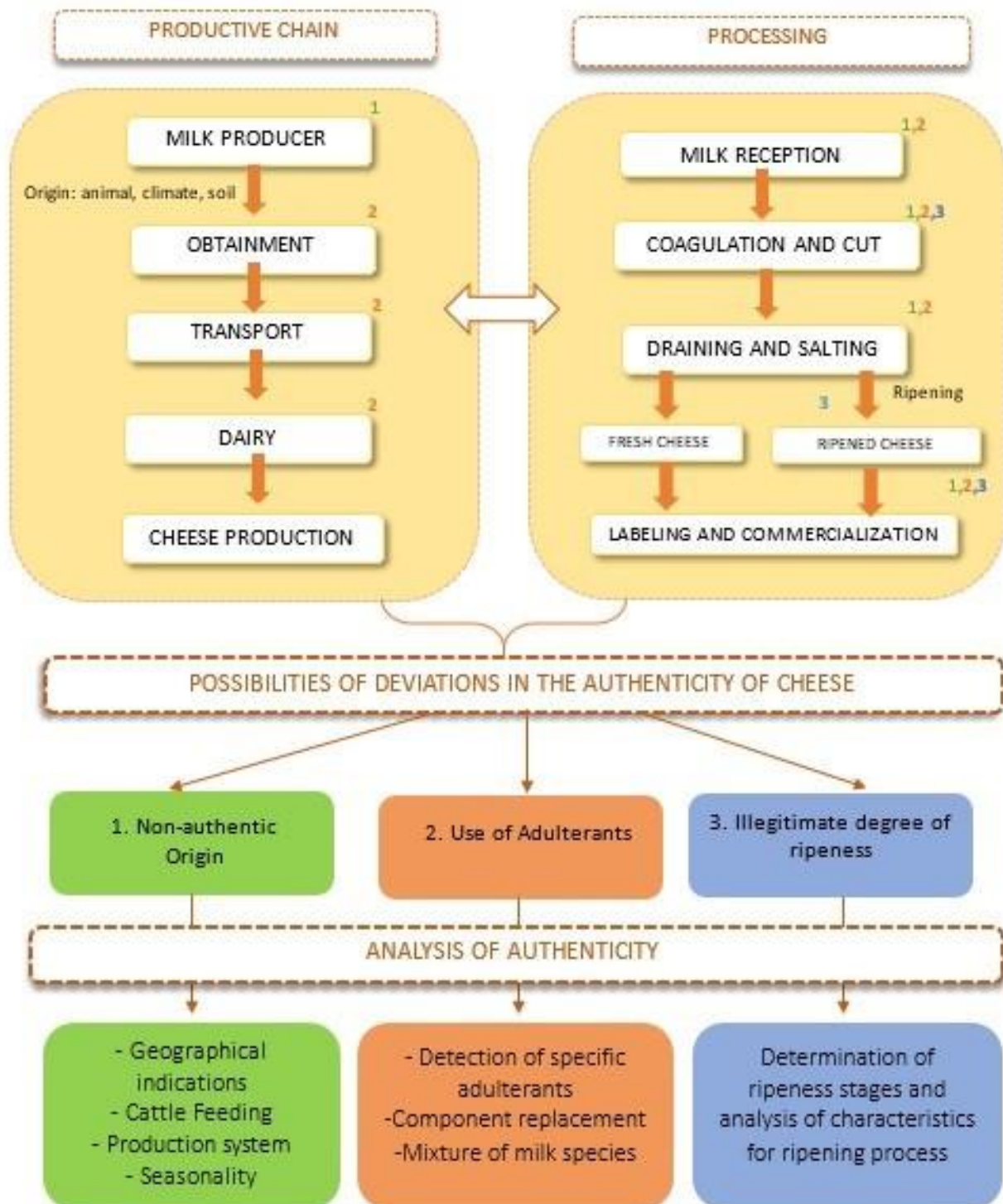
around US\$ 2.09 billion, with large part of the market being represented by Mozzarella, Parmesan, Camembert, Cheddar, Edam, Emmental cheeses, among others (USDA, 2019).

The basics of cheese processing (Figure 1) is the same to the various existing types. However, there are particularities in the process that result in different technological properties and final composition (Codex Alimentarius, 2018; FAO, 2019). The fat, protein and moisture content are determinants in the quality of the cheese and directly affect its texture and flavor, which can be influenced by the origin of the raw material, processing techniques and the reactions that occur in the ripeness process, particularities that lead to its differentiation and also appreciation by the consumer (Visconti *et al.*, 2020).

An authentic product displays veracity of information described on the label and complies with the legislation (EU, 2011; Brasil, 2017; Codex Alimentarius, 2018). Products such as cheese that have a high price, a complex processing and supply chain, with several stages are vulnerable to adulteration (Figure 1), an issue that is urgent, since adulterations can compromise the quality of the product and consumer safety and satisfaction (Kamal & Karoui 2015).

Cheese authenticity has been a major concern for the food industry, researchers and consumers, as in recent decades, adulterations and non-conformities have been reported in a variety of dairy products, including powdered milk (Wu *et al.*, 2008), fluid milk (Gonçalves *et al.*, 2020), cheese whey (Andrade *et al.*, 2019), butter (Koca *et al.*, 2010), fermented milk (Genis *et al.*, 2019) and cheeses (Cevoli *et al.*, 2013b). Regardless of the nature of adulteration or non-conformity, the cheese authenticity determination can involve: identifying their origin, determining the causes of adulteration and analyzing adulterants, and verifying the ripeness stages (Abbas *et al.*, 2018; Danezis *et al.*, 2020), which will be explored below.

Figure 1. Production chain, processing and authenticity of cheese.



2.1. Origin Identification

The authenticity of cheeses is of great importance, especially when they are considered products in which their origin has great cultural and commercial value. The origin of the cheeses may have its identity related to the edaphoclimatic conditions established by the environment, in which the climate influences the composition and quality of the raw material used. The place of origin and cattle raising techniques can also influence the composition of the milk microbiota and generate specific biochemical changes in the cheese. In addition, the use of specific ingredients and processes influenced by cultural and local aspects can also attribute a set of characteristics to the product that refer to the territorial essence, which determine its *terroir* (Karoui *et al.*, 2005a; Karoui *et al.*, 2005b; Karoui *et al.*, 2006; Karoui *et al.*, 2007; Jabri *et al.*, 2020).

Origin identification is an effective form of differentiation to reduce possible losses and to enhance the regional aspects of the product. However, there are still many cheeses targeted by adulterations, including those with protected origin, in which this registration represents the implicit guarantee of a traditional manufacturing process, with greater added value, such as the Protected Designation of Origin (PDO), Protected Geographical Indication (PGI), Specialty Traditional Guaranteed (STG), Indication of Provenance (IP) and Designation of Origin (DO) (Dias *et al.*, 2018).

PDO is attributed to cheeses produced with specific raw material and geographical area and has the largest number of records among the cheeses produced in the world such as Pecorino, Grana, Gouda, Parmigiano Reggiano, Gruyère, Camembert. PGI refers to the registration of only one production step (Emmental, Blue Cheeses, Tomme de Savoie, Danablu cheeses) and STG comprises products with a traditional character, whether in composition or production, for example, Mozzarella in Italy (EU, 2002). The term IP refers to the name of the place recognized for making the product, such as Serro, Canastra and Minas Artesanal cheeses and the DO refers to the place

that designates products/services with characteristics that can be attributed to the geographical origin (Queijo Artesanal Serrano) (Wilkinson *et al.*, 2017)

In recent years, several criteria have been important in identifying the origin of cheeses and discriminating them. Investigations related to the differentiation by geographical origin (Danezis *et al.*, 2020), climatic or seasonal fluctuations were carried out, considering variations in the content and profile of fatty acids and volatile compounds in milk and cheese (González-Martín *et al.*, 2011a). Aspects relating to the soil (Karoui *et al.*, 2005a), altitude (Cozzi *et al.*, 2009) and cattle feeding (Guerra *et al.*, 2014) were also considered in the discrimination of cheeses since the diversification of botanical composition can affect the milk microbiota and the characteristics of the cheese. In addition, the heat treatment applied to milk has also been evaluated, since the presence or not of specific heat-sensitive enzymes enables their differentiation (Alewijn *et al.*, 2018).

2.2. Analysis of adulterants

In the last few decades, a variety of foods have been subject to fraud by adulteration, including spices (Lima *et al.*, 2020), edible oils (Lerma-García *et al.*, 2010b), coffee (Milani *et al.*, 2020), fruit juices (Xu *et al.*, 2020), meat products (Leng *et al.*, 2020) and dairy products, such as cheese (Barreto *et al.*, 2018).

Adulteration is an intentional act that is usually related to financial profit, motivated by the reduction of manufacturing and marketing costs and also an increase in shelf life. In cheeses, frauds may occur involving the addition, deliberate substitution of ingredients, mixing of milks of different species or incorrect labeling and, the most common type is the incorporation of ingredients to change the composition or increase the volume, which depending on the level of adulteration, the detection becomes difficult (Kamal and Karoui 2015; Abbas *et al.*, 2018).

Depending on the nature and concentration of the additives, their indiscriminate use may represent a risk to the consumer, not only for economic reasons, but also for safety and public health reasons,

thus the importance of compliance with the legislation. The use of acidity regulators, preservatives, pigments, ripeness agents and thickeners (0.05%-5%) is permitted if the recommended limits are respected (Codex Alimentarius, 2018), as well as the use of cellulose and silicon dioxide (<1.0%) and the mixture of milks of different species are allowed only when specified on the label (EU, 2011; FDA, 2018).

Recently, several frauds by adulterations have been verified, such as: the presence of permitted additives in excess and non-authentic substances used to increase weight and volume in grated hard cheeses (Visconti *et al.*, 2020); the replacement of cheese fat by vegetable oils (Leite *et al.*, 2019); use of adulterants or mixture of milks of different species used for cheese production, without specification on the label (Cuibus *et al.*, 2014), with prevalence of adulteration of medium to high levels of adulteration (>30%) (Soto-Barajas *et al.*, 2013; González-Martín *et al.*, 2017). Thus, the application of adequate and efficient methods of control is essential for rapid tracking, both for official inspection services and laboratories that certify authenticity in order to reduce the possibilities of fraud. (Medina *et al.*, 2019).

2.3. Ripeness time identification

Matured cheeses are products of high commercial value, in which the flavor and texture are enhanced with the ripeness process, resulting from biochemical changes of proteins, lipids and residual lactose, with proteolysis being one of the most important steps for the development of the specific characteristics in these cheeses (Gan *et al.*, 2016). Falsification of the cheese ripeness time is common and its verification is required, since products with an illegitimate degree of maturity have negative consequences for the consumer and producer, in terms of food safety, quality and price (Loudiyi *et al.*, 2018).

The changes that occur during proteolysis are based on the concepts of extension and depth, in which the extension index quantifies hydrolyzed proteins in high and medium molecular weight

(insoluble) peptides and the depth index those with low molecular weight (soluble), evaluating the degree of degradation of peptides to amino acids, due to the action of proteolytic enzymes and / or the action of rennet and plasmin. There are also reactions related to the metabolism of residual lactose by the action of lactic-acid bacteria, which synthesize antimicrobial compounds, such as organic acids, which contribute to microbiological stability and to the development of typical characteristics of ripened cheeses. (Pagthinathan & Nafees, 2015).

Ripened cheeses require time to be commercialized and depending on the type, they are classified as half-ripened/medium-ripened or ripened/matured. However, changes in the maturation stages have been observed, by reducing the ideal period for the reactions or using inappropriate temperatures and application of exogenous enzymes and starter cultures that accelerate the maturation rate, resulting in cheeses marketed with inadequate specification. (Visconti *et al.*, 2020).

