

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu*
Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos

ELISÂNGELA SERENATO MADALOZZO

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE RICOTAS VIA ESPECTROSCOPIA
NO INFRAVERMELHO E MÉTODOS DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA**

PONTA GROSSA
2010

ELISÂNGELA SERENATO MADALOZZO

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE RICOTAS VIA ESPECTROSCOPIA
NO INFRAVERMELHO E MÉTODOS DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA**

**Dissertação apresentada como requisito
para a obtenção do título de Mestre em
Ciência e Tecnologia de Alimentos, no
Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos da Universidade
Estadual de Ponta Grossa.**

**Orientadora: Profa. Dra. Noemi Nagata
Co-orientadora: Profa. Dra. Elenise Sauer**

**PONTA GROSSA
2010**

Ficha Catalográfica Elaborada pelo Setor de Processos Técnicos BICEN/UEPG

M178c Madalozzo, Elisângela Serenato
 Caracterização físico-química de ricotas via espectroscopia no
 infravermelho e métodos de calibração multivariada / Elisângela
 Serenato Madalozzo. Ponta Grossa, 2010.
 83 f.
 Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos.) -
 Universidade Estadual de Ponta Grossa.
 Orientadora : Profa. Dra. Noemi Nagata
 Co-orientadora : Profa. Dra. Elenise Sauer

 1. Ricota. 2. Gordura. 3. Proteína. 4. Umidade.
 5. Espectroscopia NIR. 6. Reflectância Difusa. 7. Calibração
 Multivariada. I. Nagata, Naomi. II. Sauer, Elenise. III. T

CDD: 637.3

TERMO DE APROVAÇÃO

ELISÂNGELA SERENATO MADALOZZO

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE RICOTAS VIA ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO E MÉTODOS DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA

Dissertação aprovada como requisito para obtenção do título de Mestre em
Ciência e Tecnologia de Alimentos, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela
seguinte Banca Examinadora:

Profa. Dra. Noemi Nagata
UEPG/PR

Profa. Dra. Elenise Sauer
UTFPR/PR

Prof. Dr. Patrício Peralta-Zamora
UFPR/PR

Prof. Dr. Ivo M. Demiate
UEPG/PR

Ponta Grossa, 25 de fevereiro de 2010

Dedico este trabalho à minha mãe e ao Fernando.

Obrigada pelo amor, pelo apoio e
pela torcida em toda a minha trajetória.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por guiar meus passos e estar ao meu lado incondicionalmente.

A minha mãe Maria Helena, pelo amor, incentivo, ânimo, exemplo de trabalho, humildade e honestidade.

A meu namorado Fernando pelo amor, compreensão, carinho e incentivo em todos os momentos.

Agradeço o estímulo, a amizade e dedicação de minhas orientadoras Profa. Dra. Noemi Nagata e Profa. Dra. Elenise Sauer, fundamentais para a realização deste trabalho.

Em especial à Noemi pela amizade, compreensão, paciência, ânimo e ajuda.

A grande amiga Misaeli pela amizade ilimitada, momentos de descontração, e pelo apoio e contribuição na etapa prática deste trabalho.

A todos os colegas, em especial à Denise, Francieli, Giselle, Rafael e Sandra pela amizade, convivência, incentivo e alegrias compartilhadas.

Aos professores do curso, que contribuíram para meu crescimento profissional.

Aos colegas, os quais é difícil citar todos, e seria injusto citar apenas alguns, mas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho e para o meu amadurecimento profissional e espiritual.

A UTFPR, em especial à Profa Dra. Elenise Sauer, por ter disponibilizado os laboratórios do curso de Tecnologia em Alimentos para a realização das análises físico-químicas.

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), em especial ao Edson Lima, por disponibilizar o equipamento para a aquisição dos espectros de infravermelho.

Aos professores membros da banca examinadora, que aceitaram o convite de fazer parte da defesa desta dissertação e pelas valiosas sugestões ao aprimoramento do trabalho.

A Fundação Araucária pela bolsa de mestrado concedida.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho. Mesmo não citando o nome de cada um deixo registrado aqui meu sincero agradecimento.

“Tudo vale a pena quando a alma não é pequena.”

(Fernando Pessoa)

RESUMO

A ricota é um tipo de queijo fresco, obtido pela precipitação das proteínas do soro do queijo. Segundo a legislação vigente, a ricota é enquadrada nos padrões de identidade e qualidade de queijos magros, no entanto, estudos demonstram a grande variabilidade na sua composição centesimal. Isto justifica a necessidade de estabelecimento de padrões de qualidade, e o desenvolvimento de metodologias que possibilitem um controle rápido e eficiente do produto. Além disso, as metodologias convencionais empregadas para a determinação da composição centesimal da ricota, embora façam parte das análises de rotina em laboratórios de controle de qualidade, são onerosas, demoradas e geram resíduos. Neste sentido, o objetivo deste estudo foi desenvolver um método para a quantificação dos parâmetros físico-químicos, utilizando-se espectroscopia no infravermelho próximo por reflectância difusa (NIRRS) associado a métodos de calibração multivariada. Para a construção dos modelos multivariados (principalmente PLSR) foram utilizadas as médias das concentrações de acidez, carboidratos, cinzas, cloretos, gordura, pH, proteína e umidade, obtidas pelas metodologias convencionais (método titulométrico, espectroscópico, carbonização em mufla, titulométrico, Gerber, potenciométrico, Kjeldahl e método gravimétrico, respectivamente), bem como, os dados de espectroscopia no infravermelho próximo. Foram coletados espectros em duplicata, sendo que 33 desses espectros foram utilizados para a fase de calibração e os 5 restantes utilizados para a fase de validação externa. Os melhores resultados para os teores de gordura, proteína e umidade foram obtidos na região espectral entre 1100 a 2500 nm. O modelo otimizado para a determinação de gordura empregou a correção do espalhamento multiplicativo (MSC), com 6 variáveis latentes (VLs), obtendo-se coeficientes de correlação de $R_{cal} = 0,968$ e $R_{val} = 0,936$ possibilitando a quantificação de gordura com um erro médio de previsão (Er) de 6,37%. Para o teor de proteína, o melhor resultado foi obtido utilizando-se a MSC e dados centrados na média (DCM). O modelo de regressão, com 6 VLs, apresentou coeficientes de correlação de $R_{cal} = 0,968$ e $R_{val} = 0,885$, e determinação de proteína com Er de 5,95%. O melhor modelo para a determinação de umidade empregou a normalização, com 4 VLs, obtendo-se coeficientes de correlação de $R_{cal} = 0,851$ e $R_{val} = 0,757$ e possibilitando a quantificação de umidade com um Er de 1,91%. Não foi possível a construção de modelos para os parâmetros acidez, carboidratos, cinzas, cloretos e pH, apresentando baixos valores de R_{cal} e R_{val} , demonstrando a baixa capacidade de previsão mesmo para as amostras que compõem o conjunto de calibração através da metodologia proposta. Estes resultados além de demonstrarem o potencial dos modelos multivariados na determinação dos teores de gordura, proteína e umidade em amostras com matrizes complexas (ricota) evidenciam as vantagens da associação NIRRS-PLSR que permite um controle de qualidade rápido com uma manipulação mínima da amostra.

Palavras-chave: Ricota, Gordura, Proteína, Umidade, Espectroscopia NIR, Reflectância Difusa, Calibração Multivariada.

ABSTRACT

Ricotta is a kind of fresh cheese, obtained by the precipitation of the proteins in the cheese whey. According to the current legislation, ricotta is framed on standards of identity and quality of low-fat cheeses, however, studies show a great variability on the centesimal composition. It justifies the necessity of establishing quality standards, and the development of methodologies that allow a fast and efficient control of the product. Besides it, conventional methodologies used to determine the centesimal composition of the ricotta, though they are part of the routine analysis in laboratories of quality control, they are onerous, time consuming and generate residues. In this sense, the objective of this study was to develop a method for the quantification of physical/chemical standards, using Near Infrared Diffuse Spectroscopy (NIRRS), associating to methods of multivariate calibration. For the construction of multivariate models (specially PLSR) it were used the media of concentration of acidity, carbohydrates, ashes, chlorides, fat, pH, protein and moisture, obtained by conventional methodologies (titration method, spectroscopic, muffle carbonization, titration, Gerber, potentiometric, Kjeldahl and gravimetric method, respectively), as well as data of the near infrared spectroscopy. It was collected spectra in duplicate, 33 spectra were used for the calibration phase, and the 5 remaining used to the external validation phase. The best results for fat, protein and moisture levels were obtained on the spectral region between 1100 to 2500 nm. The optimized model for determination of fat used the Multiplicative Scatter Correction (MSC), with 6 latent variable (VLs), acquiring correlation coefficients of $R_{cal}= 0.968$ and $R_{val}= 0.936$ allowing the quantification of fat with a medium prevision error (E_r) of 6.37%. For the protein level, the best result was obtained using MSC and data centered on media (DCM). The model of regression, with 6 VLs, presented correlation coefficients of $R_{cal}= 0.968$ and $R_{val}= 0.885$, and determination of protein with E_r of 5.95%. The best model for determination of moisture used normalization, with 4 VLs correlation coefficients of $R_{cal}= 0.851$ and $R_{val}= 0.757$ and allowing the quantification of moisture with and E_r of 1.91%. It was not possible to build models for acidity, carbohydrates, ashes, chloride and pH parameters, presenting low values of R_{cal} and R_{val} , demonstrating the low capacity of forecasting even for samples that compose the calibration set through the proposed methodology. These results demonstrate the potential of multivariate models on determination of fat, protein and moisture levels on samples with complex matrices (ricotta) and also show the advantages of the association NIRRS-PLSR which allows a fast quality control with minimum manipulation of the sample.

Key-Words: Ricotta, Fat, Protein, Moisture, Spectroscopy NIR, Diffuse Reflectance, Multivariate Calibration.

LISTA DE ABREVIATURAS

AOAC – Association of Official Analytical Chemists

ATR – Reflectância Total Atenuada

CV – Coeficiente de Variação Amostral

DCM – Dados Centrados na Média

DRIFTS – Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier e Reflectância Difusa

Er – Erro Padrão Relativo

GES – Conteúdo de Matéria Gorda no Extrato Seco

MAARA – Ministério da Agricultura, Abastecimento e Reforma Agrária

MPLS – Mínimos Quadrados Parciais Modificado

MSC – Correção do Efeito de Espalhamento Multiplicativo

NIR – Espectroscopia no Infravermelho Próximo

NIRRS – Espectroscopia por Reflexão no Infravermelho Próximo

PC – Componente Principal

PCA – Análise de Componentes Principais

PLSR – Regressão por Mínimos Quadrados Parciais

Rcal – Coeficientes de Correlação do Conjunto de Calibração

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

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

RMSEC – Raiz Quadrada da Soma dos Erros de Calibração

RMSECV – Raiz Quadrada da Média da Somatória dos Erros de Validação Interna

RMSEP – Raiz Quadrada da Média da Somatória dos Erros de Previsão

Rval – Coeficientes de Correlação do Conjunto de Validação Interna

SEC – Erro Padrão de Calibração

SECV – Erro Padrão de Validação Interna

SEV – Erro Padrão de Validação

SIF – Sistema de Inspeção Federal

VLs – Variáveis Latentes

LISTA DE FIGURAS

FIGURA – 1	Representação da Reflexão Difusa.....	24
FIGURA – 2	Organização dos dados para calibração multivariada.....	27
FIGURA – 3	Boxplot dos parâmetros físico-químicos analisados.....	44
FIGURA – 4	Curva analítica para determinação de lactose.....	49
FIGURA – 5	Espectro no infravermelho próximo (NIR) das amostras de ricota sem tratamento prévio.....	54
FIGURA – 6	Gráfico de <i>scores</i> da PC1 vs PC2.....	56
FIGURA – 7	Gráfico de <i>loadings</i> para a PC1.....	57
FIGURA – 8	Gráfico de <i>scores</i> da PC1 vs PC3.....	58
FIGURA – 9	Gráfico de <i>loadings</i> para a PC3.....	59
FIGURA – 10	Resultado da Análise por Componentes Principais com correção do espalhamento multiplicativo (MSC) e dados centrados na média (DCM).....	60
FIGURA – 11	Gráficos de RMSEC e RMSECV vs Número de Variáveis Latentes obtidos durante a construção dos modelos de (A) gordura, (B) proteína e (C) umidade.....	63
FIGURA – 12	Gráfico de Resíduos vs Valor Experimental obtidos pelo modelo de calibração para (A) gordura, (B) proteína e (C) umidade.....	64
FIGURA – 13	Resíduo de Student vs Leverage obtido pelos modelos de (A) gordura, (B) proteína e (C) umidade.....	65
FIGURA – 14	Valores Previstos pela Calibração vs Valores Reais obtidos pelos modelos de (A) gordura, (B) proteína e (C) umidade.....	66
FIGURA – 15	Gráfico dos coeficientes de regressão para o modelo de gordura.....	67
FIGURA – 16	Gráfico dos coeficientes de regressão para o modelo de proteína.....	68
FIGURA – 17	Gráfico dos coeficientes de regressão para o modelo de umidade.....	69