The application of adequate methods to predict or identify the time and stage of maturation of the cheeses and to guarantee their quality is of great importance. This monitoring has occurs by checking the concentration of peptides, amino acids and organic acids, which are indicators of the maturation process (Martín-del-campo *et al.*, 2007a; Martín-del-campo *et al.*, 2007b; Currò *et al.*, 2017); by the evaluation of the chemical and physical characteristics of the crumb and shell (Alinovi *et al.*, 2019; Jesus *et al.*, 2020), due to the action of microorganisms during maturation (Cattaneo *et al.*, 2008) and also by the analysis of rheological and physical-chemical characteristics (Kraggerud *et al.*, 2014; Loudiyi *et al.*, 2018).

3. Spectroscopic Techniques in Infrared

Several methodologies have been applied to detect the authenticity of cheeses, such as electrophoresis, chromatography and mass spectrometry, however, they are laborious, high cost methods and, although sensitive, are not viable when the workflow is fast and labor is reduced (Esteki *et al.*, 2018). Infrared spectroscopy represents an good alternative for cheese authentication

as it is a fast, non-destructive technique that requires minimal sample preparation and does not require the use of reagents, providing analysis of multiple components with savings in time and cost, versatility of the equipments and obtaining the fingerprint, being a valuable screening tool (Karoui *et al.*, 2017).

Spectroscopy studies the interactions of electromagnetic radiation with matter that cause vibrational and rotational movements by absorbing energy from chemical compounds. The functional groups of the molecules have a unique vibrational frequency and the group of these groups results in a fingerprint that can be applied to confirm the identity of cheeses (Pasquini, 2018).

The spectra of absorption, emission and reflection in the infrared (IR) of molecular species originate from energy variations produced by molecular transitions from one vibrational or rotational energy state to another. The frequency of the absorbed radiation corresponds to the frequency of the molecular vibration responsible for the absorption, which is mainly limited to molecular species with small energy differences (Karoui *et al.*, 2017).

For a molecule to absorb IR radiation there is a variation in the dipole moment during its rotational-vibrational movement, causing variations in the positions and amplitude of the atoms, which are not fixed and oscillate continuously. Vibrations can be classified into the stretching and deformation categories, where a stretching vibration involves a continuous variation in the interatomic distance along the axis of bonding between two atoms and the deformation vibrations are characterized by the variation in the angle between two bonds (Lohumi *et al.*, 2015).

In the infrared region, greater emphasis has been given to spectroscopic techniques in the near (NIR) and mid-infrared (MIR), which, associated with chemometrics, have been used successfully for the authentication of cheeses, through qualitative and quantitative analysis (Kamal & Karoui, 2015; Medina *et al.*, 2019).

The structural information provided by NIR spectra is a result of the transition of two or more energy levels (overtones) due to the anharmonicity of fundamental vibrations. The bands are wider, less intense and more overlapping than MIR region and are related to combinations and resonances of H bonds with O, N and C (C-H, N-H and O-H) (Table 1). The reflectance and transmittance modes are commonly used, with reflectance being most applied in cheese analysis (Currò et al., 2017; Visconti et al., 2020)

Table 1. Bands and associations of functional groups in the MIR and NIR regions in cheese.

NIR		
Wavelength (nm)	Assignment	Reference
982, 1456, 1940	O-H, water	Cattaneo <i>et al.</i> (2005); Alinovi <i>et al.</i> (2019); Cevoli <i>et al.</i> (2013)
926, 1208-1214, 1390, 1728, 1762, 1878–1886, 2070, 2308, 2234-2348	C-H /C=O, fat	Cattaneo <i>et al.</i> (2005); Andueza <i>et al.</i> 2013;Holroyd <i>et al.</i> (2013)
1480–1550, 1502, 1584, 1620–1700, 2056, 2174	N-H, protein	Holroyd <i>et al.</i> (2013); Alinovi <i>et al.</i> (2019)
MIR		
Wavenumber (cm ⁻¹)	Associação	Referência
3700-3000	O-H, water	Fagan <i>et al.</i> (2007); Lerma-Garcia <i>et al.</i> (2010a); Leite <i>et al.</i> (2019)
2922,2852, 1460-1400, 951,64-721	C-H, fat	Cuibus <i>et al.</i> (2014); Andrade <i>et al.</i> (2018); Leite <i>et al.</i> (2019)
2200, 2924-1750, 1147-1000, 951,64 - 721	C=O, fat	Fagan <i>et al.</i> (2007); Andrade <i>et al.</i> (2018); Rodriguez-Soana <i>et al.</i> (2006)
1647-1550, 1700-1490	C=O/C-N/N-H, amides I and II	Andrade <i>et al.</i> (2018); Jesus <i>et al.</i> (2020)
1377 -1321, 1490–950	C-O/C-OH/ C-H, carbohydrates	Martin-del-campo <i>et al.</i> (2007); Andrade <i>et al.</i> (2018)

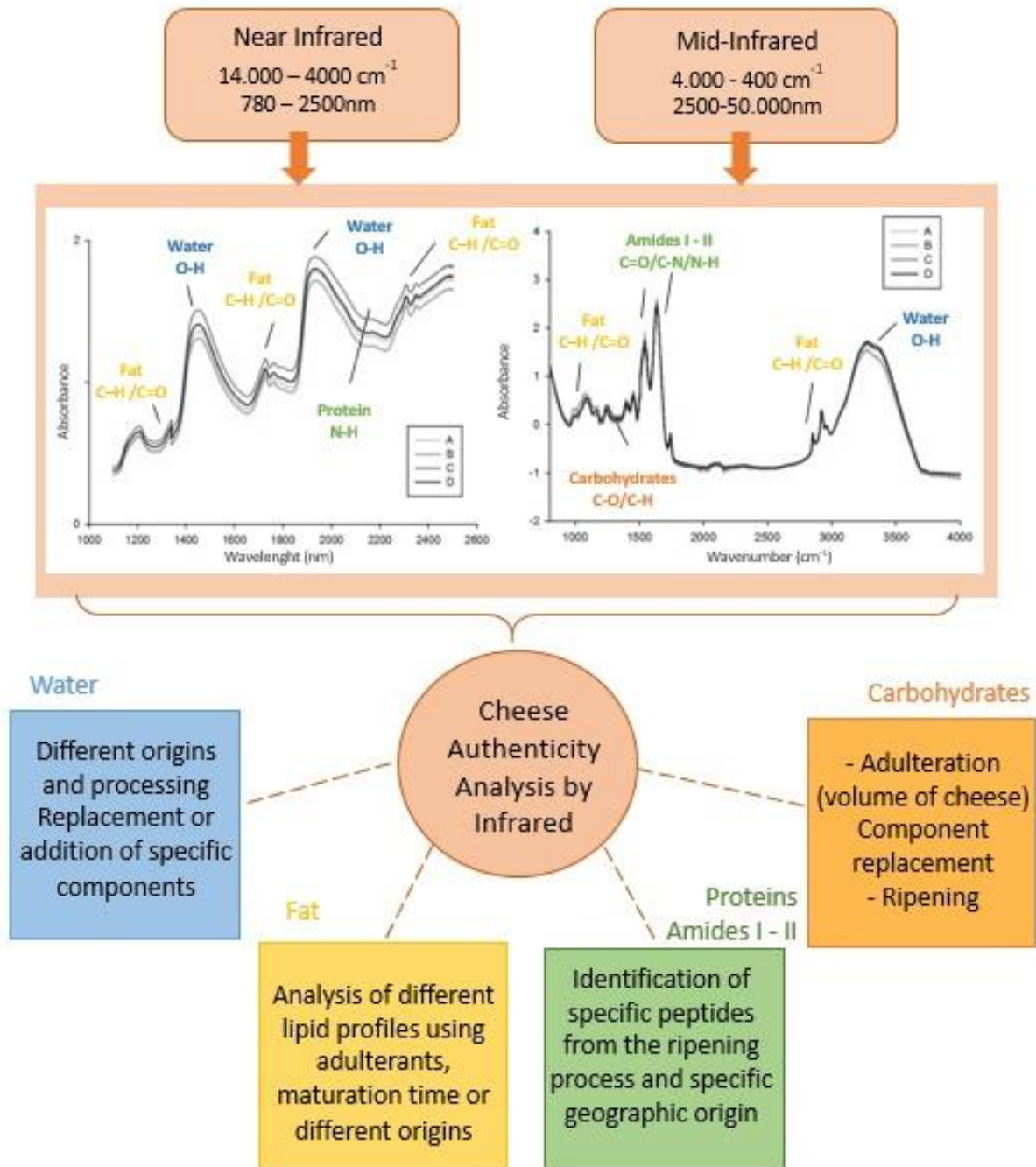
The MIR spectra occur by fundamental rotational-vibrational molecular vibrations and have more intense bands, relative to O-H, C-H, C=O, C-N, N-H (Table 1). The introduction of the technique Fourier Transform Infrared-Attenuated Total Reflectance (FTIR-ATR) has favored the use of infrared for cheese analysis, mainly in the MIR region, for it allows even faster analysis, due to the

reading in the surface of the sample and the analysis being performed simultaneously by interferometer (Cevoli *et al.*, 2013a; Lei *et al.*, 2019).

The assessment of authenticity in cheeses by MIR or NIR is based on the analysis of spectral behavior or specific bands, since these reflect the variations that occur in the physical-chemical, textural or composition aspects (Gori *et al.*, 2012). For the identification of origin, the bands originated by the vibration of the functional groups related to water (moisture or water activity) and fat have been used to indicate differences regarding the type of processing and the milk used, as well as the proteins / amides that allow the detection of region-specific peptides and variations in the absorption of these bands may occur, as seen in Figure 2 (Karoui *et al.*, 2005b; Sara *et al.*, 2018).

The adulterations caused by addition or replacement of components prohibited by law can lead to variations in the lipid, protein, carbohydrate (lactose) profile or changes in the moisture, which can be verified in the bands related to water, fat, proteins/amides and carbohydrates. (Leite *et al.*, 2019; Visconti *et al.*, 2020). The different ripeness stages that affect the physical-chemical and textural characteristics of the cheese and its authenticity can be analyzed by the bands referring to proteins / amides, fat, carbohydrates (lactose) for the identification of peptides or other products, specific to the proteolysis process. (Alinovi *et al.*, 2020; Jesus *et al.*, 2020; Andrade *et al.*, 2018). The mid and near infrared associated with chemometrics have previously been applied to several dairy products (fluid milk, powdered milk, butter and cheese whey) for the prediction of the chemical / physical-chemical composition (Koca *et al.*, 2010), quantification of adulterants and reconstituents (Botelho *et al.*, 2015; Andrade *et al.*, 2019) and identification of the mixture of milk of different species (Silva *et al.*, 2020), thus, the application of MIR and NIR has also been shown to be an emerging and innovative alternative to assess the authenticity of cheeses (Jesus *et al.*, 2020).

Figure 2. Spectral regions in near and middle infrared and cheese authenticity analysis.



4. Chemometrics and Cheese Authenticity

The spectral data obtained in the infrared analysis have several variables, with diverse information of chemical and physical nature, which are complex, highly correlated (multicollinearity), distributed throughout spectrum (Lei *et al.*, 2019). The application and success of methods

involving infrared spectroscopy depends directly on the application of appropriate multivariate techniques and without them, infrared spectroscopy would have limited application. With multivariate analysis is possible to promote the reduction of dimensionality and the extraction of essential information from the data set. This allows the use of infrared spectroscopy to authenticate the origin of the cheeses in terms of geographical origin, type of milk used, the manufacturing process, determination of quality parameters, composition data, absence of fraud by adulteration, as addition of undeclared substance on the cheese label (Abbas *et al.*, 2018; Medina *et al.*, 2019).

The analysis of infrared associated with chemometrics involves essential steps such as: (a) Sample preparation, even if minimal; (b) Obtention and (c) Treatment of the spectra; (d) Multivariate analysis; and (e), application to commercial samples, depending on the objective of the analysis (Lohumi *et al.*, 2015; Esteki *et al.*, 2018; Pasquini, 2018).

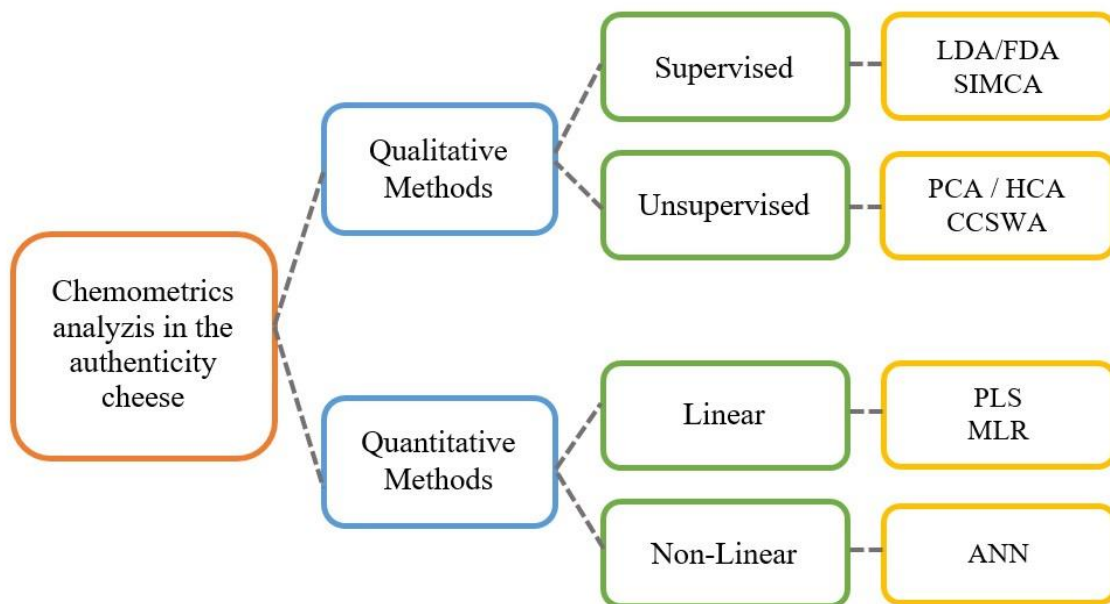
For most researches, the preparation of the cheese samples is minimal and what usually occurs is the reduction of its size through grating (Visconti *et al.*, 2020; Loudiyi *et al.*, 2018). The obtention and treatment of the spectra, in some cases, occurs with the raw spectra or is pre-processed with the application of baseline smoothing treatments or correction of the light parameters, such as Multiplicative Scatter Correction (MSC), Standard Normal Variate (SNV), first and second derivative for the removal of non-linear baseline deviations caused by the multiplicative scattering of light (Cevoli *et al.*, 2013a; González-Martín *et al.*, 2014; Andrade *et al.*, 2018).

The application of multivariate analysis can occur through the use of qualitative methods, of classification and recognition of patterns, and quantitative methods, of regression. Qualitative methods can be applied through the supervised or unsupervised learning method (Figure 3).

The unsupervised learning methods group the data set without the previous definition of specific categories or standards, whereas the supervised methods have a training/calibration step, based on a previous assignment of classes, in order to build mathematical models that will be used to predict

unknown objects and allocate them in groups they are most likely to belong, through correlations between classes, which are mutually independent (Esteki *et al.*, 2018).

Figura 3. Chemometric methods commonly used for cheese authentication.



For the organization of the data sets (training and validation) and selection of variables, the random method or the Kennard-Stone algorithm can be applied, which ensures that the most representative samples are selected, through a uniform scanning of spectral data (Botelho *et al.*, 2013).

Most research involving the authenticity of cheese starts with exploratory analysis of unsupervised data and continues with supervised learning steps, when the main objective includes product characterization and differentiation between them (González-Martín *et al.*, 2011a; Cevoli *et al.*, 2013a; Alinovi *et al.*, 2019), or also, they can be conducted directly by applying linear or non-linear methods for the classification and/or quantification of compounds (Sanchez *et al.*, 2018a; Bergamaschi *et al.*, 2020)

Studies for cheese authentication using qualitative chemometric tools were observed, with exploratory approaches and data classification, in an unsupervised way, such as Principal Component Analysis (PCA), Hierarchical Cluster Analysis (HCA) and Common Components and Specific Weights Analysis (CCSWA) (Andrade *et al.*, 2018), and supervised, as Soft Independent Modelling of Class Analogy (SIMCA) and Linear Discriminant Analysis (LDA) e Factorial Discriminant Analysis (FDA) (Karoui *et al.*, 2007; Visconti *et al.*, 2020), where, among the qualitative methods, LDA has been the most used.

Quantitative, regression methods and multivariate calibration were used to analyze the relationship between dependent and independent variables, through the construction of mathematical equations to perform the prediction and quantification of components (such as peptides of the ripeness process and adulterants), ripeness time prediction or of adulteration levels cheeses (González-Martín *et al.*, 2011b; Visconti *et al.*, 2020).

The application of linear methods such as Multiple Linear Regression (MLR) e Partial Least Squares Regression or Discrimination (PLSR/PLSD) (Jesus *et al.*, 2020) and non-linear methods, such as Artificial Neural Networks (ANN) (Cevoli *et al.*, 2013a; Guerra *et al.*, 2014) were observed, with PLS being the most used tool. Studies with satisfactory results and good classification obtained low Root Mean Square Error (RMSE), for both calibration (RMSEC) and validation (RMSEV) sets, high determination coefficient (R^2), good Residual Predictive Deviation (RPD) and low Range Error Ratio (RER) (Lima *et al.*, 2020).

5. Application of Spectroscopic Techniques for Cheese Authentication

5.1. Near infrared (NIR)

NIR spectroscopy has been widely applied for origin identification, adulteration analysis and verification of cheese ripeness stages (Table 2).

Table 2. Application of the NIR for cheese authenticity.

Type of Cheese	Technique	Analysis Proposal	Main Parameter	Chemometric analysis	Main results	References
Origin Identification						
Emmental cheese (Hard)	NIR Diffuse reflectance	Geographic origin identification	Cheeses from different regions and countries	PCA, LDA	Classification of success = 100% correct (LDA)	Pillonel <i>et al.</i> (2003)
Emmental cheese (Duro)	NIR Diffuse reflectance	Geographic origin identification	Cheeses from different countries	CCSWA, FDA	Classification of success = 89% (Calibration)/86.8% (validation) (FDA)	Karoui <i>et al.</i> (2005b)
Cheese (Soft)	NIR Diffuse reflectance	Cheese discrimination according to production process	Manufacturing process and production zone	PCA, LDA	Better results= 100% correct rating (LDA)	Karoui <i>et al.</i> (2006)
Emmental cheese (Hard)	NIR Diffuse reflectance	Color prediction of cheeses from different countries	Color parameters	PCA, PLSR	Classification of success= $R^2 = 0.82$, RMSECV=0.52, RPD=2.56 RER=9.42	Pillonel <i>et al.</i> (2007)
Bitto cheese (Semi-hard)	FT-NIR	Geographic origin identification of cheeses with PDO	Cheeses from different countries	PLSD	NER = 84.87% / RMSE=0.526-0.23	Cattaneo <i>et al.</i> (2008)
Idiazabel cheese (Hard)	NIR Reflectance	Geographic origin identification of cheeses with PDO	Ripeness Time	PLS	Better results= RMSE=0.103/R _{cal} = 0.95	Cattaneo <i>et al.</i> (2009)
Asiago d'Allevo cheese (Hard)	NIR Transflectance	Discrimination of cheeses from different production chains	Production chains (alps, mountains and plain)	FDA, PLSR	Correct rating= Sensitivity = 98.3% Specificity = 95.2% (FDA)	Cozzi <i>et al.</i> (2009)
Cheese (sheep)	NIR Reflectance	Differentiation of cheeses according to the production system (organic and non-organic)	Mineral composition (Ca, K, Mg, Na and P)	LDA, PLSR, PLSD	Classification of success rate (validation) = 90% (LDA) 97% (PLSD)	González-Martín <i>et al.</i> (2011a)
Cheese (cow, sheep and goat)	NIR Reflectance	Cheese discrimination by seasonality	Seasonality	PCA PLSR, PLSR	Correct Rating = 92% -97%	González-Martín <i>et al.</i> (2011b)
Asiago d'allevo cheese (Hard)	NIR Reflectance	Authentication by identifying the origin of cheese with PDO	Factory location, maturation, altitude of milk production,	PCA, PLSD	Classification of success rate = 100% (production period) (PLSD)	Ottavian <i>et al.</i> (2012)

Zamorano cheese (Hard and ripened)	NIR Transmittance	Differentiation of cheeses with PDO from minimum permitted limits	seasonality Chemical composition (Conformities and non-conformities)	PLSR	Best result = RMSE = 0.62 / R ² = 96.16% (fat prediction)	Oca <i>et al.</i> (2012)
Parmigiano-Reggiano cheese (Hard)	FT-NIR	Driscrimination of grated cheese with PDO	Conformities and non-conformities (rind content)	PCA, ANN SIMCA	Best rating = 95.5% (ANN) 80% (SIMCA)	Cevoli <i>et al.</i> (2013a)
Parmigiano-Reggiano cheese (Hard)	NIR Reflectance difusa	Driscrimination of grated cheese with PDO	Conformities and non-conformities (rind content)	PCA, ANN, PLSR	Correct classification > 91% (ANN) / R ² > 0.942 / RMSE = 0.805-2.22 (PLSR)	Cevoli <i>et al.</i> (2013b)
Abondance, Tomme de Savoie and Cantal cheeses	NIR Reflectance	Differentiation of cheese according to animal feeding regimes	Feeding regime (pasture and preserved forage)	PCA, PLSD	Classification of sucess rate = 0.91-0.96% (pasture) / 0.79-0.96% (forage)	Andueza <i>et al.</i> (2013)
Zamorano cheese (cow, sheep and goat)	NIR Reflectance	Cheese discrimination by seasonality and ripeness time	Volatile Compounds	PLSR	Best result = RSQ = 0.600-0.903.	Gonzalez-Martín <i>et al.</i> (2014)
Cheese (ripened)	NIR Transmittance	Cheese discrimination according to farming systems and sensory descriptions	Farming Systems	LDA	Best classification (Training) = 66.8% NIRS + VOCs = (94.3%)	Bergamaschi <i>et al.</i> (2020)
Adulteration						
Zamorano cheese (cow, sheep and goat)	NIR Reflectance	Determination of the milk percentage of different species (cow, sheep and goat)	Adulteration levels with milk mixtures of different species	PLSR	Better results= RSQ = 0.834% (cow) / 0.871% (goat) / 0.880% (sheep)	González-Martín <i>et al.</i> (2007)
Cheese (ripened)	NIR Reflectance	Differentiation of cheeses of different species based on peptides	Hydrophobic and hydrophilic peptides	PLSR	Best result = Quantification of 0 and 100% of milk species	Gonzalez-Martín <i>et al.</i> (2009)
Mozzarella cheese	NIR Reflectance	Calibration model for quality control and cheese authenticity	Chemical composition (permitted values)	MLR, PLSR	Better results RMSEP = 2.1 and 0.9%	Botelho <i>et al.</i> (2013)
Zamorano cheese (sheep and goat)	NIR Reflectance	Identification of adulteration and prediction of milk mixtures by fatty acid profile	Adulteration levels with milk mixtures of different species	PCA, ANN	Correct classification = 80% (training) / 75% (validation)	Soto-Barajas <i>et al.</i> (2013)