LISTA DE QUADROS

QUADRO – 1	Resultados obtidos para as análises físico-químicas a partir de três tipos de ricota.....	22
QUADRO – 2	Regiões espectrais no NIR relacionadas às absorções de umidade, gordura e proteína.....	55

LISTA DE TABELAS

TABELA – 1	Resultados dos teores de acidez, carboidratos, cinzas, cloretos, extrato seco, gordura, pH, proteína e umidade encontrados nas amostras de ricota.....	46
TABELA – 2	Modelos de calibração para a determinação de gordura, proteína e umidade.....	62
TABELA – 3	Resultados da previsão das concentrações de gordura, proteína e umidade para os conjuntos de validação externa.....	69
TABELA – 4	Modelos de calibração para a determinação de acidez, carboidratos, cinzas, cloreto e pH.....	73

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1	Queijo.....	17
2.2	Soro de queijo.....	17
2.3.	Ricota.....	18
2.4	Controle de qualidade tradicional.....	20
2.5	Espectroscopia no infravermelho por reflectância difusa.....	22
2.6	Quimiometria e calibração multivariada.....	25
2.7	Calibração multivariada e espectroscopia no infravermelho.....	31
3	OBJETIVOS.....	36
3.1	Objetivo geral.....	36
3.2	Objetivos específicos.....	36
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
4.1	Amostras.....	37
4.2	Reagentes.....	37
4.3	Análises físico-químicas convencionais.....	37
4.3.1	Determinação de pH.....	37
4.3.2	Determinação de extrato seco total e umidade.....	38
4.3.3	Determinação do teor de gordura.....	38
4.3.4	Determinação da acidez total titulável.....	39
4.3.5	Determinação do teor de nitrogênio total.....	39
4.3.6	Determinação do teor de cinzas.....	40
4.3.7	Determinação do teor de cloreto (como NaCl).....	40
4.4	Determinação de carboidratos.....	41
4.5	Análises de espectroscopia no infravermelho por reflectância difusa.....	41
4.5.1	Seleção das amostras.....	42
4.5.2	Desenvolvimento dos modelos de calibração multivariada.....	42
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
5.1	Resultados das análises físico-químicas.....	43
5.1.1	Acidez titulável e pH.....	47
5.1.2	Teor de carboidratos.....	48
5.1.3	Teor de cinzas.....	50
5.1.4	Teor de cloretos.....	50
5.1.5	Extrato seco e umidade.....	51
5.1.6	Teor de gordura.....	52
5.1.7	Teor de proteína.....	53
5.2	Espectroscopia no infravermelho por reflectância difusa.....	53
5.2.1	Análise exploratória de dados.....	55
5.2.2	Modelos de calibração.....	61
5.2.2.1	Modelos de calibração multivariada para as previsões dos teores de gordura, proteína e umidade.....	61
5.2.2.2	Modelos de calibração multivariada para as previsões dos teores	

	de acidez, carboidratos, cinzas, cloreto e pH.....	71
6	CONCLUSÕES.....	74
7	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	76
	REFERÊNCIAS.....	77

1 INTRODUÇÃO

O leite e seus derivados, junto com carnes e ovos, correspondem à maior parte da parcela protéica de origem animal ingerida pelo homem. Dentre os produtos derivados do leite, o queijo se destaca por ser o mais consumido. Sua popularidade é atribuída ao sabor, versatilidade de uso, ampla variedade de tipos, além do alto valor nutricional.

A ricota é um tipo de queijo fresco, de origem italiana, obtido pela precipitação das proteínas do soro do queijo (preferencialmente queijo Minas frescal, Minas padrão e mussarela), sendo conhecida também por queijo de albumina, pois é constituída basicamente desta e de lactoglobulina, que são os principais componentes protéicos do soro e não coaguláveis pelo coalho. A elaboração da ricota visa agregar valor ao soro, considerado um resíduo da produção de queijos.

Sua produção tem aumentado, principalmente em decorrência da procura por parte dos consumidores por alimentos mais saudáveis e de baixo valor calórico. O teor de umidade é de aproximadamente 70%, o que a caracteriza como alimento de muito alta umidade, portanto susceptível à contaminação microbiana, mesmo sob refrigeração. A necessidade de estabelecimento de padrões de identidade para um melhor controle de qualidade deste produto e segurança do consumidor é essencial, uma vez que não há uma legislação específica (ALBUQUERQUE, 2002; RIBEIRO *et al.*, 2005; ESPER, 2006).

Segundo a legislação vigente para queijos, a ricota é enquadrada nos padrões de identidade e qualidade de queijos magros, mesmo ocorrendo grande variabilidade na composição centesimal das ricotas comercializadas (SOUZA *et al.*; 2000; ESPER; BONETS; KUAYE, 2007). Esta grande variabilidade justifica a necessidade de estabelecimento dos padrões de identidade e qualidade para o produto, assim como o desenvolvimento de metodologias que possibilitem um controle de qualidade rápido, de baixo custo e eficiente (ESPER, 2006).

As indústrias do setor alimentício vêm buscando técnicas que possibilitem o controle de qualidade *on line* dos seus produtos, a fim de garantir a qualidade do produto final e de seus processos. A realidade das indústrias faz com que, muitas vezes o produto acabado seja expedido muito antes dos resultados dos ensaios

terem sido fechados. O controle de qualidade rápido permitiria que os resultados de laudos acompanhassem a velocidade real dos processos industriais (FERRÃO, 2000; FERRÃO *et al.*, 2004).

Neste sentido, a aplicação de técnicas de espectroscopia de absorção na região do infravermelho tem sido valorizada por seu baixo custo, versatilidade e simplicidade operacional. Apesar da possibilidade de fornecer um perfil completo da composição das amostras, oferece sinais espectrais de grande complexidade e freqüentes problemas de não-linearidade entre concentração e intensidade, fatores estes que inviabilizam aplicações quantitativas (REEVES; MCCARTY; REEVES, 2001). No caso particular da espectrometria no infravermelho próximo (NIR) a maioria das bandas de absorção é uma sobreposição de diferentes *overtone*s e/ou combinação de bandas referentes à transição vibracional e rotacional. Tais características fazem com que grandes moléculas e misturas complexas produzam múltiplas bandas e efeitos de sobreposição no espectro NIR, que geram bandas amplas com poucos picos (KAROUI; MAZEROLLES; DUFOUR, 2003; NICOLAÏ *et al.*, 2007).

As desvantagens associadas a esta técnica espectroscópica têm sido contornadas com o emprego de métodos de calibração multivariada, que podem estar associadas ao infravermelho médio ou próximo. Esta associação de metodologias (técnica instrumental e calibração multivariada) permite a determinação de componentes presentes em uma amostra mesmo quando a informação instrumental disponível não apresenta seletividade, além de atender algumas das necessidades anteriormente citadas, já que são de fácil execução e que após modelagem, permitem estimativas de parâmetros de qualidade em poucos minutos (HERMIDA *et al.*, 2001; FERRÃO *et al.*, 2004; SANTOS, 2005; SILVA *et al.*, 2009).

A calibração multivariada fundamentada no método de Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLSR) é uma ferramenta poderosa na análise química (química medicinal, ambiental, no controle de processos industriais, etc.), sendo especialmente indicada quando o objetivo é estabelecer uma relação entre dados altamente correlacionados (p.ex., dados de espectroscopia) a uma propriedade físico-química, mesmo quando há sobreposição de informações

espectrais de vários componentes, sobre todas as regiões espectrais medidas (FERREIRA *et al.*, 1999; FERRARINI, 2004; CANECA *et al.*, 2006).

O emprego da espectroscopia no infravermelho próximo (NIRRS) associada à calibração multivariada é consagrado desde o início da década de sessenta, quando HART; NORRIS; GOLUMBIC (1962) apresentaram um método para determinar umidade. Desde então, vários trabalhos descritos na literatura aplicaram a técnica de infravermelho próximo associada à calibração multivariada, em análise de alimentos, principalmente na determinação de proteína bruta, aminoácidos, fibras, cinzas, extrato etéreo, umidade, gordura, cloreto, ácidos graxos (como ácido linoléico, caprílico e cáprico) obtendo-se resultados rápidos e satisfatórios (SOARES *et al.*, 1998; XICCATO *et al.*, 1999; HERMIDA *et al.*, 2001; VILLAMARÍN *et al.*, 2002; XICCATO *et al.*, 2003; FERRARINI, 2004; MIRALBÉS, 2004; SIMAS, 2005; VESELÁ *et al.*, 2007; GONZÁLEZ-MARTÍN *et al.*, 2008; LUCAS, 2008).

Este trabalho propõe a utilização da espectroscopia de infravermelho próximo com acessório de reflectância difusa associada à análise multivariada para determinar a composição físico-química em ricota fresca. Vale à pena ressaltar, que os métodos oficiais de análise apresentam características como, elevado tempo de análise e alta geração de resíduos, fatores que podem ser contornados com a referida proposta.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Queijo

Queijo é um produto fresco ou maturado que se obtém por separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído (integral, parcial ou totalmente desnatado), ou de soros lácteos. Estes por sua vez podem ser coagulados pela ação física do coalho, por enzimas específicas, por bactéria específica, por ácidos orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade apta para uso alimentar, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e/ou especiarias e/ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes (BRASIL, 1996).

A produção de queijo no Brasil vem crescendo a cada ano; em 2005, o setor foi responsável pela produção de aproximadamente 545 mil toneladas de queijo/ano, com um faturamento aproximado de R\$ 3,75 bilhões e um crescimento na ordem de 7% em relação ao ano anterior (ABIQ, 2009). Em 2007 essa produção aumentou para 801 mil toneladas de queijo/ano, correspondendo a 34% da produção de leite no país. Nestas percentagens, está incluída apenas a produção que passa pelo sistema SIF (Sistema de Inspeção Federal). Considera-se que aproximadamente 35% da produção nacional ainda é informal, embora tal montante seja muito discutível e de difícil quantificação (EMBRAPA, 2009).

Originalmente, a fabricação de queijos tinha o objetivo de estender a vida de prateleira do leite e conservar seus componentes nutricionais (ESPER, 2006).

2.2 Soro de queijo

O soro de queijo é o subproduto resultante da fabricação de queijos, sendo obtido numa proporção média de 9:1 v/v da quantidade de queijo fabricada. Esse subproduto contém cerca de 6,5% de sólidos totais, e entre 4,5-5,0% de lactose, 0,8-1,1% de proteína, 0,03-0,1% de gordura, 0,5-0,8% de matéria mineral e 0,2-0,8% de ácido láctico, retendo cerca de 55% dos nutrientes do leite (MORESI, 1994).

Assim, ele apresenta boas propriedades funcionais e elevado valor nutritivo (proteínas e lactose), com superioridade em relação a outras proteínas para a nutrição humana, devido fundamentalmente ao perfil de aminoácidos da lactoalbumina. Considerando o valor nutricional do soro de queijo, principalmente no que se refere aos aminoácidos essenciais, verificou-se que este fornece quantidades significativas das necessidades de isoleucina, lisina, cistina, metionina, treonina, triptofano e valina (SIQUEIRA *et al.*, 2002).

Cerca de 50% da produção mundial de soro é tratada e transformada em vários produtos alimentares, sendo que deste total quase a metade é usada diretamente na forma líquida (ALMEIDA; BONASSI; ROÇA, 2001).

Movidos pelo interesse de aproveitar essa fonte de nutrientes ou de encontrar uma alternativa para o controle da poluição causada por esse resíduo, muitos países optaram por utilizar o soro de queijo em produtos alimentícios, nas mais diversas formas. O soro vem sendo incorporado vantajosamente em produtos cárneos, lácteos, massa, produtos de padaria, confeitaria, sopas, misturas desidratadas, sobremesas congeladas, chocolates e bebidas (CHIAPPINI; SANTOS, 1995).

Devido ao seu valor nutritivo e as suas condições de temperatura e pH, favoráveis ao crescimento microbiano, a vida útil do soro como produto inalterado é extremamente curta (ESPER, 2006).

2.3 Ricota

O nome ricota é derivado da palavra latina “recocta”, que significa re-cozido, ou cozido duas vezes. A ricota é um queijo de origem italiana, fabricada em diversos países sob várias denominações, obtido pela precipitação das proteínas do soro de queijo, que por sua vez é obtida pela acidificação associada ao calor. Ela é conhecida também por queijo de albumina, pois é constituída basicamente desta e de lactoglobulina, que são os principais componentes protéicos do soro e não coaguláveis pelo coalho. A elaboração da ricota visa, principalmente, agregar valor ao soro, considerado um resíduo. Pode ser comercializada de várias formas: defumada, condimentada ou cremosa, na forma prensada ou em potes, sendo que a forma mais comumente encontrada é a ricota

fresca prensada (PINTADO; MACEDO; MALCATA, 2001; ESPER, 2006; RIBEIRO *et al.*, 2005).

Existem duas formas de aquecimento para a produção da ricota: a indireta, que consiste no aquecimento a vapor pela camisa do tanque, e a direta, em que o soro é aquecido diretamente com o vapor por meio de um tubo perfurado. O soro utilizado no processamento deve ser fresco e proveniente do soro dos queijos Minas frescal, Minas padrão ou mussarela, já que o soro de queijos fabricados com corante dá um produto com coloração amarelada, característica não desejada à ricota. Adiciona-se ao soro 5-10% (v/v) de leite a 60-65°C (utilizado para melhorar o rendimento e a consistência do produto final); opcionalmente pode-se adicionar sal 0,1% (m/v), e após atingir 85-90°C, adiciona-se o agente acidificante (ácido láctico, ácido acético, ácido cítrico ou fermento). Após a precipitação das proteínas a massa é retirada com auxílio de uma concha furada ou escumadeira. Essa massa obtida é então colocada em formas e levada para câmara fria onde permanece por 6 a 24 horas (KOSIKOWSKI; MISTRY, 1999 *apud* ESPER, 2006; MODLER; EMMONS, 2001; PINTADO; MACEDO; MALCATA, 2001).

A composição média deste queijo varia entre 70-73% de umidade, 4-6% de gordura e pH 4,9-6,1 (SOUZA *et al.*, 2000), o que o classifica, segundo a Portaria nº146 de 07 de março de 1996, como sendo um queijo magro, com teor de umidade não inferior a 55%, contendo de 10 a 24,9% de gordura no extrato seco (BRASIL, 1996). Mesmo sendo armazenada sob refrigeração, apresenta uma vida de prateleira muito limitada, de até cinco semanas. Seu teor de umidade (acima de 70%) caracteriza-a como sendo um alimento de alta umidade muito susceptível à contaminação microbiana (HOUGH *et al.*, 1999; KOSIKOWSKI; MISTRI, 1999 *apud* ESPER, 2006).

Esta contaminação foi relatada várias vezes na literatura, demonstrando que as amostras analisadas se encontravam fora dos padrões estabelecidos pela Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 12/2001, apresentando microrganismos como *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, microrganismos aeróbios mesófilos, *Staphylococcus aureus* e *Listeria spp* (BRASIL, 2001; RAIMUNDO, 2004; BELTRÁN *et al.*, 1999; COSSEDU *et al.*, 1997; ESPER, 2006; DA SILVA, HOFER, TIBANA, 1998). O problema microbiológico das amostras de ricota tem

sido amplamente estudado, principalmente com o intuito de propor novos métodos para identificação e quantificação de microrganismos (WAX *et al.*, 2000; LONGHI *et al.*, 2003), ou então o desenvolvimento de tecnologias capazes de retardar o crescimento dos mesmos (DEL NOBILE *et al.*, 2009; DAVIES, BEVIS, DELVES-BROUGHTON, 1997).

Não existe um regulamento técnico de identidade e qualidade de ricota no Brasil. A única legislação existente é o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) que no artigo 610 define a ricota como o produto obtido da albumina do soro de queijos, adicionado de leite até 20% do seu volume, e tendo o máximo de três dias de fabricação. Também estabelece que este queijo deva apresentar formato cilíndrico, peso de 300 g a 1 kg, crosta rugosa, não-formada ou pouco nítida, consistência mole, não-pastosa e friável, textura fechada ou com alguns buracos mecânicos, cor branca ou branco-creme, odor e sabor próprios (BRASIL, 1997).

A legislação desse produto é deficiente, não dispondo sobre a composição, classificação, requisitos de higiene, normas de envasamento e rotulagem, métodos de amostragem e análise, resultando em grande diversidade de composição. No Brasil são escassos os dados de literatura a respeito dos parâmetros físico-químicos de ricota, tornando ainda mais difícil o estabelecimento de padrões (SOUZA *et al.*, 2000).

Em geral, observa-se no mercado a oferta de ricotas com diferentes características, fato motivado pela produção artesanal e também pela ausência de regulamento técnico definido. A inexistência de padrões legais pode prejudicar o próprio controle oficial de qualidade destes produtos (ESPER, 2006).

2.4 Controle de qualidade tradicional

Os principais métodos analíticos para a avaliação da qualidade dos alimentos ou determinação de suas propriedades físico-químicas utilizam técnicas, como cromatografia, espectroscopia, métodos volumétricos e gravimétricos, sendo que estas duas últimas ainda são muito utilizadas nos dias de hoje para as determinações das propriedades dos alimentos. Estas análises convencionais empregam muitos testes físicos e químicos que despendem muito

tempo, consomem muitos reagentes químicos e dependem da prática do analista para obtenção de resultados com boa repetibilidade (MORGANO, 2005).

Na análise de proteína bruta, por exemplo, utiliza-se ácido sulfúrico concentrado e solução de hidróxido de sódio concentrada nos processos de digestão e destilação respectivamente, tornando a técnica perigosa. Já na determinação de gordura, também utiliza reagentes considerados perigosos, e aquecimento. As determinações de extrato seco total e umidade demandam uma quantidade elevada de tempo, pois normalmente a amostra é seca em estufa durante 12 horas. Enfim, as análises convencionais demandam um grande tempo e apresentam um custo razoável na análise de rotina e de grande quantidade de amostras.

SOUZA *et al.* (2000) avaliaram trinta amostras de ricota, de cinco marcas diferentes, comercializadas na cidade de Belo Horizonte (MG), e observaram a variabilidade de padrões físico-químicos das amostras em relação à Portaria 146, de 07 de março de 1996 (Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos) (BRASIL, 1996). Os resultados mostraram que 16,67% das amostras poderiam ser classificadas como sendo queijo magro, 23,33% queijo semi-gordo, 60% queijo gordo. Também, 3,33% das amostras poderiam ser classificadas como queijo de média umidade, 3,33% de alta umidade e 93,34% de muito alta umidade.

ROCHA (2004) avaliou o teor de gordura total pela metodologia de Gerber e o perfil de ácidos graxos utilizando cromatografia gasosa, em três tipos de queijos – mussarela, prato e ricota – de cinco fabricantes e de três lotes diferentes comercializados em supermercados de Brasília (DF). Os resultados encontrados demonstraram uma grande variação para o teor de gordura total entre os produtores e entre os seus lotes para os três tipos de queijos analisados. Quanto às análises de ácidos graxos, constatou-se que os três tipos de queijos analisados são importantes fontes de ácidos graxos saturados.

ESPER (2006) analisou a qualidade microbiológica e parâmetros físico-químicos de amostras de ricotas comercializadas no município de Campinas (SP). Os resultados das análises físico-químicas demonstraram grande variabilidade em todos os parâmetros avaliados entre as amostras e marcas. Particularmente em relação à gordura, segundo a Portaria nº 146/96 do Ministério da Agricultura do

Abastecimento e da Reforma Agrária, 8,89% das amostras seriam classificados como queijo magro, 42,22% queijo semi-gordo, 40,00% queijo gordo e 8,89% como queijo extra-gordo.

MEDEIROS (2000) analisou a composição centesimal de três diferentes ricotas (ricota consistente, pastosa condimentada com cebola e pastosa condimentada com orégano) produzidas com leite de cabra. Os resultados obtidos estão apresentados no Quadro 1.

QUADRO 1 – Resultados obtidos para as análises físico-químicas a partir de três tipos de ricota

	Médias (% m/m) $\pm$ desvio padrão				
	Gordura	Umidade	Extrato seco total	Cinzas	Proteína
Ricota consistente	20,39 $\pm$ 2,01	65,75 $\pm$ 3,10	34,24 $\pm$ 3,10	2,62 $\pm$ 1,48	9,47 $\pm$ 0,96
Ricota pastosa condimentada com cebola	14,34 $\pm$ 2,46	70,80 $\pm$ 4,61	29,19 $\pm$ 4,61	2,03 $\pm$ 0,53	6,26 $\pm$ 1,03
Ricota pastosa condimentada com orégano	14,61 $\pm$ 3,78	73,34 $\pm$ 3,54	27,65 $\pm$ 3,54	1,88 $\pm$ 0,47	6,21 $\pm$ 1,31

Fonte: MEDEIROS (2000)

A ricota consistente apresentou as maiores concentrações de gordura, extrato seco total, cinzas e proteína devido ao fato de ser adicionado ao processo 20% de leite integral, diferentemente das ricotas pastosas condimentadas que foram adicionadas apenas de 5% de leite integral.

2.5 Espectroscopia no infravermelho por reflectância difusa

A origem da espectroscopia no infravermelho data do início do século dezenove, com o trabalho pioneiro do músico e astrônomo alemão Frederick William Herschel. O interesse pela astronomia despertou a curiosidade de Herschel com relação às propriedades físicas da radiação eletromagnética na região do visível, fazendo-o acreditar que a compreensão destas propriedades poderia ajudá-lo em seus estudos a respeito dos corpos celestes (BURNS; CIURCZAK, 2007).

Experimentos realizados por Herschel foram importantes, não somente pela descoberta da radiação infravermelha, mas também, por demonstrar que

existem formas de luz que não podem ser observadas pelo olho humano. A partir de seus estudos, outros trabalhos foram desenvolvidos utilizando faixas espectrais como o infravermelho próximo, médio e distante e também a região do ultravioleta (BURNS; CIURCZAK, 2007).

A energia denominada infravermelho corresponde à região do espectro eletromagnético situada na faixa de números de onda entre 14.290 e 10 cm^{-1} . Nessa faixa de radiação do infravermelho distinguem-se três regiões: infravermelho próximo (14.290 a 4000 cm^{-1}), médio (4000 a 200 cm^{-1}) e distante (200 a 10 cm^{-1}). As absorções moleculares ou sobretons ocorrem com frequências de 12000 a 9000 cm^{-1} e as bandas de combinações ocorrem de 5500 a 3500 cm^{-1} . O espectro é formado por um conjunto de bandas de absorções características (representam os grupos funcionais) presentes em uma amostra, sendo que cada grupo absorve em uma frequência característica. Essas frequências apresentam vibrações específicas, que podem ser de estiramento ou de deformação, as quais correspondem a níveis de energia da molécula (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRIL, 1994). A região chamada infravermelho próximo, 14.290 a 4000 cm^{-1} , tem recebido recentemente muita atenção, em particular com relação a análises quantitativas de amostras com matrizes complexas (BARBOSA, 2007 *apud* QUEJI, 2008; MILLER; MILLER *apud* MORGANO, 2005).

Os espectros no infravermelho podem ser obtidos a partir de amostras sólidas, líquidas e gasosas, e a qualidade desses espectros depende do método de preparo da amostra e do tipo de acessório utilizado para sua obtenção. Os métodos mais empregados envolvem transmitância e reflectância, sendo este último muito utilizado para análises qualitativas e quantitativas, além de possuir a vantagem de não serem destrutivos para a amostra. O método por reflectância pode apresentar acessórios de obtenção de espectros por Reflectância Total Atenuada (ATR), Reflectância Especular e Reflectância Difusa (WILLIAMS; NORRIS *apud* MORGANO, 2005; SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

A técnica que utiliza a reflectância difusa é conhecida como DRIFTS (*Diffuse Reflection Infrared Fourier Transform Spectroscopy*), ocorrendo em superfícies não totalmente planas, podendo o substrato ser contínuo ou fragmentado (moído). O mecanismo de funcionamento da energia radiante ocorre

com a penetração do feixe de luz e interação com as substâncias da amostra e, após absorção parcial e múltiplos espalhamentos, esta energia retorna à superfície. É importante salientar que a energia, na reflectância difusa, é atenuada após entrar em contato diversas vezes com as partículas da amostra, fornecendo muitas informações analíticas (CORDEIRO, 2006).