Cheese (Hard)	NIR Reflectance	Determination of adulteration by additives	Allowed and not allowed additives	PCA, SIMCA PLSD	Best results = Sensitivity, Specificity and Accuracy = 100%	Visconti <i>et al.</i> (2020)
Ripeness						
Crescenza cheese (fresh)	FT-NIR	Monitoring the freshness time of the cheese	Physical, chemical and rheological aspects	PCA	Sample discrimination by storage time	Cattaneo <i>et al.</i> (2005)
Zamorano cheese (cow, sheep and goat)	NIR Reflectance	Determination of the milk percentage in cheeses with different ripeness times	Ripeness time	PLSR	Identification of 100% of the cheeses (ripeness time and milk mixes)	González-Martín <i>et al.</i> (2007)
Cheese (ripened)	NIR Reflectance	Differentiation of cheeses of different species based on peptides	Hydrophobic and hydrophilic peptides	PLSR	Best result= RSQ=0.879 (soluble and insoluble peptides)	Gonzalez-Martín <i>et al.</i> (2009)
Zamorano cheese (Hard and ripened)	NIR Reflectance	Texture evaluation based on ripeness time	Texture	PLSR	RSQ=0.961	Revilla <i>et al.</i> (2009)
Edam cheese (Hard)	NIR Reflectance	Determination of maturation stage by predicting of free amino acids and soluble nitrogen	Ripeness stage	PLSR	R ² = 0.911 (soluble nitrogen), R ² = 0.929 (triptofano), R ² = 0.959 (tyrosine)	Mlček <i>et al.</i> (2011)
Cheese (cow, sheep and goat)	NIR Reflectance	Prediction of mineral composition (Ca, P, K, Na and Mg) according to maturation time	Maturation time and chemical composition	PLSR	Melhores resultados= RSQ =0.92 / 0.86 (SEP (C)) =0.71 / 0.13	González-Martín <i>et al.</i> (2011c)
Zamorano cheese (sheep and goat)	NIR Reflectance	Prediction of the degree of maturation according to the fatty acid profile	Ripeness time	ANN	Identified 100% of the cheeses (ripeness time)	Soto-Barajas <i>et al.</i> (2013)
Parmigiano-Reggiano cheese (Hard)	FT-NIR	Determination of authenticity by maturation time	Ripeness time (rind content)	PCA, SIMCA, ANN	Classification success rate = 95.5% (ANN) 80% (SIMCA), Prediction = 100% (ANN)	Cevoli <i>et al.</i> (2013a)
Parmigiano-Reggiano cheese (Hard)	NIR Reflectance	Determination of authenticity by maturation time	Ripeness time (rind content)	PCA, ANN, PLS	Classification >90% (Training and validation) (ANN) Prediction = R ² =0.95(PLS)	Cevoli <i>et al.</i> (2013b)
Cheese (cow, sheep and goat)	NIR Reflectance	Identification of volatile compounds by maturation time and milk	Ripeness time	PLSR	Classification success rate = RSQ = 0.903, SEC=0.091, SECV	González-Martín <i>et al.</i> (2014)

Olomouc cheese (creamy cheese type) Asiago d'allevo, Grana Padano, Montasio, Parmigiano- Reggiano and Piave cheeses	FT-NIR	mixture used Cheese discrimination according to shelf life	Ripeness time	LDA	=0.14 Grouping of samples with different storage times	Králová <i>et al.</i> (2014)
Parmigiano- Reggiano cheese (Hard)	NIR Transmittance	Prediction of cheese ripeness time	Proteolysis and Ripeness time	PLS	Best result R ² > 0.85	Currò <i>et al.</i> (2017)
	FT-NIR	Prediction of grated cheese rind content	Ripeness time (rind content)	PCA, PLSR	Best results = R ² > 0.93 (Calibration and cross-validation)	Alinovi <i>et al.</i> (2019)

NIR=near-infrared spectroscopy, FT-NIR = Fourier transform near-infrared spectroscopy; LDA=Linear Discriminant Analysis; FDA= Fatorial Discriminant Analysis; PCA=Principal Component analysis; CCSWA=Common Components and Specific Weights Analysis; SIMCA=Soft Independent Modelling of Class Analogy; ANN= Artificial Neural Network; MLR=Multiple Linear Regression; PLS=Partial Least Squares, PLSR= regression, PLSD = discriminant;NER= Non-error rate; RMSE=Root Mean Square, RMSEV of validation, RMSEC of calibration, RMSECV of cross validation; RSQ=Multiple Correlation Coefficients; SEC: Standard Error of Calibration; SECV: Standard Error of Cross-Validation; RPD=Residual Predictive Deviation; RER=Range Error Ratio; R= Correlation Coefficient ; R² = Determination coefficient ; PDO=Protected Designation of Origin.

As for the identification of origin, most investigations with the NIR involved differentiation by geographical origin, mainly of cheeses with protected origin (Cattaneo *et al.*, 2008; Oca *et al.*, 2012). The type of processing, the production chains (Karoui *et al.*, 2006; Cozzi *et al.*, 2009), the animal feeding (Andueza *et al.*, 2013; Bergamaschi *et al.*, 2020) and seasonality (Gonzalez-Martín *et al.*, 2011b; Gonzalez-Martín *et al.*, 2014) were also criteria used to differentiate cheeses by origin.

The use of NIR for this purpose occurred with grated samples, composed of the whole cheese as presented by Cozzi *et al.* (2009) and Andueza *et al.* (2013) and by rind or crumb for cheeses with different characteristics in its internal and external part due to the ripeness process, as observed by Karoui *et al.* (2005b) and Bergamaschi *et al.* (2020).

As for obtaining and treating spectra, most authors use raw spectra, such as Pillonel *et al.* (2003) and Karoui *et al.* (2005b), whereas Oca *et al.* (2012) applied the SNV treatments for light correction and Cevoli *et al.* (2013a) and Cevoli *et al.* (2013b) used the MSC, obtaining a reduction in the number of latent variables in application of multivariate analysis and a higher percentage of explanation of the variability of the original data.

The chemical composition and physical-chemical characteristics of the cheeses are reflected in the NIR spectra, parameters that have contributed to their differentiation in several studies. González-Martín *et al.* (2011a) and Oca *et al.* (2012) pointed out that spectral differences may be related to the food consumed by the animals, pasture conditions, breed and stage of animal lactation or also heat treatment used for milk, and according to Cozzi *et al.* (2009) the analysis of the bands related to the stretching and deformation of groups CH and CH₂ of the lipid molecules can help to identify cheeses produced in different places and in the visualization of the existing differences in the content and profile of fatty acids. The chemometric methods commonly used for the differentiation

between the samples by origin applied mainly LDA / FDA but also, works were observed applying the PCA and the PLS. Karoui *et al.* (2005b) differentiated Emmental cheeses from European regions through the NIR and applying LDA / FDA according to physico-chemical characteristics, resulting in 86.8%-100% of correct classification. A similar result was obtained by Karoui *et al.* (2006) when applying the FDA with NIR on cheeses from different production zones obtaining 90.7% and 80.6% of correct classification of the calibration and validation, respectively. The application of PLS in the study of Ottavian *et al.* (2012) also proved to be useful in differentiating the NIR spectra in relation to the production period of Asiago d'allevo cheeses, obtaining 100% correct classification, similar to achieved with the direct evaluation of chemical properties.

The use of PLSR to predict the percentage of compounds important for the identification of origin has also been observed in some studies. It was observed with Pillonel *et al.* (2007) that the NIR can be used to predict color parameters in Emmental cheeses from different regions of Europe, mainly the b^* value, since satisfactory results were obtained ($R^2 = 0.82$, $RMSECV = 0.52$), through the application of calibration models. The measurement of volatile compounds in Zamorano cheeses was also performed through the combination of NIR and PLS in the study of González-Martín *et al.* (2014), that obtained $RSQ = 0.600-0.903$, in which the robustness of the method was confirmed when it was applied to new samples, of different compositions, not belonging to the calibration step. For the study of cheese adulteration, the NIR also proved to be a useful, sensitive and good tracking tool, especially when associated with precise chemometric methods. The application of the NIR with the PLSR brought produced results than when the ANN was applied to verify the adulteration of cheeses with mixtures of cow, sheep and goat milk in Zamorano cheeses produced on a laboratory scale, to predict the percentage of milk added with the PLSR the $RSQ > 0.834$ was obtained (González-Martín *et al.*, 2007; Gonzalez-Martín *et al.*, 2009), while with ANN this prediction resulted in the correct classification of 75% of unknown samples in the validation step (Soto-Barajas *et al.*, 2013).

Botelho *et al.* (2013) also applied NIR spectroscopy and PLSR to investigate the conformity of the percentages on Mozzarella cheese components (mainly fat and moisture) to perform the inspection control, obtaining a good prediction of these components, with satisfactory RMSEs (between 2.1 and 0.9%, respectively).

Visconti *et al.* (2020) used the NIR to detect the presence of allowed additives added in excess (cellulose, silicon carbon dioxide) and not allowed (wheat flour, wheat semolina and sawdust) used to increase the volume of hard cheeses in Argentina. The spectra were pre-treated using the MSC, SNV, first and second derivatives to compensate for systematic light variations and the data were randomized using the Kennard-Stones algorithm, ensuring their randomization and when applying SIMCA and PLSD, the sensitivity, specificity and precision obtained were 100% in discriminating samples in their specific classes.

The investigation of the cheese ripeness stage has been widely carried out through the NIR and the identification of proteins and amino acids, during and after the maturation process, proved to be important for this evaluation. Miček *et al.* (2011) applied the NIR in reflectance mode to assess the ripeness stage of Edam cheese, using a PLSR calibration model for the prediction of soluble nitrogen, tryptophan and tyrosine, obtaining correlation coefficients: $R = 0.911$, $R = 0.929$ and $R = 0.959$, respectively. Studies of González-Martín *et al.* (2007) and González-Martín *et al.* (2009) quantified the hydrophobic (bigger) and hydrophilic (smaller) peptides to identify the ripeness stage of cheeses with milk mixtures using the NIR associated with PLSR, with $RSQ = 0.879$ and classification of 100% of the peptides.

The rind content of Parmigiano-Reggiano ripened cheeses (with DPO) was also verified for this purpose by Cevoli *et al.* (2013a) and Alinovi *et al.* (2019), since these cheeses must comply with the maximum allowed of <18% of rind to ensure the protected origin. The authors indicated that the rind and crumb of these cheeses were grated separately for the analysis and the data were pre-treated by MSC, SNV, first and second derivatives (Savitsky-Golay), using all spectral data and

also selected regions. It was observed that the most important bands included the regions between 1064-1335 nm and 1933-2357 nm that presented different absorbances according to the reduction in the moisture of the crumb. Cevoli *et al.* (2013a) applied the ANN and obtained a classification of ripeness stages >90% and Alinovi *et al.* (2019) with PLSR found crumb content with satisfactory prediction, with $R^2 > 0.93$ in calibration and cross-validation.

The spectral resources of the NIR also reflected the textural changes that occurred in cheese during ripening in the study by Revilla *et al.* (2009), with the application of spectroscopy with PLSR calibration in Zamorano cheeses, a good predictive capacity was obtained with $RSQ=0.961$.

5.2. Middle Infrared (MIR)

MIR spectroscopy has been used to assess cheeses authenticity with wide applicability in scientific research and approaches related to the identification of origin, analysis of adulterants and identification of maturation, with not only discrimination between cheeses, but also the quantification and prediction of desirable or unwanted substances and compounds (Rodriguez-Saona *et al.*, 2006; Sanchez *et al.*, 2018b).

For the analysis of origin identification, it was observed that in the MIR spectroscopic region, the FTIR-ATR had greater application between 2002 and 2020, with LDA/FDA and PCA being the most explored chemometric tools to discriminate cheeses (Table 3). PDO cheeses such as Gruyère and L'Etivaz had their origin investigated by Karoui *et al.* (2005a) and Karoui *et al.* (2007) and both studies used raw spectra, without previous treatment for the application of multivariate analysis. FDA was applied to PCA scores in spectral regions $900-1500\text{ cm}^{-1}$ (related to the C, H and O bonds, referring to carbohydrates), $1500-1700\text{ cm}^{-1}$ (concerning amides I and II) and $2800-3000\text{ cm}^{-1}$ (corresponding to the methyl and methylene groups of fatty acids), obtaining correct classification rates, varying between 80% and 90.9%.