Outro aspecto relevante é a diferenciação entre o espectro da luz difusa e o espectro de transmissão comum (feito com pastilhas de KBr). Embora a luz difusa forneça um espectro similar ao de transmissão comum, o caminho óptico da luz pode ser variável, enquanto que o espectro de transmissão ele é constante para todo o comprimento de onda, o que torna as intensidades relativas das bandas diferentes (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002). A Figura 1 apresenta o fenômeno de reflexão difusa.

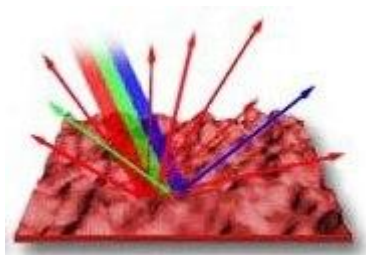


FIGURA 1 – Representação da Reflexão Difusa
FONTE: DAVIDSON; PARRY-HILL; SUTTER, 2005.

Na reflectância difusa também se observa a reflectância especular, que apresenta maior intensidade na região onde a amostra apresenta elevada absorção e, com isso, podem ocorrer distorções nos espectros obtidos. As energias absorvidas pelas moléculas da amostra fornecem informações qualitativas, enquanto que a concentração dos compostos em estudo não é completamente proporcional à intensidade espectral, sendo necessário utilizar funções e fórmulas complexas para este fim, como é o caso da função de Kubelka-Munk (Equação 1). Esta equação é utilizada para definir uma afinidade linear entre a intensidade da banda e a concentração da amostra (FERRÃO, 2001).

$$f(R\alpha) = \frac{(1 - R\alpha)^2}{2R\alpha} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde: $R\alpha$ é a reflectância difusa

De acordo com a teoria, $f(R\alpha)$ está relacionado com o coeficiente de absorção (K) e com o coeficiente de dispersão (S), expressos conforme a Equação 2.

$$f(R\alpha) = \frac{K}{S} \quad (\text{Equação 2})$$

O efeito do tamanho da partícula causa deslocamento da linha de base e torna-se pronunciado em comprimentos de onda com grande absorção pela amostra. Assim, por exemplo, em duas amostras de mesma composição, mas diferentes granulometrias haverá maior reflectância difusa nas partículas menores (MESSERSCHMIDT, 1999).

Porém, em muitas aplicações de espectroscopia por reflectância difusa as características da amostra não seguem a suposição feita pela equação de Kubelka-Munk, pois a equação foi derivada para absorções fracas, sendo, mais aplicada para amostras diluídas (FERRARINI, 2004).

2.6 Quimiometria e calibração multivariada

A quimiometria é definida como uma disciplina química que utiliza de métodos matemáticos e estatísticos para o tratamento de dados químicos, de forma a extrair maior quantidade de informações e melhores resultados analíticos. A princípio, os métodos utilizados na quimiometria foram desenvolvidos em outras disciplinas que, com a aplicação e pesquisas voltadas para o tratamento de dados químicos, deram origem a uma nova área dentro da química analítica. Desde o seu surgimento até os dias de hoje, foram desenvolvidos muitos métodos que tornaram possível o processamento e interpretação de dados que antes seriam impossíveis de serem analisados (HOPKE, 2003; OTTO, 1999 *apud* VALDERRAMA, 2005).

Os métodos de calibração multivariada têm sido cada vez mais utilizados, principalmente quando os componentes presentes em uma mistura precisam ser

determinados, mas a informação disponível não apresenta seletividade (MARTENS; NAES, 1989 *apud* NAGATA, 2001; THOMAS, 1994). Assim, ela permite determinar um componente específico em matrizes complexas ou ainda analisar vários componentes em sistemas simples. Em resumo, a base da calibração é estabelecer uma relação entre duas matrizes de dados químicos, quando houver uma dependência entre as propriedades que descrevem cada uma delas (NAGATA; BUENO; PERALTA-ZAMORA, 2001).

Um exemplo importante do sucesso da utilização da quimiometria são as análises realizadas na região do infravermelho próximo, as quais, sem a utilização de modelos de calibração multivariada não apresentam possibilidades para determinações quantitativas (HOPKE, 2003; OTTO, 1999 *apud* VALDERRAMA, 2005). Os métodos de calibração multivariada têm sido também utilizados com frequência e sucesso na resolução de problemas de interferência espectral associados a várias técnicas analíticas (NAGATA; BUENO; PERALTA-ZAMORA, 2001).

A calibração multivariada consiste de duas fases: a calibração e a previsão. Na calibração, “n” espectros, para um conjunto com composição conhecida, são obtidos em “p” valores de comprimentos de ondas diferentes, formando assim, uma matriz X, com “n” linhas e “p” colunas. Uma matriz Y também pode ser construída, contendo “n” linhas com os valores de concentração correspondendo às diferentes amostras e “q” colunas, que indica o número de diferentes analitos presentes na amostra. A seqüência seria desenvolver um modelo matemático apropriado (determinando o vetor dos coeficientes de regressão – b) que melhor possa reproduzir a matriz Ycal a partir dos dados de Xcal (Equação 3). Esse modelo, portanto, será utilizado na fase de previsão (com um conjunto teste) para estimar as concentrações (Yprev) dos constituintes de novas amostras, a partir de seus espectros (Xteste) (Equação 4). Como estas metodologias trabalham com matrizes de dados, o processo de isolar o fator Y da Equação 3 para obtenção da Equação 4, implica na utilização da matriz transposta de X, ou seja, (Xteste)^t (NAGATA; BUENO; PERALTA-ZAMORA, 2001).

$$X_{cal} = b \cdot Y_{cal} \quad \text{(Equação 3)}$$

$$Y_{teste} = (X_{teste})^t \cdot b \quad \text{(Equação 4)}$$

Os dados para a calibração multivariada podem ser organizados conforme a ilustra a Figura 2. Os valores de absorbância dos espectros, a cada comprimento de onda, correspondem às variáveis independentes, e as concentrações das amostras indicam as variáveis dependentes (TOZETTO, 2005).

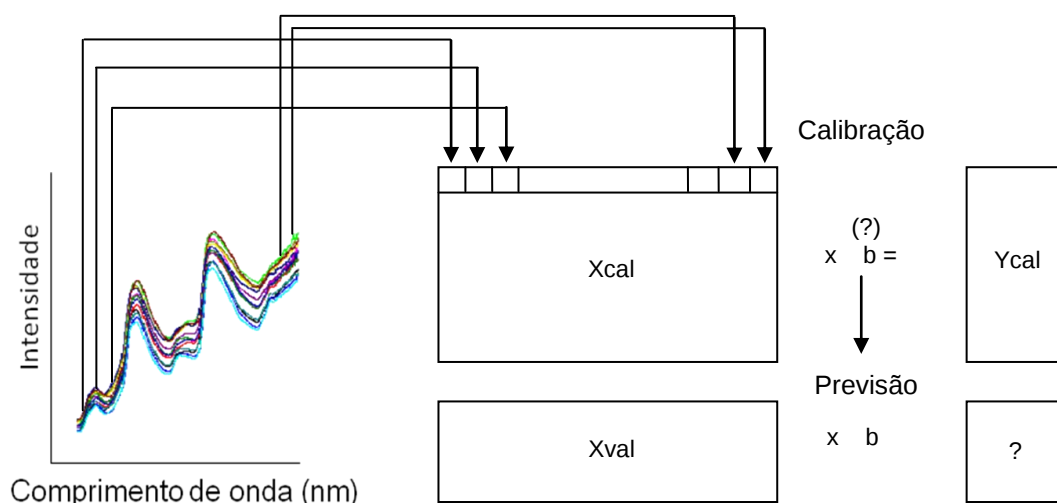


FIGURA 2 – Organização dos dados para calibração multivariada

Dentre as várias metodologias para determinar o vetor do coeficiente de regressão (b), pode-se citar o método multivariado denominado Regressão de Mínimos Quadrados Parciais (PLSR). Ele é baseado na Análise de Componentes Principais (PCA), que decompõe as matrizes de variáveis independentes X_{cal} (Equação 5) e a matriz de variáveis dependentes Y_{cal} (Equação 6) em um novo sistema de eixos (componentes principais, variáveis latentes e fatores), representando as amostras em menor número de dimensões, sem que haja perda de informação analítica relevante. As novas coordenadas da amostra são denominadas “scores” (T ou U) e o peso com que cada variável original contribui para formar as componentes principais é chamado de “loadings” (P ou Q). Posteriormente, realiza-se uma relação entre as duas matrizes de “scores” (Equação 7), das variáveis dependentes e independentes, através de um modelo linear (NAGATA; BUENO; PERALTA-ZAMORA, 2001).

$$X_{cal} = TP' + E$$

(Equação 5)

$$Y_{cal} = UQ' + E \quad (\text{Equação 6})$$

$$U = b \cdot T \quad (\text{Equação 7})$$

A escolha do número de variáveis latentes suficientes para explicar toda a informação analítica necessária, bem como, a detecção de amostras anômalas com sua subsequente retirada, constituem os principais fatores de análise para a correta obtenção do vetor b , o qual pode ser utilizado para realizar as previsões das concentrações de novas amostras através de seus respectivos dados espectrais (empregando-se a Equação 4) (NAGATA; BUENO; PERALTA-ZAMORA, 2001).

Segundo FERRÃO (2001), a escolha do número adequado de variáveis latentes ocorre no ponto onde há o menor erro de previsão. A adição de um número maior de variáveis latentes aumenta a complexidade do modelo e pode resultar em uma super estimação dos dados, comprometendo a etapa de previsão das concentrações. Em função da sua importância, uma metodologia de validação cruzada (validação interna) pode ser utilizada para auxiliar na escolha do número de variáveis latentes com base na avaliação da magnitude dos erros de previsão de um determinado modelo de calibração, sendo que a mesma avalia os dados do conjunto de calibração através da remoção de uma amostra (*leave-one-out*) ou de um conjunto de amostras (*venetian blinds*), que são reservado(s) como elemento(s) de previsão. Este processo é repetido n vezes, de maneira a permitir que todas as amostras da calibração participem como elementos de previsão (CORDEIRO, 2006). Posteriormente, a seleção do melhor modelo de calibração ocorre através da avaliação dos menores erros de previsão (Erro Padrão Relativo, RMSEC e RMSECV).

O Erro Padrão Relativo (Er) é uma medida de erro dada em porcentagem, obtido através da Equação 8:

$$\%Er = \left(\frac{y \times 100}{y'} \right) - 100 \quad (\text{Equação 8})$$

Onde y é o valor previsto e y' o valor experimental

Já a Raiz Quadrada da Média da Somatória dos Erros de Calibração (RMSEC) e a Raiz Quadrado da Média da Somatória dos Erros de Validação

Interna (RMSECV) são importantes medidas obtidas no processo de validação cruzada, onde o gráfico é fornecido em função do número de Variáveis Latentes, protegendo contra uma superestimativa na calibração dos dados (QUEJI, 2008). A fórmula para a obtenção do RMSEC ou RMSECV pode ser visualizada na Equação 9.

$$\text{RMSEC ou RMSECV} = \left[\frac{\sum_{j=i}^n (y' - y)^2}{n} \right]^{1/2} \quad (\text{Equação 9})$$

Além desses parâmetros de erros, que auxiliam na escolha dos modelos de calibração, a análise dos valores dos coeficientes de correlação (R), entre os valores previstos pelo modelo e os valores experimentais, permite avaliar a capacidade de previsão dos modelos multivariados.

A detecção de amostras anômalas ou “outliers” é uma etapa tão importante quanto à determinação do número de variáveis latentes, e ocorre com o auxílio de duas grandezas complementares: *leverage* e resíduo de *Student*. A *leverage* é uma medida de influência de uma amostra no modelo de regressão e pode ser interpretada como a distância de uma amostra ao centróide do conjunto de dados, sendo seu valor limite obtido pela Equação 10 (onde k é igual ao número de variáveis latentes e n ao número de amostras do conjunto de calibração). Já o resíduo de *Student* indica se as amostras estão incluídas na distribuição normal, considerando-se um intervalo de confiança de 95%, para isto seu valor limite é de $\pm 2,5\%$. Portanto, a análise do gráfico dos resíduos de *Student versus leverage* para cada amostra é a melhor maneira de se identificar possíveis anomalias (FERREIRA *et al.*, 1999).

$$\text{Leverage} = \frac{3k}{n} \quad (\text{Equação 10})$$

Para melhorar a eficiência dos modelos multivariados por Regressão de Mínimos Quadrados Parciais (PLSR), alguns procedimentos de transformação e/ou pré-processamento de dados podem ser empregados. Os métodos

matemáticos de transformação de dados são orientados nas linhas da matriz independente (X_{cal}) e os procedimentos de pré-processamento orientam-se tanto nas colunas da matriz de dados independentes (X_{cal}), quanto de dados dependentes (Y_{cal}) (NAGATA, 2001; QUEJI, 2008).

Dentre os métodos de transformação de dados utilizados pode-se citar:

- Correção do Efeito de Espalhamento Multiplicativo (MSC): auxilia na correção das variações do espalhamento de luz ocasionadas pelas medidas de reflectância difusa. Para cada amostra o espalhamento é estimado em relação ao de uma amostra de referência e cada espectro é corrigido de forma que todas as amostras tenham o mesmo nível de espalhamento da amostra de referência. Essa correção assume que o coeficiente de espalhamento é o mesmo para todos os comprimentos de onda, ignorando-se variações devidas a variações químicas.

- Normalização: reduz o efeito das diferenças de caminho óptico das amostras, normalizando a escala do espectro através da divisão de cada intensidade espectral pela raiz quadrada da soma dos quadrados de todas as intensidades do espectro correspondente, ou seja, multiplica-se cada elemento no vetor linha por uma constante B, conforme Equação 11 (FERRARINI, 2004):

$$B = \frac{1}{\left(\sum_{j=1}^p x_{ij}^2 \right)^{1/2}} \quad (\text{Equação 11})$$

Com relação aos procedimentos de pré-processamento pode-se citar: dados centrados na média, que é um dos métodos mais empregados em dados espectroscópicos e tem como objetivo facilitar a extração de informações espectrais, bem como, a interpretação desses dados. Este pré-processamento calcula a média das intensidades para cada comprimento de onda, sendo que posteriormente cada intensidade é subtraída do respectivo valor médio (FERREIRA *et al.*, 1999).

O método PLSR não restringe o número de comprimentos de onda para a calibração, possibilitando assim, extrair o maior número de informações do espectro. Em algumas situações a presença de interferentes não influi na calibração, fazendo com que seja necessária somente a concentração do analito.

Além disso, é uma técnica robusta, já que seus parâmetros praticamente não se alteram com a inclusão de novas amostras no conjunto de calibração (FERREIRA *et al.*, 1999; QUEJI, 2008).

2.7 Calibração multivariada e espectroscopia no infravermelho

A espectroscopia na região do infravermelho alcançou grande desenvolvimento devido à potencialidade que a técnica apresentou na caracterização e quantificação de diferentes espécies químicas. Inicialmente, devido às limitações instrumentais, os trabalhos envolvendo este tipo de espectroscopia em química restringiram-se basicamente à identificação e quantificação de algumas espécies. Posteriormente, com o desenvolvimento de equipamentos mecânicos e ópticos mais precisos, suas aplicações foram ampliadas. A partir dos anos setenta uma nova fase de estudos espectroscópicos foi iniciada, também no campo das análises quantitativas, promovido pelo desenvolvimento dos espectrofotômetros com Transformada de Fourier, da informática e a introdução de recursos matemáticos mais sofisticados (WORKMAN, 1996 *apud* VALDERRAMA, 2005).

Com essas inovações tecnológicas, os estudos quantitativos expandiram-se para as regiões espectrais no infravermelho próximo e médio. Isso desencadeou o interesse de vários grupos acadêmicos de pesquisas, governamentais e industriais, na tentativa de desenvolver metodologias de análise que pudessem ser empregadas mesmo com o crescimento da produção e produtividade industrial, e reduzissem os custos e a quantidade de resíduos gerados nos procedimentos de controle de qualidade (BURNS; CIURCZAK, 2007).

A espectroscopia no infravermelho próximo é considerada uma técnica consagrada para detecção de substâncias orgânicas. A região do NIR compreende a faixa de 780 a 2500 nm. Absorções moleculares nesta região são causadas a princípio por ligações X-H, onde X pode ser C, O ou N (WILLIAMS; NORRIS, 1990; BRUNS; CIURCZACK, 2007). As determinações analíticas no infravermelho próximo utilizam o espectro inteiro do material analisado, sendo necessário o estabelecimento de uma relação matemática entre os dados

espectrais e valores de concentrações medidos por um método de referência. Quando essa relação é bem estabelecida, a análise requerida é obtida com baixo custo, alta precisão e repetibilidade, e resultados de concentração são obtidos por meio de um modelo de calibração (OTTO, 1999; WOLD; MARTENS, 1983 *apud* SIMAS 2005).

A associação dos métodos de calibração multivariada com a espectroscopia de infravermelho já tem sido relatada em diversos setores da área de alimentos, incluindo desde a sua produção até o produto alimentício processado.

Diversas aplicações foram descritas por WATSON (1977), nas quais o infravermelho próximo foi empregado na análise de produtos agrícolas. Entre estas aplicações foi consagrado o emprego da espectroscopia NIR na determinação de proteína em substituição ao método Kjeldahl, que apesar de ser bastante preciso é um procedimento lento e gerador de resíduos (SCHUSTER, 1978). A região do visível/infravermelho próximo também foi usada para avaliar produtos agrícolas em mais de 50 espécies de alimentos e temperos, e resultados demonstraram que a metodologia proposta é um bom método de análise para a obtenção de informações sobre os componentes nutricionais e sua composição química (MCCAIG, 2002).

A espectroscopia NIR foi empregada também para a determinação de umidade em sementes (HART; NORRIS; GOLUMBIC, 1962), na análise de grãos e produtos industrializados (OSBORNE, 1983; OSBORNE, 1986 *apud* FERRARINI, 2004). Alguns autores observaram, que mudanças de temperatura (entre 5 e 20° C) provocam diferenças significativas na largura das bandas dos espectros (14000 – 9259 cm⁻¹), o que foi atribuído à água, e como consequência influenciavam na determinação de umidade por NIR (WÄHLBY; SKJÖDEBRAND, 2001 *apud* FERRARINI, 2004; REN; CHEN, 1997; BÜNING-PFAUE, 2003; DAS; DAS; BAL, 2004; GILLON *et al.*, 2004).

FERRARINI (2004) analisou os valores nutricionais do milho em grão, utilizando a espectroscopia no infravermelho com Transformada de Fourier aplicando a técnica de refletância difusa. Dos parâmetros analisados, a previsão do valor de proteína bruta na região do infravermelho médio, apresentou os melhores resultados, com erro relativo médio de previsão de 7,91%. Na

determinação simultânea de proteína bruta, fibra bruta e extrato etéreo, na região do NIR, os melhores resultados foram obtidos para os modelos com pré-tratamento de alisamento e correção do espalhamento de luz (MSC), com erro relativo médio de previsão de 8,06; 10,09; 10,89%, respectivamente.

Para o controle de qualidade de farinhas, as indústrias de moagens têm utilizado a técnica de espectroscopia de infravermelho para determinação de proteína bruta, além de outros parâmetros analisados como valor energético e matéria seca. MIRALBÉS (2004) utilizando a espectroscopia de transmitância no NIR, analisando a qualidade da moagem industrial através da determinação de proteína, umidade, glúten e cinzas, obtendo resultados rápidos e satisfatórios. Para todos os parâmetros analisados os coeficientes de regressão (R^2) excederam 0,90, indicando que a metodologia poderia ser rapidamente utilizada para selecionar o destino correto da farinha produzida (panificação, massas e/ou confeitaria). Outra proposta nesta mesma linha foi realizada por FERRÃO e colaboradores (2004), cuja técnica de espectroscopia por reflexão no infravermelho próximo (NIRRS) e por reflexão difusa no infravermelho médio com Transformada de Fourier (DRIFTS) foram empregadas com o método de regressão por mínimos quadrados parciais (PLSR) para a determinação simultânea dos teores de proteína e cinza em amostras de farinha de trigo da espécie *Triticum aestivum* L. Foram utilizadas cinquenta e cinco amostras para calibração e 45 para validação, adotando-se como critério de construção os valores mínimos do erro padrão de calibração (SEC) e do erro padrão de validação (SEV). Estes valores foram inferiores a 0,33% para proteína e a 0,07% para cinza. Os métodos desenvolvidos apresentam como vantagens a não agressão ao ambiente, bem como a determinação direta, simultânea, rápida e não destrutiva dos teores de proteína e cinza em amostras de farinha de trigo.

SIMAS (2005) determinou proteína bruta e aminoácidos em farelo de soja empregando NIRRS e calibração multivariada. Foram utilizadas amostras provenientes de diferentes regiões brasileiras. A avaliação dos modelos mostra que foi possível determinar com boa confiabilidade a quantidade de proteína bruta, ácido glutâmico, ácido aspártico, arginina, treonina, valina, leucina, tirosina, triptofano, cistina e metionina. Já para os aminoácidos lisina, alanina, isoleucina e fenilalanina, as faixas de calibração foram menores que o desvio padrão, se

mostrando fora das normas previstas. Para os aminoácidos histidina, serina, glicina e prolina, os modelos foram insatisfatórios.

MORGANO *et al.* (2005) investigaram a combinação da espectroscopia no infravermelho próximo e PLSR para a determinação do teor de proteína total em amostras de café cru. Foram coletados 159 espectros das amostras de café cru utilizando um acessório de reflectância difusa. O método analítico proposto possibilitou a determinação direta, sem destruição da amostra, com obtenção de resultados rápidos e sem o consumo de reagentes químicos para o preparo da amostra. O método proposto forneceu resultados com boa capacidade de previsão do teor de proteína total, sendo que os erros médios foram inferiores a 6,7%.

Determinações de umidade e gordura em manteiga com espectroscopia na região do NIR têm sido feitas levando em consideração as vantagens apresentadas por esta técnica de análise, bem como, o uso de uma pequena quantidade de amostra sem destruí-la. O erro padrão de calibração (SEC) foi de 0,192 e coeficiente de correlação $R^2=0,90$ para umidade, SEC=0,086 e $R^2=0,93$ para sólidos não gordurosos e SEC=0,168 e $R^2=0,94$ para gordura (HERMIDA *et al.*, 2001).

GONZÁLEZ-MARTÍN *et al.* (2008) determinaram em queijos de leite de vaca, cabra e ovelha gordura, umidade, proteínas e cloreto, no NIR acoplado com uma sonda de fibra óptica. Foi empregado o método de mínimos quadrados parciais modificado (MPLS) para se obter a regressão. Os resultados da análise de 24 amostras (conjunto de validação externa) evidenciaram que a metodologia proposta não difere significativamente da metodologia referência com 95% de confiança. Além disso, erros médios menores que 5,1% foram obtidos para a determinação de gordura, proteína e umidade.

SULTANEH; ROHM (2007) avaliaram os teores de sólidos totais e proteína em amostras de requeijão não homogeneizado e homogeneizado, obtendo resultados satisfatórios com coeficientes de correlação (R^2) de 0,994 e RMSECV de 0,502 para sólidos totais e R^2 de 0,985 e RMSECV de 0,548 para proteína, em requeijão não homogeneizado. Melhores resultados foram obtidos na determinação de sólidos totais e proteína, com valores de R^2 de 0,997 e 0,992 e RMSECV de 0,388 e 0,381, respectivamente para requeijão homogeneizado.

Determinações dos teores de umidade, gordura e sais inorgânicos em queijos fundidos no NIR foram avaliados por BLAZQUEZ *et al.* (2004). Os melhores modelos obtidos apresentaram R^2 de 0,99 e SECV de 0,50 para umidade, sendo que para gordura foi obtido um R^2 de 0,98 e SECV de 0,45.

KAROUI *et al.* (2006) determinaram gordura, NaCl, pH, nitrogênio não protéico e nitrogênio total em amostras de queijo *Emmental*, obtendo melhores resultados, para gordura e nitrogênio total, utilizando o infravermelho próximo. O melhor modelo obtido para gordura apresentou R^2 de 0,94 com RMSEP de 0,39 e para nitrogênio total os valores de R^2 e RMSEP foram de 0,86 e 0,054, respectivamente.

SAUER-LEAL; OKADA; PERALTA-ZAMORA (2008) avaliaram os teores de gordura, proteína, umidade, sólidos totais, cinzas e pH em amostras de queijo prato, utilizando NIR. Os resultados demonstraram que os erros médios foram menores que 2,6% e valores de RMSEP abaixo de 0,70 para todos os parâmetros analisados.

SINELLI *et al.* (2005) monitoraram as mudanças em parâmetros químicos e reológicos na vida de prateleira de ricotas, utilizando a espectroscopia no infravermelho próximo (FT-NIR) equipado com um espectrômetro de fibra óptica operando em reflectância difusa. Os resultados dessa análise mostraram que, em todos os casos, a temperatura de armazenamento influenciou nos resultados durante a vida de prateleira das amostras.