Table 3. Application of MIR for cheese authenticity

Type of Cheese	Technique	Analysis Proposal	Main Parameter	Chemometric analysis	Main results	References
Origin Identification						
Emmental cheese (Hard)	MIR/FTIR-ATR	Cheese discriminations according to milk used in manufacturing	Type of milk used in manufacture	LDA	Classification success rate =87%	Picque <i>et al.</i> (2002)
Emmental cheese (Hard)	MIR-Transmittance /MIR-ATR	Geographic origin identification	Cheeses from different regions and countries	PCA, LDA	Classification success rate =100% correct rating (MIR-Transmittance) = 72% (MIR-ATR)	Pillonel <i>et al.</i> (2003)
Emmental cheese (Hard)	MIR-Transmittance	Geographic origin determination of cheeses produced in the summer	Cheeses from different countries	PCA, FDA CCSWA	Classification success rate =77% correct rating (validation) (FDA)	Karoui <i>et al.</i> (2004a)
Emmental cheese (Hard)	MIR-Transmittance	Geographic origin determination of cheeses produced in the summer and winter	Cheeses from different countries	PCA, FDA, CCSWA	Classification success rate =76.7% of correct rating in validation (FDA)	Karoui <i>et al.</i> (2004b)
Gruyère and L'Etivaz cheese (Hard)	MIR-FTIR	Geographic origin determination of cheeses with PDO	Cheeses from different countries	PCA, FDA	Classification success rate = 80% (FDA)	Karoui <i>et al.</i> (2005a)
Emmental cheese (Hard)	MIR-Transmittance	Geographic origin determination	Cheeses from different countries	CCWA, FDA	Classification success rate= 84,1% (Calibration) and 85,7% (validation)	Karoui <i>et al.</i> (2005b)
Cheese (soft)	MIR-ATR	Cheese discrimination by production process	Manufacturing process and production zone	PCA, LDA	Correct rating = 64.8% e 33.3% (LDA)	Karoui <i>et al.</i> (2006)
Swiss cheese (Semi-hard)	MIR- FTIR-ATR	Cheese discrimination by chemical composition	Chemical composition and maturation of cheese	SIMCA, PLSR	Best result= SECV= 0.21% R> 0.96	Rodriguez-Saona <i>et al.</i> (2006)
Cheese (soft)	MIR-ATR	Cheese discrimination by production process	Manufacturing process and sampling zone	PCA, LDA	Classification success rate= 83,3%	Karoui <i>et al.</i> (2006)
Gruyère and L'Etivaz Cheese (Hard)	MIR-ATR	Geographic origin determination of cheeses with PDO	Maturation classification	PCA, FDA	Classification success rate= 90,9%	Karoui <i>et al.</i> (2007)

Swiss cheese (Hard)	MIR-FTIR-ATR	Differentiation of cheeses according to ripeness time	Short chain fatty acids	PLSR	Better results= R=0,98, R=0,95 and R = 0,92 (propionic, acetic and butyric acid)	Koca <i>et al.</i> (2007)
Cheddar cheese (Semi-hard and ripened)	MIR -FTIR	Differentiation of cheeses according to the quality of flavor	Different production areas	SIMCA – PCA	Samples classified into distant categories (CDI> 3.0)	Subramanian <i>et al.</i> (2009)
Pecorino cheese (Semi-hard and ripened)	MIR-FTIR	Discrimination of cheese with PDO	Manufacturing technique and maturation time	LDA	Classification success rate= >95% (validation)	Lerma-García <i>et al.</i> (2010)
Parmigiano-Reggiano and grana type cheese (Hard and ripened)	MIR-FTIR-ATR	Discrimination of grated cheese	Cheese from different countries (with and without PDO)	PCA, LDA	Classification success rate=100% (prediction)	Gori <i>et al.</i> (2012)
Buffalo Mozzarella and Buffalo milk cheese	MIR-FTIR-ATR	Differentiation of cheeses	Production process and geographical origin	Avaliação qualitativa	Separation between spectra	Coroian <i>et al.</i> (2012)
Parmigiano-Reggiano cheese (Hard)	MIR-FTIR-ATR	Discrimination of grated cheese with PDO	Conformities and non-conformities (rind content)	PCA, SIMCA, ANN	Classification success rate= 96.7% (ANN) 100%(SIMCA)	Cevoli <i>et al.</i> (2013a)
Parmigiano-Reggiano cheese (Hard)	MIR-FTIR-ATR	Discrimination of grated cheese with PDO produced with supplemented milk	Animal diet type	ANN	Best result = Correct classification with accuracy > 93%	Guerra <i>et al.</i> (2014).
Cheese (soft, cooked and pressed)	MIR-FTIR	Differentiation of cheese with PDO according to genetic parameters and production process	Genetic parameters and production process	PLSR	Best result = R ² =0.89	Sanchez <i>et al.</i> (2018a)
Cheese (soft, cooked and pressed)	MIR-FTIR	Evaluation of milk composition and cheese production process	Genetic parameters and production process	PLSR	Best result = R ² =0.89	Sanchez <i>et al.</i> (2018b)
Buffalo Mozzarella cheese	MIR-FTIR	Discrimination and authenticity of cheeses with PDO by type of production.	Traditional and industrial production process	Regressão Logística	Classification error ≤ 0	Sara <i>et al.</i> (2018)
Cheese (soft, cooked and pressed)	MIR	Differentiation of cheese with PDO by production characteristics	Milk production properties	PLSR	Better results = R ² ≥ 0.70 (prediction), RPD≥1.8	Jabri <i>et al.</i> (2019)
Cheese (soft,	MIR	Origin identification of	Prediction of the	PLSR	Best result = R ² > 0.66	Jabri <i>et al.</i> (2020)

cooked and pressed)		cheeses with PDO by milk properties	chemical composition of milk		(external validation)	
Cheese (ripened)	MIR-FTIR	Cheese discrimination according to farming systems	Farming Systems	LDA	Classification success rate= 97,4% (Training) 73,5% (Validation)	Bergamasch <i>et al.</i> (2020)
Adulteration						
Dalia cheese (Sem-Hard)	MIR-FTIR-ATR	Discrimination of adulterated cheese	Adulteration levels with palm oil	PLSR	Best result = $R^2=0.9695$ (prediction) Better results= $R^2= 0.997-0.998$	Cuibus <i>et al.</i> (2014)
Butter cheese	MIR-FTIR-ATR	Characterization and detection of adulteration of cheese with soy oil	Adulteration levels with soy oil	PCA, PLSR	RMSE=1.780-1.397 (calibration and validation)	Leite <i>et al.</i> (2019)
Ripeness						
Crescenza cheese (fresh)	MIR-FTIR-ATR	Monitoring the freshness time of the cheese	Physical, chemical and rheological aspects	PCA	Grouping of samples according to storage time	Cattaneo <i>et al.</i> (2005)
Emmental cheese	MIR-Transmittance	Determination of maturation time according to the profile of soluble amino acids	Prediction of soluble (WSN) and insoluble (NPN) amino acids	PCA, PLSR	Best result = Prediction of WSN = $R^2 = 0.80$ / RPD =2.22, Prediction of NPN = $R^2=0.71$ / RPD=1.85, Prediction of WSN= $R^2 = 0.62$, and age= $R^2 = 0,88$)	Karoui <i>et al.</i> (2006)
Cheddar cheese	MIR-ATR	Cheese ripeness and age prediction	WSN, sensory and textural attributes	PLSR		Fagan <i>et al.</i> (2007)
Camembert cheese (soft and ripened)	MIR-ATR	Evaluation and prediction of ripeness time	Ripeness Time (rind and crumb content)	PCA, PLS	Best result = Prediction of ripeness time= $R^2=0.97$	Martín-del-Campo <i>et al.</i> (2007a)
Camembert cheese (soft and ripened)	MIR-ATR	Characterization of maturation times by physical-chemical parameters	Ripeness Time	PLS	Best result = $R^2>0.81$ /RPD>2 (validation) $R^2=0.73$ /RPD=2.01 (calibration)	Martín-del-Campo <i>et al.</i> (2007b)
Pecorino cheese (Hard and semi-hard, ripened)	MIR-FTIR-ATR	Differentiation of maturation time identification and manufacturing technique	Ripeness time and manufacturing technique	LDA	Classification success rate= >95% (ripeness time)	Lerma-García <i>et al.</i> (2010a)

Cheddar cheese	MIR-FTIR-ATR	Monitoring of ripeness time	Amino Acids and Organic Acids	PLSR	Best result = R=0.97	Subramaian <i>et al.</i> (2011)
Parmigiano-Reggiano cheese (Hard)	MIR- FTIR	Determination of authenticity by ripeness time	Ripeness Time (rind content)	PCA, SIMCA, ANN	Classification success rate=96.7% Prediction=100% (ANN) / 100% (SIMCA)	Cevoli <i>et al.</i> (2013a)
Norvegia cheese	MIR -FTIR	Prediction of sensory attributes according to ripeness time	Maturation time, chemical and sensory analysis	PLSR	High correlation coefficient ($R^2>0,9$) (prediction)	Kraggerud <i>et al.</i> (2014)
Pecorino, gouda and sheep milk cheese	MIR-FTIR-ATR	Differentiation of the maturation time of (different cheeses)	Ripeness time classification	HCA, PCA	Formation of groups by maturation stage classes	Andrade <i>et al.</i> (2018)
Minas Artesanal cheese	MIR-FTIR-ATR	Maturation time identification	Prediction of maturation stages	PCA, MLR,PLSR	R=0.96(rind) (RLM) R ² =0.90 (crumb) (PLSR)	Jesus <i>et al.</i> (2020)

FTIR=Fourier Transform Infrared Spectroscopy; ATR=Attenuate Total Reflectance; LDA=Linear Discriminant Analysis;; FDA= Fatorial Discriminant Analysis;; PCA=Principal Component analysis; CCSWA=Common Components and Specific Weights Analysis; SIMCA=Soft Independent Modelling of Class Analogy; ANN= Artificial Neural Network; MLR=Multiple Linear Regression; PLS=Partial Least Squares, PLSR= regression, PLSD = discriminant; HCA= Hierarchical cluster analysis; NER= Non-error rate; RMSE=Root Mean Square, RMSEV of validation, RMSEC of calibration, RMSECV of cross validation; RSQ=Multiple Correlation Coefficients; SEC: Standard Error of Calibration; SECV: Standard Error of Cross-Validation; RPD = Residual predictive deviation R= Correlation Coefficient ; R² = Determination coefficient; CDI= Intraclass distance; PDO=Protected Designation Of Origin, WSN=Water-Soluble Nitrogen.

The results found by Gori *et al.* (2012) and Cevoli *et al.* (2013a) indicated 100% discrimination in relation to the origin of grated samples of Parmigiano-Reggiano cheeses when applying the LDA (Gori *et al.*, 2012) and > 93.2% correct classification using ANN (Cevoli *et al.*, 2013a), demonstrating that the FTIR-ATR has good predictive capacity and is suitable for the classification and discrimination of cheeses produced in different locations.

The geographical origin of Emmental cheeses was identified by MIR based on the seasonality in the studies of Pillonel *et al.* (2003), Karoui *et al.* (2004a), Karoui *et al.* (2004b) and Karoui *et al.* (2005b), while Picque *et al.* (2002) differentiated these cheeses based on the origin of the milk used in production, applying the multivariate PCA analyzes, CCSWA and ALD, and for all the mentioned studies, the application of the LDA with MIR provided the correct classification of the cheeses varying between 76.7% and 100%.

However, the use of PLSR to predict the genetic parameters, production processes and chemical composition of the milk used, in the studies by Sanchez *et al.* (2018a), Sanchez *et al.* (2018b) and Jabri *et al.* (2019), respectively, presented better results ($R^2= 0.66-0.89$) than those obtained by Bergamaschi *et al.* (2020) when using the LDA to discriminate the agricultural production of cheeses, since it obtained a correct classification of 73.5% in the validation stage.

The investigation of adulterations in cheese through MIR has been shown to be effective, especially when associated with chemometrics. The FTIR-ATR proved to be useful in identifying different sources of fat added to cheese. Palm oil fat and soy oil in Dalia cheese and Butter cheese were found by Cuibus *et al.* (2014) and Leite *et al.* (2019), respectively. Cuibus *et al.* (2014) used a PLS regression model for the detection of small percentages of palm oil and obtained satisfactory results with $R^2=0.9695$, demonstrating a good quality in the adjustment of the model. In the work of Leite *et al.* (2019), the levels of adulteration of soy oil reflected in the behavior of the spectra, in which the lipid bands (1743 cm^{-1} , 2852 cm^{-1} , 2922 cm^{-1} and 3007 cm^{-1}) related to $-C=C-H$ of unsaturated fatty acids were more intense in adulterated cheeses, with $R^2=0.997-0.998$ and low RMSE values

(1.780-1.397, calibration and validation, respectively), indicating a good adjustment of the regression model.

In addition to direct application in cheeses, the MIR (FTIR-ATR) has also been applied to check adulterations in the milk that can be used in the cheese production, with adulterations being identified as the mixture of milk of different species (Silva *et al.*, 2020); presence of water or whey to increase the volume of milk, with the addition of density reconstitutes (starch, sucrose and urea); compounds to mask acidity (sodium hydroxide and sodium bicarbonate), to conserve milk (hydrogen peroxide) and to simulate the increase of protein content (urea) (Conceição *et al.*, 2019). Silva *et al.* (2020), used ANN to identify milk mixtures of different species and obtained RMSE=0.23 and $R > 95.5\%$, while Conceição *et al.* (2019) obtained, in prediction of all adulterants, a classification rate $>76.6\%$, indicating that the use of mid-infrared proves to be effective in screening adulterations.

The monitoring of the cheese ripeness time through the use of MIR (FTIR-ATR) was carried out, mainly, associated with PLS (Karoui *et al.*, 2006; Kraggerud *et al.*, 2014; Jesus *et al.*, 2020). Karoui *et al.* (2006) quantified and predicted the water-soluble nitrogen content (WSN) in Emmental cheese, with $R^2=0.80$. Similar results were also found by Fagan *et al.*, (2007) when evaluating Cheddar cheeses and obtained $R^2=0.88$ in the prediction of WSN and $R^2=0.62$ in the identification of the cheese ripeness time, with emphasis on the regions $930-1767\text{ cm}^{-1}$ and $2839-4000\text{ cm}^{-1}$.

The MIR (FTIR-ATR) also proved to be efficient in identifying the changes that occurred during the maturation of Minas Artesanal cheeses (Jesus *et al.*, 2020). When evaluating fractions of the rind and crumb of the cheeses, the authors obtained a better model for the crumb, with $R^2=0.92$, RMSEV=5.3 days, RPD=3.79, with the most important variables: the bands $1628-1564\text{ cm}^{-1}$ associated with Amides I and Amides II, $1374-1311\text{ cm}^{-1}$ and $1184-1135\text{ cm}^{-1}$ related to C-O, C-C and C-H referring to esters and lipids, confirming that changes occur to them during ripeness. Thus,

it was possible to determine the cheese maturation time, indicating that this is a safe technique for verifying the Minas Artesanal cheeses authenticity.

Good correlations were obtained with the application of MIR to predict the maturation of Camembert cheeses, evaluating the soluble and insoluble nitrogen fractions ($R^2=0.96-0.97$ and $R^2=0.73-0.84$ for calibration and validation, respectively) (Martín-del-Campo *et al.*, 2007a; Martín-del-Campo *et al.*, 2007b). The ripeness stages of Pecorino cheeses were also classified by Lermargarcía *et al.* (2010a) applying the LDA on the spectral data of the FTIR-ATR and the obtained models were able to discriminate the cheeses in 3 different maturation stages with a classification rate >95%.

Qualitative methods like HCA and PCA associated with MIR were also applied by Andrade *et al.* (2018) in Pecorino and Gouda cheeses, in which the difference between the spectra was observed according to the increase in the ripeness time of the cheeses. In addition, these differences were evidenced with the formation of groups and clusters by type of cheese and ripeness classes when multivariate analysis were applied. The amides I and II (1500 to 1700 cm^{-1}) lipids and carbohydrates regions (3000 to 2800 cm^{-1} and 1765 to 1730 cm^{-1}) were important for this separation.

The studies presented confirm that MIR and NIR spectroscopy are adequate methods for verifying the authenticity of cheeses with wide applicability, since they allow not only discrimination of authentic and non-authentic samples but also the prediction of important chemical components, especially when combined with chemometric tools. Both techniques have been widely used in the food industry due to high spectral stability and versatility in application, both in qualitative and quantitative analysis, demonstrating their progress and continuous expansion (Esteki *et al.*, 2018).

6. Conclusions and Future Trends

Food safety and the consumption of products with original and / or regional characteristics have been the focus of consumers. The authenticity of cheeses requires extensive monitoring and the development of specific and efficient analytical methods to ensure consumer safety and satisfaction. The study of the application of infrared spectroscopy techniques to cheese authenticity in a specific way was carried out with this study.

In recent decades, middle and near infrared techniques have been presented as adequate tools for the authenticity of cheeses due to robustness of methods and the ability to reveal qualitative and quantitative characteristics about the product using a fingerprint with valuable information, and also by low operational cost and quickness on application.

The association of spectroscopy with chemometric methods makes even more promising the possibility of incorporating these techniques in reference laboratories and industries for the screening of authenticity.

Research carried out in recent years has shown that MIR (FTIR-ATR) showed wide applicability in the identifying cheese origin and NIR (reflectance) was more prevalent in studies on cheese ripeness, with discriminant analysis and PLS being the most applied techniques and the most suitable to be used in conjunction with the MIR and NIR. More specific studies using cheese and extracts of its compounds and also more comparative studies between spectroscopic methods for classification, discrimination and prediction are needed to optimize the performance of both techniques and improve their use in precise control and sorting of the product.

Author contributions

Larissa Kauly Rosa Silva: Conceptualization, Data curation, Investigation, Methodology, Project administration, Writing-original draft. Leandro Soares Santos: Supervision, Project administration,

Writing-review & editing. Sibelli Passini Barbosa Ferrão: Supervision, Project administration, Writing-review & editing.

Declaration of competing interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgements

The authors would like to acknowledge the “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)” and “Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB)” for providing study scholarships.

References

- Abbas, O., Zadavec, M., Baeten, V., Mikuš, T., Lešić, T., Vulić, A., Prpić, J., Jemeršić, L., & Pleadin, J. (2018). Analytical methods used for the authentication of food of animal origin. *Food Chemistry*, 246(25), 6-17.
- Alewijn, M., Wehrens, R., Saskia, M., & Ruth, V. (2018). Robust detection methodology of milk heat treatment in cheese based on volatile profile fingerprinting. *International Dairy Journal*, 85(1), 211-218.
- Alinovi, M., Mucchetti, G., & Tidona, F. (2019). Application of NIR spectroscopy and image analysis for the characterisation of grated Parmigiano-Reggiano cheese. *International Dairy Journal*, 92(1), 50-58.
- Andrade, J., Pereira, C. G., Almeida Junior, J. C., Viana, C. C. R., Neves, L. N. O., Silva, P. H. F., Bell, M. J. V., & Anjos, V. C. (2019). FTIR-ATR determination of protein content to evaluate whey protein concentrate adulteration. *LWT- Food Science and Technology*, 99(1), 166-172.

- Andrade, J., Pereira, C. G., Ranquine, T., Azarias, C. A., Bell, M. J. V., & Anjos, V. C. (2018). Long-Term Ripening Evaluation of Ewes' Cheeses by Fourier-Transformed Infrared Spectroscopy under Real Industrial Conditions. *Journal of Spectroscopy*, 2018(1), 1-9.
- Andueza, D., Agabriel, C., Constant, I., & Lucas, A. (2013). Using visible or near infrared spectroscopy (NIRS) on cheese to authenticate cow feeding regimes. *Food Chemistry*, 14(1), 209-214.
- Barreto, A., Cruz-Tirado, J. P., Siche, R., & Quevedo, R. (2018). Determination of starch content in adulterated fresh cheese using hyperspectral imaging. *Food Bioscience*, 21(1), 14-19.
- Bergamaschi, M., Cipolat-Gotet, C., Cecchinato, A., Schiavon, S., & Bittante, G. (2020). Chemometric authentication of farming systems of origin of food (milk and ripened cheese) using infrared spectra, fatty acid profiles, flavor fingerprints, and sensory descriptions. *Food Chemistry*, 305(1), 125480.
- Botelho, B. G., Mendes, B. A. P., & Sena, M. M. (2013). Development and analytical validation of robust near-infrared multivariate calibration models for the quality inspection control of Mozzarella cheese. *Food Analytical Methods*, 6(3), 881-891.
- Botelho, B. G., Reis, N., Oliveira, L. S., & Sena, M. M. (2015). Development and analytical validation of a screening method for simultaneous detection of five adulterants in raw milk using mid-infrared spectroscopy and PLS-DA. *Food chemistry*, 181(1), 31-37.
- Brasil (2017) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. RIISPOA. Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Diário Oficial da União. Retrieved from https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2015-2018/2017/decreto/d9013.htm. Accessed December 07, 2020.
- Cattaneo, T. M. P., Giardina, C., Sinelli, N., Riva, M., & Giangiacomo, R. (2005). Application of FT-NIR and FT-IR spectroscopy to study the shelf-life of Crescenza cheese. *International Dairy Journal*, 15(6-9), 693-700.

Cattaneo, T. M. P., & Barzaghi, S. (2009). Outer Product Analysis Applied to near Infrared and Mid Infrared Spectra to Study a Spanish Protected Denomination of Origin Cheese. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 17(3), 135-140.

Cattaneo, T. M. P., Tornelli, C., Erini, S., & Panarelli, E. V. (2008). Relationship between Sensory Scores and near Infrared Absorptions in Characterising Bitto, an Italian Protected Denomination of Origin Cheese. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 16(3), 173-178.

Cevoli, C., Fabbri, A., Gori, A., Caboni, M. F., & Guarnieri, A. (2013b). Screening of grated cheese authenticity by nir spectroscopy. *Journal of Agricultural Engineering*, XLIV(s2), 264-267.

Cevoli, C., Gori, A., Nocetti, M., Cuibus, L., Caboni, M. F., & Fabbri, A. (2013a). FT-NIR and FT-MIR spectroscopy to discriminate competitors, non compliance and compliance grated Parmigiano Reggiano cheese. *Food Research International*, 52(1), 214-220.

Codex Alimentarius. (2018). General standard for cheese: Codex Stan 283–1978. Codex Alimentarius Commission, joint FAO/WHO food standards program. Retrieved from URL <http://www.fao.org/fao-who351>. Accessed December 07, 2020.

Conceição, D. G., Gonçalves, B. R. F., Hora, F. F., Faleiro, A. S., Santos, L. S., & Ferrão, S. P. B. (2019). Use of FTIR-ATR Spectroscopy Combined with Multivariate Analysis as a Screening Tool to Identify Adulterants in Raw Milk. *Journal of Brazilian Chemical Society*, 30(4), 780-785.

Coroian, A., Trif, M., Coroian, C. O., Mireşan, V., Răducu, C., & Dărăban, S. (2012). Qualitative evaluation of buffalo cheese using FTIR spectroscopy. *International Journal of the Bioflux Society*, 4(2), 66-70.

Cozzi, G., Ferlito, J., Pasini, G., Contiero, B., & Gottardo, F. (2009). Application of Near-Infrared Spectroscopy as an Alternative to Chemical and Color Analysis To Discriminate the Production Chains of Asiago d'Allevo Cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(24), 11449-11454.

Cuibus, L., Maggio, R., Mureşan, V., Diaconeasa, Z., Fetea, F., & Socaciu, C. (2014). Preliminary Discrimination of Cheese Adulteration by FT-IR Spectroscopy. *Food Science and Technology*, 71(24), 142-146.

Currò, S., Manuelian, C. L., Penasa, M., Cassandro, M., & De Marchi, M. (2017). Feasibility of near infrared transmittance spectroscopy to predict cheese ripeness. *Journal of Dairy Science*, 100(11), 8759-8763.