Até o presente momento, este é o único trabalho reportado na literatura envolvendo a técnica FT-NIR associada à calibração multivariada na análise de ricotas. Em função destes aspectos e da importância que o assunto reveste, este trabalho tem por objetivo avaliar os parâmetros físico-químicos através da espectroscopia no infravermelho associado à calibração multivariada.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Desenvolver modelos de calibração multivariada (PLSR) para viabilizar as determinações da composição físico-química em amostras de ricota, utilizando a técnica de espectroscopia por reflectância difusa no infravermelho próximo.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar a composição físico-química da ricota segundo a metodologia padrão;
- Construir modelos de calibração multivariada (PLSR) a partir da correlação de espectros DRIFTS e propriedade química desejada;
- Testar a capacidade de previsão dos modelos construídos em relação ao conjunto de validação externa.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostras

Para a construção dos modelos de regressão foram usadas 19 amostras de ricota frescas e prensadas (tradicional ou *light*) adquiridas em supermercados das cidades de Ponta Grossa e Curitiba (Paraná – Brasil).

As amostras foram adquiridas, e então transportadas em caixa térmica para o laboratório, sendo posteriormente armazenadas em refrigerador. Todas as amostras foram trituradas e separou-se uma parte como contra amostras, sendo estas últimas armazenadas sob congelamento.

4.2 Reagentes

Todos os reagentes empregados no preparo de soluções ou para uso direto nas análises físico-químicas foram de grau analítico PA. As soluções foram preparadas com água destilada utilizando-se material volumétrico, e padronizadas quando necessário.

4.3 Análises físico-químicas convencionais

Todas as amostras foram homogeneizadas em triturador doméstico até a obtenção de partículas de tamanho reduzido. As análises físico-químicas das amostras de ricota foram realizadas em triplicata.

4.3.1 Determinação de pH

O pH das ricotas foi avaliado utilizando potenciômetro TECNAL (modelo TEC-2 mp) equipado com eletrodo de vidro combinado e previamente calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 7,0 (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985).

Em um béquer de 50,0 mL pesaram-se 20,0 g ($\pm 0,0001$) da amostra de ricota triturada, adicionando em seguida 20,0 mL de água destilada. Após homogeneização da mistura, a leitura de pH foi realizada diretamente.

4.3.2 Determinação de extrato seco total e umidade

O teor de extrato seco total foi obtido gravimetricamente, utilizando-se estufa convencional marca BRASIMET (modelo ESE 35) enquanto que o teor de umidade foi obtido por diferença, conforme método n° 926.08 (AOAC, 1995).

Pesaram-se 3,0 g ($\pm 0,0001$) de amostra de ricota em uma placa de alumínio e adicionou-se areia purificada, previamente seca e tarada. Após homogeneização, a mistura foi colocada em estufa a 105°C durante 12 horas. Em seguida, as placas foram transferidas para dessecadores para resfriamento e pesagem.

O teor de umidade foi obtido retirando-se do total pesado, a quantidade de extrato seco.

4.3.3 Determinação do teor de gordura

O teor de gordura da ricota foi determinado utilizando-se o método de Gerber (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985).

Alíquotas de 2,5 g ($\pm 0,0001$) de amostras moídas e homogeneizadas foram pesadas diretamente no suporte de butirômetro de Van Gulik (específico para queijos). Após adaptação deste suporte ao conjunto foram adicionados 5 mL de água a 42°C, seguido de homogeneização e adição de 10 mL de H₂SO₄ ($d=1,825\text{g.cm}^{-3}$). Os butirômetros foram colocados em banho-maria, marca BEL (modelo 204 T4) a 65°C sob agitação, até total degradação da amostra.

Após a degradação total, adicionou-se 1 mL de álcool isoamílico e água aquecida a 30°C até a marca de 32,5 da escala do butirômetro, retornando-o ao banho-maria por 2 a 3 minutos, sem agitação, obtendo-se uma mistura homogênea. Após o ajuste das rolhas superiores, o conjunto foi novamente homogeneizado e levado à centrífuga de Gerber, marca IR (modelo SUPER FJ-257) por 5 minutos.

Após a centrifugação os mesmos retornaram ao banho-maria e o volume de gordura foi medido na escala do butirômetro, expresso em porcentagem, sendo convertido para massa pesada pela Equação 12 (AOAC, 1995):

$$\%G = \frac{(leitura \times 3)}{m_{amostra}} \quad \text{(Equação 12)}$$

Onde %G= Percentual de gordura e m = massa da amostra

4.3.4 Determinação da acidez total titulável

A determinação da acidez titulável das ricotas foi realizada, segundo método nº 920.124 (AOAC, 1995), pesando-se 10,0 g ($\pm 0,0001$) da amostra em um balão volumétrico de 100 mL, adicionando-se água destilada a 42°C até completar o volume. Posteriormente, realizou-se agitação vigorosa, decantação e filtração em papel filtro Whatman nº 42. Pipetou-se uma alíquota de 10,0 mL do filtrado transferindo-se para erlenmeyer de 250 mL, acrescentou-se 4 gotas de indicador fenolftaleína 1% (m/v) e titulou-se com solução padrão de NaOH 0,1 mol.L⁻¹ até ponto de viragem. O resultado foi expresso em % de ácido láctico.

4.3.5 Determinação do teor de nitrogênio total

A determinação de nitrogênio total das ricotas foi efetuada, segundo método nº 920.105 (AOAC, 1995), pesando-se 0,100 g ($\pm 0,0001$) da amostra em tubos de micro-Kjeldahl, adicionando-se em seguida, cerca de 1 g de mistura catalítica, e então 5,0 mL de H₂SO₄ concentrado. A mistura foi levada para digestão em chapa elétrica, marca NOVA TÉCNICA (modelo DIG350), com temperatura inicial de 50°C e aumento gradativo até atingir a temperatura de 400°C. Esta temperatura foi mantida até completa digestão da amostra, fato que foi verificado pela mudança de coloração da solução (para verde, azul claro ou transparente). Resfriaram-se os tubos e em seguida adicionou-se 10 mL de água destilada.

Neutralizou-se a solução digerida com NaOH 30% (base adicionada até aparecimento do precipitado marrom). Concluída esta etapa, iniciou-se a destilação, em destilador de nitrogênio e proteína, marca NOVA TÉCNICA (modelo NT415). Como solução receptora utilizou-se 10 mL de ácido bórico (H₃BO₃, 2%) em erlenmeyer de 250 mL adaptado ao destilador. A destilação foi

conduzida até que a solução receptora mudasse de coloração (roxo para verde) cerca de 50 mL.

O destilado (50,0 mL) foi titulado com solução padrão de H_2SO_4 0,02 mol.L⁻¹, até mudança de coloração (verde para roxo), anotando-se o volume gasto de ácido.

O resultado foi expresso em % de nitrogênio total e convertido a % de proteína utilizando-se o fator 6,38 (fator de conversão de nitrogênio para proteína de leite e produtos lácteos) (IDF, 1962).

4.3.6 Determinação do teor de cinzas

O conteúdo de cinzas da ricota foi determinado, segundo o método n° 935.42 (AOAC, 1995), pesando 2,0 g ($\pm 0,0001$) da amostra em cadinho de porcelana previamente tarado. Em seguida, carbonizou-se a amostra em chapa aquecedora de modo a evitar o espalhamento e perda de gordura, e então colocou-se em mufla, marca QUIMIS (modelo 318D24), a 540°C por 18 horas. Ao final desse período, resfriou-se a amostra no dessecador a temperatura ambiente e, por fim, pesou-se.

4.3.7 Determinação do teor de cloretos (como NaCl)

A porcentagem de cloreto de sódio presente nas ricotas foi determinada pelo método titulométrico de Mohr, segundo o método n° 960.29 (AOAC, 1995). Aos cadinhos contendo as cinzas (obtidas no item 4.3.6) adicionou-se duas gotas de HNO_3 concentrado e transferiu-se quantitativamente o conteúdo (com água destilada e aquecida a 90°C) para filtro adaptado a um balão volumétrico de 100,0 mL. Após a filtração, o balão foi resfriado e o volume completado com água destilada.

Uma alíquota de 20,0 mL da solução do filtrado foi transferida para erlenmeyer de 250 mL, neutralizando-se com CaCO_3 e adicionando-se 0,50 mL do indicador cromato de potássio a 5% (m/v). A titulação foi realizada com solução padrão de AgNO_3 0,1 mol.L⁻¹ até viragem característica.

4.4 Determinação de carboidratos pelo Método de Folin Wu

A concentração de carboidratos presente nas amostras de ricota foi determinada pelo método de Folin Wu, que tem como fundamento a redução do açúcar por oxidação via reagente alcalino de cobre. O sal cuproso resultante reduz o ácido fosfomolibdico com formação de uma solução de coloração azul (HINDIN, 1953).

Para o procedimento pesou-se 1,0 g ($\pm 0,0001$) da amostra em balão volumétrico de 100,0 mL e adicionou-se 2,0 mL de tungstato de sódio e então, gota a gota, 2,0 mL de ácido sulfúrico 0,66 mol.L⁻¹. A mistura foi agitada e deixou-se em repouso por 50 min. Completou-se o volume com água destilada e filtrou-se em papel Whatmann nº1, descartando os primeiros 5,0 mL.

Pipetou-se 1,0 mL do filtrado em tubo de ensaio, adicionou-se 2,0 mL do reativo alcalino de cobre a cada tubo, em seguida os tubos foram colocados em banho-maria fervente durante 8 min. Os tubos foram resfriados em banho de gelo e adicionou-se 4,0 mL do reativo de Folin Wu (ácido molibdico, tungstato de sódio, hidróxido de sódio 10% e ácido fosfórico 85%), então a mistura foi deixada em repouso durante 1 min. Foram adicionados 18,0 mL de água destilada e a mistura foi homogeneizada. Após completa homogeneização, realizou-se a leitura espectrofotométrica em 520 nm, em espectrofotômetro UV-VIS, marca CINTRA 10 (modelo Cintra Double Beam). Para construção da curva analítica, empregou-se a faixa de concentração de lactose compreendida entre 100 a 500 µg de lactose.

4.5 Análises de espectroscopia no infravermelho por reflectância difusa

Para a obtenção dos espectros, as amostras de ricota foram inicialmente cortadas de forma a proporcionar uma superfície plana que fosse representativa do interior das mesmas. Posteriormente, a superfície plana foi analisada em Espectrofotômetro Infravermelho Próximo, marca FEMTO (modelo NIR 900 PLS), sendo realizadas duas medidas espectrofotométricas de cada amostra. Cada uma das duplicatas foi realizada em regiões diferentes da superfície plana supracitada. Os espectros foram obtidos com resolução de 2 nm e região espectral de 1100 a

2500 nm. O instrumento operou no modo de reflectância difusa, sendo os sinais expressos em $\log(1/R)$.

Para a montagem das matrizes de dados espectrais e de concentração dos analitos de interesse utilizou-se o software Origin Pro 6.1[®], enquanto que para a elaboração dos modelos de calibração empregou-se o pacote PLS-Toolbox 3.0, que opera em ambiente Matlab 6.1. Particularmente, a análise de PCA foi realizada utilizando-se o programa Pirouette for Windows 3.11.

4.5.1 Seleção das amostras

A análise espectral das 19 amostras de ricota foi conduzida em duplicata, totalizando 38 espectros. A seleção das amostras para os conjuntos de calibração e validação foi baseada nos resultados da Análise por Componentes Principais, metodologia que assegura a obtenção de um conjunto homogêneo e representativo tanto para a etapa de calibração quanto para a etapa de validação.

Para a fase de calibração trabalhou-se com 33 espectros e para a fase de validação externa foram selecionados 5 espectros correspondentes a 4 amostras de ricota.

4.5.2 Desenvolvimento dos modelos de calibração multivariada

Para a construção dos modelos de regressão multivariados, trabalhou-se com os 33 espectros das ricotas correspondentes ao conjunto de calibração, e com os valores médios dos parâmetros físico-químicos.