Danezis, G. P., Pappas, A. C., Tsiplakou, E., Pappa, E. C., Zacharioudaki, M., Tsagkaris, A. S., Papachristidis, C. A., Sotirakoglou, K., Zervas, G., & Georgiou, C. A. (2020). Authentication of Greek Protected Designation of Origin cheeses through elemental metabolomics. *International Dairy Journal*, 104(1), 104599.

Dias, C., & Mendes, L. (2018). Protected Designation of Origin (PDO), Protected Geographical Indication (PGI) and Traditional Speciality Guaranteed (TSG): A bibliometric analysis. *Food Research International*, 103(1), 492-508.

Esteki, M., Shahsavaria, Z., & Simal-Gandara, J. (2018). Use of spectroscopic methods in combination with linear discriminant analysis for authentication of food products. *Food Control*, 91(1), 100-112.

EU (2002). Commission Regulation (EC) N° 178/2002 of the European Parliament and of the Council of 28, 450, January 2002. Official Journal of the European Union, L 031 Retrieved from <http://www.legislation.gov.uk/eur/2002/178/contents>. Accessed December 07, 2020.

EU (2011). Commission Regulation (EC) N° 1129/2011. Official Journal of European Union. L 365 295/1. Retrieved from <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:295:0001:0177:EN:PDF> Accessed 07/11/2020.

FAO (2019). Food Agriculture Organization of the United Nations. Gateway to dairy production and products. Retrieved from <http://www.fao.org/dairy-production-products/products/codex-alimentarius/en/>. Accessed December 07, 2020.

Fagan, C. C., O'Donnell, C. P., O'Callaghan, D. J., Downey, G., Sheehan, E. M., Delahunty, C. M., & Howard, V. (2007). Application of Mid-Infrared Spectroscopy to the Prediction of Maturity and Sensory Texture Attributes of Cheddar Cheese. *Journal of Food Science*, 72(3), E130-E137.

FDA (2018). Food additive status list. Code of Federal Regulations (CFR). USA: Food and Drug Administration. Retrieved from <https://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/FoodAdditivesIngredients/ucm091048.htm>. Accessed December 07, 2020.

Gan, H. H., Yan, B., Linforth, R. S. T., & Fisk, I. D. (2016). Development and validation of an APCI-MS/GC-MS approach for the classification and prediction of Cheddar cheese maturity. *Food Chemistry*, 190(1), 442-447.

Genis, D. O., Bilge, G., Sezer, B., Durna, S., & Boyaci, I. H. (2019). Identification of cow, buffalo, goat and ewe milk species in fermented dairy products using synchronous fluorescence spectroscopy. *Food Chemistry*, 284(1), 60-66.

Gonçalves, B. R. F., Silva, G. J., Jesus, J. C., Conceição, D. G., Santos, L. S., & Ferrão, S. P. B. (2020). Fast Verification of Buffalo's Milk Authenticity by Mid-Infrared Spectroscopy, Analytical Measurements and Multivariate Calibration. *Journal Brazilian Chemical Society*, 31(7), 1453-1460.

González-Martín, M. I., Hernández-Hierro, J. M., Revilla, I., Vivar-Quintana, A., González-Pérez, C., García, L. G., & Ortega, I. A. L. (2011a). Differentiation of organic and non-organic ewe's cheeses using main mineral composition or near infrared spectroscopy coupled to chemometric tools: A comparative study. *Talanta*, 85(4), 1915-1919.

- González-Martín, I., Hernández-Hierro, J. M., Salvador-Esteban, J., González-Pérez, C., Revilla, I., & Vivar-Quintana, A. (2011b). Discrimination of seasonality in cheeses by near-infrared technology. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(6), 1064-1069.
- González-Martín, I., Hernández-Hierro, J. M., Revilla, I., Vivar-Quintana, A., & Ortega, I. A. L. (2011c). The mineral composition (Ca, P, Mg, K, Na) in cheeses (cow's, ewe's and goat's) with different ripening times using near infrared spectroscopy with a fibre-optic probe. *Food Chemistry*, 127(1), 147-152.
- González-Martín, I., Hernández-Hierro, J. M., Morón-Sancho, R., Salvador-Esteban, J., Vivar-Quintana, A., & Revilla, I. (2007). Determination of the percentage of milk (cow's, ewe's and goat's) in cheeses with different ripening times using near infrared spectroscopy technology and a remote reflectance fibre-optic probe. *Analytica Chimica Acta*, 604(2), 191-196.
- González-Martín, I., Hernández-Hierro, J. M., Vivar-Quintana, A., Revilla, I., & González-Pérez, C. (2009). The application of near infrared spectroscopy technology and a remote reflectance fibre-optic probe for the determination of peptides in cheeses (cow's, ewe's and goat's) with different ripening times. *Food Chemistry*, 114(4), 1564-1569.
- González-Martín, I., Hernández-Hierro, J. M., González-Pérez, C., Revilla, I., Vivar-Quintana, A., & Ortega, I. L. (2014). Potential of near infrared spectroscopy for the analysis of volatile components in cheeses. *LWT - Food Science and Technology*, 55(2), 666-673.
- González-Martín, M. I., Palacios, V. V., Revilla, I., Vivar-Quintana, A. M., & Hernández-Hierro, J. M. (2017). Discrimination between cheeses made from cow's, ewe's and goat's milk from unsaturated fatty acids and use of the canonical biplot method. *Journal of Food Composition and Analysis*, 56(1), 34-40.
- Gori, A., Maggio, R. M., Cerretani, L., Nocetti, M., & Caboni, M. F. (2012). Discrimination of grated cheeses by Fourier transform infrared spectroscopy coupled with chemometric techniques. *International Dairy Journal*, 23(2), 115-120.

- Guerra, E., Gori, A., Cevoli, C., Losi, G., & Caboni, M. F. (2014). Lipid fraction of creams collected in the Parmigiano-Reggiano cheese production area in response to extruded linseed supplementation of dairy cows' diets: GC-FID and FT-MIR evaluation. *International Journal of Dairy Technology*, 67(4), 510-520.
- Jabri, M., Sanchez, M.-P., Trossat, P., Laithier, C., Wolf, V., Grosperin, P., Beuvier, E., Rolet-Répécaud, O., Gavoye, S., Gaüzère, Y., Belysheva, O., Notz, E., Boichard, D., & Delacroix-Buchet, A. (2019). Comparison of Bayesian and partial least squares regression methods for mid-infrared prediction of cheese-making properties in Montbéliarde cows. *Journal of Dairy Science*, 102(8), 6943-6958.
- Jabri, M., Trossat, P., Wolf, V., Beuvier, E., Rolet-Répécaud, O., Gavoye, S., Gaüzère, Y., Belysheva, O., Gaudillière, N., Notz, E., Grosperin, P., Laithier, C., & Delacroix-Buchet, A. (2020). Mid-infrared spectrometry prediction of the cheese-making properties of raw Montbéliarde milks from herds and cheese dairy vats used for the production of Protected Designation of Origin and Protected Geographical Indication cheeses in Franche-Comté. *Journal of Dairy Science*, 103(7), 5992-6002.
- Jesus, J. C., Silva, G. J., Gonçalves, B. R. F., Souza, M. R., Santos, L. S., & Ferrão, S. P. B. (2020). Quick identification of the time of maturation of artisanal Minas cheese by FTIR-ATR spectroscopy and multivariate techniques. *Journal Brazilian Chemical Society*, 31(10), 2001-2011.
- Kamal, M., & Karoui, R. (2015). Analytical methods coupled with chemometric tools for determining the authenticity and detecting the adulteration of dairy products: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 46(1), 27-48.
- Karoui, R., Dufour, É., Pillonel, L., Picque, D., Cattenoz, T. & Bosset, J. O. (2004a) Fluorescence and infrared spectroscopies: A tool for the determination of the geographic origin of Emmental cheeses manufactured during summer. *Le Lait*, 84(4) 359-374.

- Karoui, R., Dufour, É., Pillonel, L., Picque, D., Cattenoz, T., & Bosset, J. O. (2004b). Determining the geographic origin of Emmental cheeses produced during winter and summer using a technique based on the concatenation of MIR & fluorescence spectroscopic data. *European Food Research and Technology*, 219(2), 184-189.
- Karoui, R., Bosset, J. O., Mazerolles, G., Kulmyrzaev, A. & Dufour, É. (2005a). Monitoring the geographic origin of both experimental French Jura hard cheeses and Swiss Gruyère and L'Etivaz PDO cheeses using mid-infrared and fluorescence spectroscopies: A preliminary investigation. *International Dairy Journal*, 15(1), 275–286.
- Karoui, R., Dufour, E., Pillonel, L., Schaller, E., Picque, D., Cattenoz, T. & Bosset, J. (2005b). The potential of combined infrared and fluorescence spectroscopies as a method of determination of the geographic origin of Emmental cheeses. *International Dairy Journal*, 15(3), 287-298.
- Karoui, R., Mouazen, A. M., Ramon, H., Schoonheydt, R., & Baerdemaeker, J. D. (2006). Feasibility study of discriminating the manufacturing process and sampling zone in ripened soft cheeses using attenuated total reflectance MIR and fiber optic diffuse reflectance VIS–NIR spectroscopy. *Food Research International*, 39(5), 588-597.
- Karoui, R., Mazerolles, G., Bosset, J., Baerdemaeker, J., & Dufour, E. (2007). Utilisation of mid-infrared spectroscopy for determination of the geographic origin of Gruyère PDO and L'Etivaz PDO Swiss cheeses. *Food Chemistry*, 105(2), 847-854.
- Karoui, R. (2017). Methodologies for the characterization of the quality of dairy products. In F. Toldrá (Eds.) *Advances in Food & Nutrition Research* (pp. 2-345). E-Publishing Inc.
- Koca, N., Kocaoglu-Vurma, N. A., Harper, W. J. & Rodriguez-Saona, L. E. (2010). Application of temperature-controlled attenuated total reflectance-mid-infrared (ATR-MIR) spectroscopy for rapid estimation of butter adulteration. *Food Chemistry*, 121(82), 778-782.

- Koca, N., Rodriguez-Saona, L. E., Harper, W. J., & Alvarez, V. B. (2007). Application of Fourier Transform Infrared Spectroscopy for Monitoring Short-Chain Free Fatty Acids in Swiss Cheese. *Journal of Dairy Science*, 90(8), 3596-3603.
- Kraggerud, H., Næs, T., & Abrahamsen, R. K. (2014). Prediction of sensory quality of cheese during ripening from chemical and spectroscopy measurements. *International Dairy Journal*, 34(1), 6-18.
- Lei, T., & Sun, D-W. (2019). Developments of Nondestructive Techniques for Evaluating Quality Attributes of Cheeses: A Review. *Trends in Food Science & Technology*, 88(1), 527-542.
- Leite, A. I. N., Pereira, C. G., Andrade, A., Vicentic, N. M., & Bella, M. J. V. (2019). FTIR-ATR spectroscopy as a tool for the rapid detection of adulterations in butter cheeses. *LWT - Food Science and Technology*, 109, 63-69.
- Leng, T., Li, F., Xiong, L., Xiong, Q., Zhu, M., & Chen, Y. (2020). Quantitative detection of binary and ternary adulteration of minced beef meat with pork and duck meat by NIR combined with chemometrics. *Food Control*, 113, 107203.
- Lerma-García, M. J., Gori, A., Cerretani, L., Simó-Alfonso, E. F., & Caboni, M. F. (2010a). Classification of Pecorino cheeses produced in Italy according to their ripening time and manufacturing technique using Fourier transform infrared spectroscopy. *Journal of Dairy Science*, 93(10), 4490-4496.
- Lerma-García, M. J., Ramis-Ramos, G., Herrero-Martínez, J. M., & Simo-Alfonso, E. F. (2010b). Authentication of extra virgin olive oils by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Food Chemistry*, 118(1), 78-83.
- Lima, A. B. S., Batista, A. S., Jesus, J. C., Silva, J. J., Araújo, A. C. M., & Santos, L. S. (2020). Fast quantitative detection of black pepper and cumin adulterations by near infrared spectroscopy and multivariate modeling. *Food Control*, 107(1), 106802.

- Lohumi, S., Lee, S., Lee, H. & Cho, B.-K. (2015). A review of vibrational spectroscopic techniques for the detection of food authenticity and adulteration. *Trends in Food Science & Technology*, 45(1), 85-98.
- Loudiyi, M., Karoui, R., Rutledge, D. N., Lavigne, R., Montel, M. C., & Aït-Kaddour, A. (2017). Contribution of fluorescence spectroscopy and independent component analysis to the evaluation of NaCl and KCl effects on molecular-structure and fat melting temperatures of Cantal-type cheese. *International Dairy Journal*, 73(1) 116-127.
- Martín-del-campo, S. T., Picque, D., Cosío-Ramírez, R. & Corrieu, G. (2007a). Middle infrared spectroscopy characterization of ripening stages of Camembert-type cheeses *International Dairy Journal*, 17(7), 835-845.
- Martín-del-campo, S. T., Picque, D., Cosío-Ramírez, R., & Corrieu, G. (2007b). Evaluation of Chemical Parameters in Soft Mold-Ripened Cheese During Ripening by Mid-Infrared Spectroscopy. *Journal of Dairy Science*, 90(6), 3018-3027.
- McSweeney, P. L. H., Ottogalli, G., & Fox, P. F. (2004). Diversity of Cheese Varieties: An Overview. In P. Fox, P. McSweeney, T. Cogan, & T. Guinee (Eds.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology* (pp 1-23). E-Publishing Inc.
- Medina, S., Perestrelo, R., Silva, P., Pereira, J. A. M., & Câmara, J. S. (2019). Current trends and recent advances on food authenticity technologies and chemometric approaches. *Trends in Food Science & Technology*, 85(1), 163-176.
- Milani, M. I., Rossini, E. L., Catelani, T. A., Pezza, L., Toci, A. L., & Pezza, H. R. (2020). Authentication of roasted and ground coffee samples containing multiple adulterants using NMR and a chemometric approach. *Food Control*, 112(1), 107104.
- Mlček, J., Rop, O., Dohnal, V., & Šustová, K. (2011). Application of near infrared spectroscopy to estimate selected free amino acids and soluble nitrogen during cheese ripening. *Acta Veterinaria Brno*, 80(3), 293-297.

- Oca, M. L., Ortiz, M. C., Sarabia, L. A., Gredilla, A. E., & Delgado, D. (2012). Prediction of Zamorano cheese quality by near-infrared spectroscopy assessing false non-compliance and false compliance at minimum permitted limits stated by designation of origin regulations. *Talanta*, 99(1), 558-565.
- Ottavian, M., Facco, P., Barolo, M., Berzaghi, P., Segato, S., Novelli, E. & Balzan, S. (2012). Near-infrared spectroscopy to assist authentication and labeling of Asiago d'allevo cheese. *Journal of Food Engineering*, 113(2), 289-298.
- Pagthinathan, M., & Nafees, M. S. M. (2015). Biochemistry of cheese ripening. *Agrieast-Journal of Agricultural Sciences*. 10(1), 16-26.
- Pasquini, C. (2018). Near infrared spectroscopy: A mature analytical technique with new perspectives - A review. *Analytica Chimica Acta*. 1026(1), 8-36.
- Picque, D., Cattenoz, T., & Corrieu, G. (2002). Discrimination of Emmental cheeses by infrared spectroscopy. *Milk Science International - Milchwissenschaft*, 57(4), 202-204.
- Pillonel, L., Dufour, E., Schaller, E., Bosset, J. O., De Baerdemaeker, J., & Karoui, R. (2007). Prediction of colour of European Emmental cheeses by using near infrared spectroscopy: a feasibility study. *European Food Research and Technology*, 226(1-2), 63-69.
- Pillonel, L., Luginbühl, W., Picque, D., Schaller, E., Tabacchi, R., & Bosset, J. O. (2003). Analytical methods for the determination of the geographic origin of Emmental cheese: Mid- and near-infrared spectroscopy. *European Food Research and Technology* 216(2), 174-178.
- Revilla, I., González-Martín, I., Hernández-Hierro, J. M., Vivar-Quintana, A., González-Pérez, C., & Lurueña-Martínez, M. A. (2009). Texture evaluation in cheeses by NIRS technology employing a fibre-optic probe. *Journal of Food Engineering*, 92(1), 24-28.
- Rodriguez-Saona, L. E., & Allendorf, M. E. (2011). Use of FTIR for Rapid Authentication and Detection of Adulteration of Food. *Annual Review of Food Science and Technology*, 2(1), 467-483.

Rodriguez-Saona, L. E., Koca, N., Harper, W. J., & Alvarez, V. B. (2006). Rapid Determination of Swiss Cheese Composition by Fourier Transform Infrared/Attenuated Total Reflectance Spectroscopy. *Journal of Dairy Science*, 89(5), 1407-1412.

Sanchez, M. P., El Jabri, M., Minéry, S., Wolf, V., Beuvier, E., Laithier, C., Delacroix-Buchet, A., Brochard, M., & Boichard, D. (2018a). Genetic parameters for cheese-making properties and milk composition predicted from mid-infrared spectra in a large data set of Montbéliarde cows. *Journal of Dairy Science*, 101(11), 10048-10061.

Sanchez, M. P., Wolf, V., El Jabri, M., Beuvier, E., Rolet-Répécaud, O., Gaüzère, Y., Minéry, S., Brochard, M., Michenet, A., Taussat, S., Barbat-Leterrier, A., Delacroix-Buchet, A., Laithier, C., Fritz, S., & Boichard, D. (2018b). Short communication: Confirmation of candidate causative variants on milk composition and cheesemaking properties in Montbéliarde cows. *Journal of Dairy Science*, 101(11), 10076-10081.

Sara, S., Davide, P., Domenico, V., Lucio, C., & Patrizia, P. (2018). Determining the authenticity of pdo buffalo mozzarella: an approach based on Fourier Transform Infrared (MIR- FTIR) spectroscopy and on chemometric tools. *International Journal of Latest Research in Science and Technology*, 7(2) 1-6.

Silva, L. K. R., Gonçalves, B. R. F., Hora, F. F., Santos, L. S., & Ferrão, S. P. B. (2020). Spectroscopy Method (FTIR-ATR) and chemometric tools to detect cow's milk addition to buffalo's milk. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 19(1), 11-20.

Soto-Barajas, M. C., González-Martín, M. I., Salvador-Esteban, J., Hernández-Hierro, J. M., Moreno-Rodilla, V., Vivar-Quintana, A. M. & Curto-Diego, B. (2013). Prediction of the type of milk & degree of ripening in cheeses by means of artificial neural networks with data concerning fatty acids and near infrared spectroscopy. *Talanta*, 116(1), 50-55.

- Subramanian, A., Harper, W. J., & Rodriguez-Saona, L. E. (2009). Cheddar cheese classification based on flavor quality using a novel extraction method and Fourier transform infrared spectroscopy. *Journal of Dairy Science*, 92(1), 87-94.
- USDA (2019) United States Department of Agriculture. Dairy Market News covers the supply, demand, and price situation every week on a regional, national, and international basis for milk, butter, cheese, and dry and fluid products. Retrieved from <https://www.ams.usda.gov/market-news/dairy>. Accessed December 7, 2020.
- 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(1), 8-15.
- Visconti, L. G., Rodríguez, M. S., & Anibal, C. V. (2020). Determination of grated hard cheeses adulteration by near infrared spectroscopy (NIR) and multivariate analysis. *International Dairy Journal*, 104(1), 104647.
- Wilkinson, J., Cerdan, C., & Dorigon, C. (2017). Geographical Indications and “Origin” Products in Brazil—The Interplay of Institutions and Networks. *World Development*, 98(1), 82-92.
- Wu, D., Feng, S., & He, Y. (2008). Short-wave near-infrared spectroscopy of milk powder for brand identification and component analysis. *Journal of Dairy Science*, 91(3), 939-949.
- Xu, L., Shi, Q., Wei, D. L. L., Fu, H-Y., She, Y., & Xie, S. (2020). Simultaneous detection of multiple frauds in kiwifruit juice by fusion of traditional and double-quantum-dots enhanced fluorescent spectroscopic techniques and chemometrics. *Microchemical Journal*, 157(1) 105105.

Capítulo VI

Considerações Finais

Considerações Finais

Dentre os produtos lácteos oriundos do Nordeste do brasileiro, o queijo Coalho ocupa lugar de destaque pela sua tradição, aceitabilidade e seu desenvolvimento na gastronomia regional e nacional. Nesse contexto, o Estado da Bahia contribui significativamente com a expansão deste produto no Brasil, por possuir uma das mais importantes bacias leiteiras da região. A valorização de produtos tradicionais com características únicas como o queijo Coalho cresceram nos últimos anos e investigar a origem geográfica deste produto demonstrou ser um meio de agregar valor e expandir novos mercados.

A presente Tese apresentou alternativas interessantes, do ponto de vista sócio-econômico e científico, para classificação e discriminação de queijos Coalho produzidos em quatro diferentes mesorregiões da Bahia por meio de métodos eficientes e rápidos como as técnicas espectroscópicas MIR e NIR e a avaliação proteômica, a fim contribuir para a garantia da autenticidade do produto em relação a sua origem e gerar dados importantes para uma possível obtenção de Indicação Geográfica (IG).

Ao se avaliar medidas analíticas do queijo coalho (análises químicas, físico-químicas e de propriedades tecnológicas) e os espectros gerados pelas técnicas espectroscópicas notou-se que foi possível discriminar os queijos, por meio da formação de grupos distintos (ACP) e taxas de classificação satisfatórias (ALD). As amostras do Nordeste, Extremo Oeste e Sul se mostraram diferentes entre si e as variáveis pH, a_w , teor de gordura, bem como, os grupos funcionais indicativos da presença de água e gordura foram decisivos na diferenciação entre amostras de diferentes regiões.

Observou-se que o uso da espectroscopia NIR em queijos foi mais eficiente na capacidade de discriminar as amostras, demonstrando potencial para auxiliar na identificação de amostras até então desconhecidas, uma vez que as características químicas do queijo de Coalho foram refletidas nos dados espectrais.

Foi realizado o estudo da eficiência das técnicas cromatográfica e espectroscópica em Peptídeos Solúveis em Água (PSA) dos queijos Coalho para discriminá-los de acordo com as suas diferentes origens associadas com ferramentas quimiométricas ACP e RNA. Utilizando o RP-HPLC foram obtidos cinco peptídeos marcadores das regiões estudadas capazes de diferenciar os queijos e também de otimizar as investigações de amostras desconhecidas. O uso do MIR junto às ACP e RNA apresentou um padrão de separação e classificação semelhantes ao do RP- HPLC. Assim, observou-se que o MIR associado ao RNA mostrou ser a melhor alternativa na discriminação de queijos com base no perfil peptídico por serem mais rápidos, robustos e menos onerosos.

Um estudo de revisão foi realizado abordando a autenticidade de diversos tipos de queijos em termos de identificação de origem, análise de adulterantes e tempo de maturação com a aplicação das técnicas espectroscópicas MIR e NIR, sendo investigados trabalhos entre 2002 e 2020. As pesquisas realizadas nos últimos anos demonstraram que o MIR com o FTIR-ATR apresentou ampla aplicabilidade na identificação da origem e o NIR no modo refletância foi mais prevalente nos estudos de maturação de queijos. A Análise Discriminante e o PLS foram as técnicas quimiométricas mais aplicadas e mais indicadas para análise da autenticidade de queijos.

Assim, os resultados obtidos no presente trabalho demonstraram a viabilidade e eficiência do uso das técnicas espectroscópicas MIR e NIR e da avaliação proteômica do queijo Coalho produzido na Bahia. A aplicação destas caracterizações analíticas podem se constituir como um passo importante para identificação geográfica ou mesmo para auxiliar na atribuição de uma Denominação de Origem para este queijo regional, principalmente porque as características próprias de cada região e particularidades das técnicas de produção locais demonstraram influenciar nas características finais do produto.