Durante a etapa de otimização do modelo multivariado foi utilizado o procedimento de validação cruzada (validação interna). A habilidade do modelo de calibração para estimar (ou prever) os teores de acidez, carboidratos, cinzas, cloretos, extrato seco, gordura, pH, proteína e umidade a partir dos espectros NIR foi avaliada principalmente, através dos erros de previsão (RMSEC e RMSECV) e os coeficientes de correlação do conjunto de validação externa (R_{val}).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Resultados das análises físico-químicas

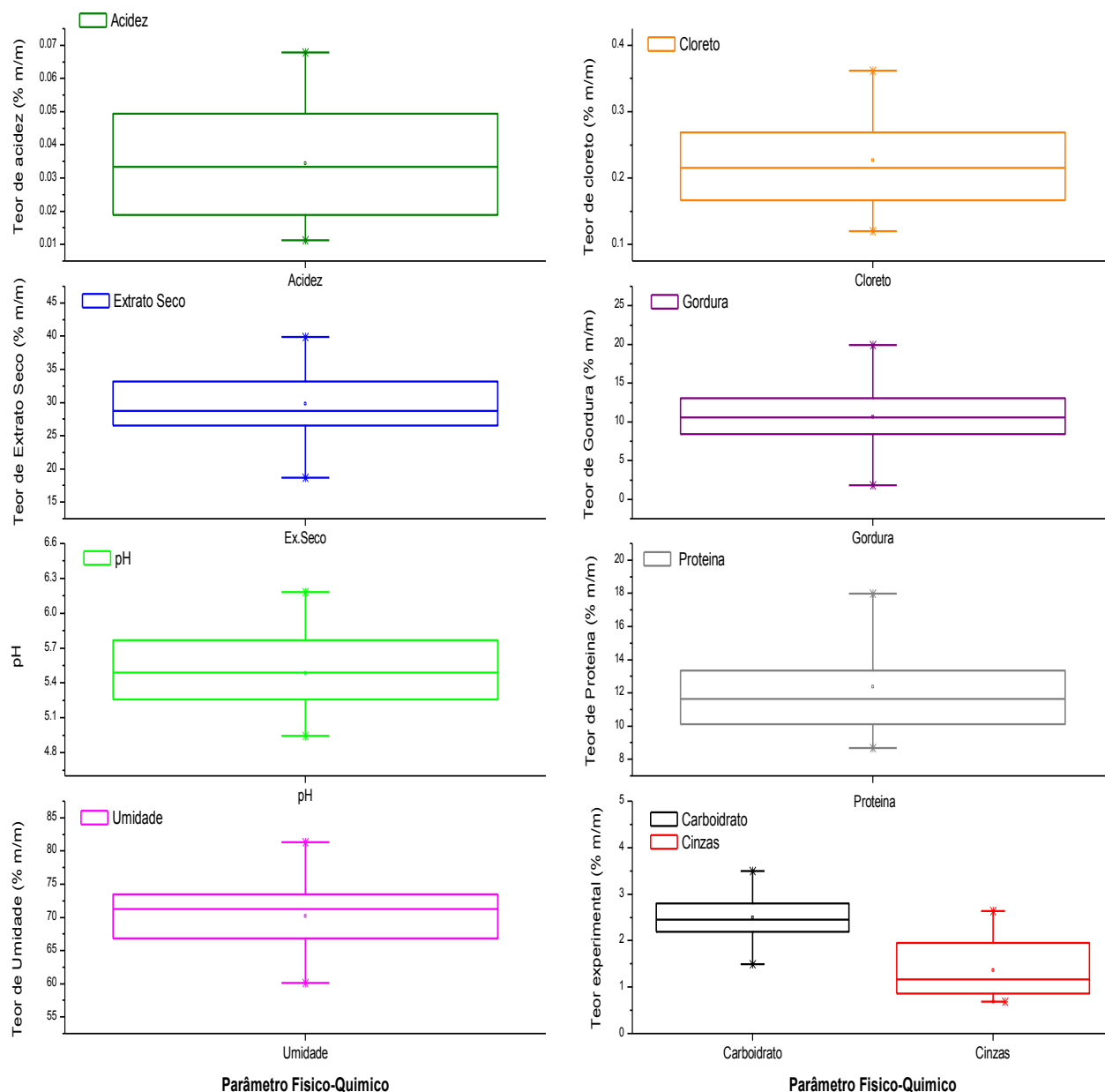
A Tabela 1 apresenta os resultados das análises físico-químicas dos teores de acidez (% m/m), carboidratos (% m/m), cinzas (% m/m), cloretos (% m/m), extrato seco (% m/m), gordura (% m/m), pH, proteína (% m/m) e umidade (% m/m) das 19 amostras de ricota utilizadas neste estudo. Esses resultados representam os valores médios encontrados durante as análises, bem como, os intervalos (valores mínimo e máximo), os coeficientes de variação para cada determinação e do balanço de massa dos constituintes das amostras, onde são considerados para este cálculo: carboidratos, cinzas, gordura, proteína e umidade.

No balanço de massa das 19 amostras analisadas, 17 amostras apresentaram um somatório próximo a 100%, porém 2 amostras (amostra denominada 27, 28 e 31, 32) apresentaram balanço de massa final abaixo dos valores aceitáveis pela legislação (entre 95 e 105%). Estes resultados podem sugerir erros experimentais, entretanto, na avaliação posterior dos espectros via PCA, a amostra referência smp31, smp32 e smp27, apresentaram valores de scores diferenciados da média amostral. Esta característica evidencia uma composição diferenciada dessas amostras em relação às demais e que pode ser facilmente observado através da análise de PCA.

Na Figura 3 são apresentados os resultados avaliados pelos gráficos boxplot que mostram a variabilidade dos dados, bem como possíveis outliers (valores extremos) existentes nos conjuntos de dados. Através dele, é possível ter uma visão geral do comportamento dos dados considerando o Q_1 (primeiro quartil), a mediana, o Q_3 (terceiro quartil) e a posição do valor médio comparados com essas três medidas.

Primeiramente observou-se que, em parâmetros como carboidratos, cinzas, cloretos, extrato seco, gordura, pH e umidade existem possíveis amostras anômalas (outliers). Esse fato é devido à grande variação da composição centesimal da amostra em estudo, cujos possíveis outliers representam as maiores ou menores concentrações de cada um dos parâmetros citados. Em

função disto, não considerou-se a retirada de nenhum possível outlier, para que, a construção dos modelos multivariados não apresentasse uma faixa de concentração limitada. Nos demais parâmetros (acidez e proteína) não observaram-se possíveis outliers.



Ponto dentro do retângulo: Média; Linha do meio do retângulo: Mediana; Primeiro e terceiro quartil (linha superior e inferior do retângulo): 75% e 25% respectivamente das amostras; Valores máximos e mínimos (linhas nas extremidades, acima e abaixo do retângulo): 95% e 5% respectivamente das amostras; Asteriscos na extremidade superior e inferior: 99% e 1% respectivamente (possíveis outliers).

FIGURA 3 – Boxplot dos parâmetros físico-químicos analisados

Considerando acidez, cinzas e cloretos, uma maior variação dos dados foi obtida, demonstrando a heterogeneidade das amostras. Esse fato pode ser confirmado pelo alto coeficiente de variação destes parâmetros observados na Tabela 1. Já para os demais parâmetros analisados (carboidratos, extrato seco, gordura, pH, proteína e umidade) não observaram-se grandes variações nos gráficos de boxplot, confirmado pelos menores valores de coeficiente de variação (Tabela 1), o que demonstrou uma maior homogeneidade das amostras quanto à estes constituintes.

TABELA 1 – Resultados dos teores de acidez, carboidratos, cinzas, cloretos, extrato seco, gordura, pH, proteína e umidade encontrados nas amostras de ricota

Amostras	Acidez/desvio* (% m/m)	Carboidratos/desvio* (% m/m)	Cinzas/desvio* (% m/m)	Cloretos/desvio* (% m/m)	Extrato seco/desvio* (% m/m)	Gordura/desvio* (% m/m)	pH/desvio*	Proteína/desvio* (% m/m)	Umidade/desvio* (% m/m)	Balanco de massa (% m/m)
1, 2	0,0125 ± 17,3	2,45 ± 1,6	0,85 ± 3,0	0,204 ± 10,2	32,31 ± 0,6	13,05 ± 3,7	6,18 ± 0,8	12,77 ± 2,8	67,69 ± 0,3	96,81
3, 4	0,0298 ± 6,9	2,04 ± 4,6	1,26 ± 2,2	0,362 ± 14,2	31,12 ± 1,4	9,89 ± 1,8	5,49 ± 0,5	16,02 ± 4,7	68,87 ± 0,6	98,08
5, 6	0,0337 ± 0	2,55 ± 4,4	0,68 ± 5,0	0,196 ± 6,9	28,72 ± 2,3	9,61 ± 1,6	4,94 ± 0,3	12,88 ± 2,2	71,28 ± 0,9	97,00
7, 8	0,0679 ± 0	1,90 ± 2,6	1,25 ± 2,5	0,144 ± 8,1	24,96 ± 0,4	6,83 ± 4,7	5,11 ± 0,1	11,19 ± 1,3	75,04 ± 0,1	96,21
9, 10	0,0518 ± 0	2,07 ± 3,0	2,64 ± 0,5	0,215 ± 15,3	34,40 ± 2,3	18,36 ± 4,2	5,34 ± 0,4	10,10 ± 1,3	65,60 ± 1,2	98,77
11, 12	0,0237 ± 8,7	3,14 ± 4,4	0,91 ± 0,5	0,142 ± 6,4	18,65 ± 3,8	1,88 ± 2,0	5,54 ± 0,8	11,19 ± 3,4	81,35 ± 0,9	98,47
13, 14	0,0494 ± 0	2,31 ± 3,4	0,86 ± 2,3	0,182 ± 10,5	28,46 ± 3,8	13,49 ± 0,1	4,98 ± 0,3	9,94 ± 2,5	71,54 ± 1,5	98,14
15, 16	0,0377 ± 0	2,31 ± 0	1,05 ± 3,0	0,283 ± 12,0	29,23 ± 0,6	10,57 ± 4,6	5,00 ± 0,3	13,34 ± 1,0	70,77 ± 0,3	98,04
17, 18	0,0189 ± 0	3,23 ± 4,6	2,60 ± 1,5	0,357 ± 10,6	27,15 ± 1,6	11,26 ± 1,7	5,72 ± 0,3	8,86 ± 2,8	72,85 ± 0,6	98,80
19, 20	0,0265 ± 0	2,79 ± 2,6	2,05 ± 3,7	0,167 ± 10,2	26,55 ± 2,1	8,72 ± 4,4	5,77 ± 0,5	10,82 ± 4,5	73,45 ± 0,8	97,83
21, 22	0,0333 ± 0	2,52 ± 2,6	1,16 ± 3,9	0,251 ± 9,1	26,46 ± 3,3	2,98 ± 2,9	5,39 ± 0,2	17,97 ± 1,3	73,53 ± 1,2	98,16
23, 24	0,0608 ± 0	2,64 ± 3,5	2,16 ± 1,0	0,219 ± 21,1	27,37 ± 0,5	12,31 ± 3,9	5,31 ± 0,1	8,69 ± 1,5	72,63 ± 0,2	98,43
25, 26	0,0212 ± 10,2	2,79 ± 2,6	1,36 ± 3,1	0,253 ± 1,2	33,15 ± 1,1	10,44 ± 0,4	5,83 ± 0,1	17,09 ± 0,9	66,85 ± 0,5	98,53
27, 28	0,0183 ± 0	3,49 ± 2,6	0,77 ± 0,5	0,120 ± 12,0	33,18 ± 1,8	10,76 ± 1,4	5,67 ± 0,2	10,41 ± 1,6	66,82 ± 0,9	92,25
29, 30	0,0570 ± 0	2,32 ± 2,5	1,17 ± 2,5	0,159 ± 19,2	26,78 ± 3,6	8,44 ± 2,8	5,26 ± 0,1	11,65 ± 1,5	73,21 ± 1,3	96,79
31, 32	0,0432 ± 0	3,07 ± 2,7	1,15 ± 1,5	0,168 ± 20,9	25,85 ± 1,6	1,84 ± 2,7	5,41 ± 0	12,21 ± 3,0	74,15 ± 0,5	92,42
33, 34	0,0381 ± 0	1,49 ± 3,7	1,95 ± 2,3	0,360 ± 3,2	33,81 ± 2,5	19,13 ± 2,9	5,56 ± 0,2	9,36 ± 3,7	66,19 ± 1,3	98,12
35, 36	0,0153 ± 0	2,19 ± 1,7	0,84 ± 4,1	0,269 ± 1,8	39,90 ± 2,5	19,92 ± 3,1	5,81 ± 0,4	12,77 ± 4,5	60,09 ± 1,7	95,81
37, 38	0,0146 ± 0	2,19 ± 3,8	1,22 ± 3,5	0,259 ± 2,3	37,61 ± 0,5	12,52 ± 2,1	5,91 ± 0,1	17,84 ± 1,1	62,39 ± 0,3	96,16
Intervalos	0,0125 - 0,0679	1,49 - 3,49	0,68 - 2,64	0,120 - 0,362	18,65 - 39,90	1,84 - 19,92	4,94 - 6,18	8,69 - 17,97	60,09 - 81,35	
Média amostral	0,0344	2,50	1,38	0,227	29,77	10,63	5,48	12,37	70,23	
** Dp	0,02	0,5	0,6	0,07	4,9	5,1	0,3	2,9	4,9	
***CV (%)	58,1	20,0	43,5	30,8	16,5	48,0	5,5	23,4	7,0	
F calculado	1668,43	86,75	505,54	16,34	185,79	298,81	767,85	127,03	185,79	
F crítico	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18	

*Desvio padrão relativo entre as replicatas

**Desvio padrão amostral: somatória dos desvios em relação à média amostral, elevado ao quadrado, dividido pelo número de amostras menos um (QUEJI, 2008)

*** CV: Coeficiente de variação amostral: (desvio padrão amostral/Média amostral) x 100 (QUEJI, 2008)

F_{calculado} > F_{crítico} há diferença significativa entre as médias (p < 0,05)

5.1.1 Acidez titulável e pH

Os teores de acidez titulável variaram de 0,0125 a 0,0679 (% m/m), sendo que os valores máximos e mínimos de pH obtidos foram 4,94 a 6,18, respectivamente. A partir da visualização da Tabela 1, pode-se observar que para ambos os parâmetros (acidez titulável e pH) as amostras apresentaram diferenças significativas ($F_{\text{calculado}} \gg F_{\text{crítico}}$, $p < 0,05$).

A determinação do teor de acidez titulável forneceu um coeficiente de variação na ordem de 58,1%, indicando heterogeneidade das amostras com relação a este parâmetro. Já com relação ao pH o coeficiente de variação encontrado foi de 5,5%, demonstrando um maior grau de homogeneidade das amostras para pH.

Os valores de desvio (Tabela 1) das triplicatas das 19 amostras mostram, em alguns casos, valores superiores a 10%, isso é devido a pequenas variações nas triplicatas dos valores determinados, pois os valores absolutos de acidez são baixos gerando assim, altos desvios. Para todos os outros casos, os valores de desvio foram iguais a zero, não havendo, portanto, valores diferentes entre as triplicatas. Já os valores de desvio para a determinação de pH são baixos, não sendo, sua média, superior a 1%.

Em trabalho desenvolvido por ESPER; BONETS; KUAYE (2007), que analisaram a composição físico-química de ricotas comercializadas no município de Campinas (SP), a acidez titulável apresentou grande variação. O maior teor de acidez titulável foi 1,25%, com pH 5,00, e o menor teor de acidez foi 0,13% (2 amostras) e pH 5,25 e 5,37.

Os valores de pH de ricota são próximos aos valores encontrados em queijo Minas frescal conforme observou CARVALHO (2003) encontrando valores de pH variando de 4,93 a 6,45 para queijos produzidos por acidificação direta, pH de 5,07 a 6,33 para queijos produzido por adição de cultura lática e, para queijos produzidos por ultrafiltração, variação de 6,35 a 6,70.

O pH e o teor de acidez titulável, via de regra, se correlacionam de forma inversa, fato este nem sempre observado na comparação entre os dados das 19 amostras. Assim como verificou ESPER (2006) que analisou a composição físico-química de ricotas, foram detectadas amostras com acidez alta e pH não tão baixo, o que pode ser relacionado à adição de cloreto de cálcio durante a manufatura da ricota provocado um efeito tampão que não alterou significativamente o pH.

A adição de CaCl_2 ao leite (que já está saturado em fosfato de cálcio) induz diminuições nas concentrações de fosfato e citrato na fase aquosa, sugerindo associação de cálcio, fosfato de cálcio e sais de citrato na micela de caseína. Estas associações são responsáveis por mudanças na capacidade tampão. Assim, a adição de cálcio até $17,5 \text{ mmol.kg}^{-1}$ resulta em um aumento na capacidade tampão entre o pH 4,5 e 5,5 (PHILIPPE *et al.*, 2003; UDABAGE; MCKINNON; AUGUSTIN, 2000; SALAÜN; MIETTON; GAUCHERON, 2005).

Sais de citrato de cálcio são quelantes e induzem a solubilização de fosfato de cálcio coloidal, sendo que a capacidade de tamponamento é deslocada para pH básico porque parte do fosfato inorgânico coloidal é solubilizado e, ao mesmo tempo, aumenta a quantidade de sais de citrato, tamponando o meio (SALAÜN; MIETTON; GAUCHERON, 2005).

As proteínas do soro também têm uma capacidade máxima de tamponamento entre pH 3 e 4. Esta zona tampão está relacionada à presença de aminoácidos ácidos. Por outro lado há também outra área de tamponamento em valores de pH acima de 8 relacionadas à presença de aminoácidos básicos. A capacidade de armazenamento de caseína purificada é máxima em torno de pH 5 a 5,5 devido a resíduos de fosfoserina e também à presença de resíduos de histidina (SALAÜN; MIETTON; GAUCHERON, 2005).

5.1.2 Teor de carboidratos

Para a determinação de lactose nas amostras de ricota um método colorimétrico foi realizado. A Figura 4 ilustra a curva analítica construída para a determinação desejada nas amostras, observando-se um bom coeficiente de correlação e linearidade na faixa de concentração estudada.

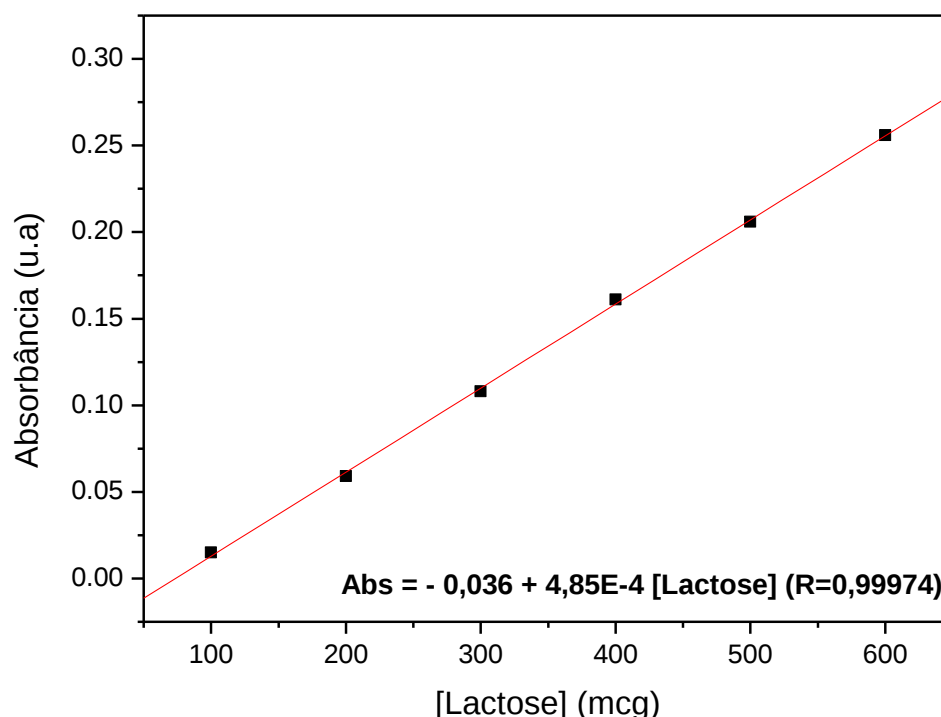


FIGURA 4 – Curva analítica para determinação de lactose

O teor de carboidratos variou de 1,49 a 3,49 (% m/m), obtendo-se um coeficiente de variação na ordem de 20,0%, indicando homogeneidade das amostras com relação a este parâmetro. Os teores de carboidratos das 19 amostras de ricota também demonstraram diferenças significativas ($F_{\text{calculado}} \gg F_{\text{crítico}}$, $p < 0,05$) entre as médias determinadas para as amostras (Tabela 1).

Foram obtidos baixos valores de desvio para a determinação de carboidratos em triplicata para as 19 amostras de ricota (Tabela 1). Em média, observou-se um desvio de 3%, o que demonstra uma pequena variação nesta determinação através da metodologia padrão.

Em comparação com os teores de carboidratos apresentados no rótulo, 8 amostras de ricota indicavam a ausência de carboidratos em 30 g de produto, enquanto que os resultados encontrados demonstraram que todas as amostras de ricota apresentam este constituinte em sua composição, em quantidades acima das indicadas como “não significativas” (carboidratos menor ou igual a 0,5 g) pela RCD nº 360 (BRASIL, 2003).

5.1.3 Teor de cinzas

O teor de cinzas das amostras avaliadas variou de 0,68 a 2,64 (% m/m), com um coeficiente de variação de 43,5%, demonstrando heterogeneidade das amostras para este parâmetro. Visualizando a Tabela 1, pode-se concluir que houve diferença significativa ($F_{\text{calculado}} \gg F_{\text{crítico}}$, $p < 0,05$) entre as médias das amostras para o teor de cinzas.

O desvio padrão das triplicatas das 19 amostras de ricota (Tabela 1) apresentou uma variação média de 2,5% para a determinação de cinzas, demonstrando também uma boa precisão da metodologia padrão.

Segundo CECCHI (2003), o conteúdo de cinzas totais nos produtos lácteos varia de 0,7% a 6,0%. O teor de cinza das amostras de ricotas avaliadas por ESPER; BONETS; KUAYE (2007) variaram de 0,41 a 5,24 %.

Isso demonstra que as amostras analisadas neste estudo estão em concordância com resultados encontrados na literatura.

5.1.4 Teor de cloretos

O teor de cloretos variou de 0,120 a 0,362 (%m/m), com coeficiente de variação de 30,8%, evidenciando novamente a heterogeneidade das amostras com relação ao parâmetro analisado.

Os valores de desvio (Tabela 1) para a determinação de cloretos mostraram na maioria dos casos, valores superiores a 10%. Isso é decorrente dos pequenos valores absolutos de cloretos encontrados nas amostras, o que faz com que pequenas variações entre as triplicatas gerem valores altos de desvio.

Os teores de sal nas amostras de ricota avaliadas por ESPER; BONETS; KUAYE (2007) se situaram na faixa de 0,14 a 1,27 %, enquanto que a literatura internacional relata valores entre 0,2% até a ausência de sal neste tipo de queijo (FOX *et al.*, 2000; KOSIKOWSKI; MISTRY, 1999 *apud* ESPER; BONETS; KUAYE, 2007). Os resultados obtidos evidenciam que as ricotas brasileiras apresentam um teor de sal maior que a de outros países.

A partir da visualização da Tabela 1, pode-se observar que para este parâmetro também houve diferença significativa ($F_{\text{calculado}} \gg F_{\text{crítico}}$, $p < 0,05$) entre as médias das 19 amostras analisadas.

5.1.5 Extrato seco e umidade

Os teores de extrato seco e umidade variaram de 18,65 a 39,90 (%m/m) e 60,09 a 81,35 (% m/m), com coeficientes de variação de 16,5% e 7,0%, respectivamente, demonstrando uma maior homogeneidade das amostras com relação a estes parâmetros. De qualquer forma, os teores encontrados nas 19 amostras de ricota apresentaram diferença significativa ($F_{\text{calculado}} \gg F_{\text{crítico}}$, $p < 0,05$) para a comparação das médias entre as amostras (Tabela 1).

Os desvios entre as triplicatas das 19 amostras (Tabela 1) demonstraram maior variação para a determinação de extrato seco (cerca de 2%) quando comparadas às médias para a determinação de umidade (cerca de 1%). Esta menor variação para a determinação de umidade é devido à alta umidade das amostras.

A partir destes dados, e segundo a Portaria nº 146/96 do MAARA (BRASIL, 1996), todas as amostras de ricota analisadas receberiam a classificação de queijo de “muita alta umidade” por apresentar teor de umidade acima de 55%.

Estes resultados não diferem muito daqueles apresentados por SOUZA *et al.* (2000) que ao avaliarem 30 amostras de ricota, de cinco marcas diferentes, comercializadas na cidade de Belo Horizonte (MG), mostraram que 93,34% das amostras se enquadrariam na classificação de queijo de muita alta umidade e apenas 3,33% como queijo de “média umidade” e 3,33% de “alta umidade”.

A alta variabilidade nos teores de extrato seco e umidade também foi relatada por ESPER; BONETS; KUAYE (2007) que analisaram a qualidade microbiológica e parâmetros físico-químicos de amostras de ricotas comercializadas no município de Campinas (SP). Os teores de extrato seco e umidade variaram entre 22,55 a 41,51%; e 58,49 a 77,45%, respectivamente.

MEDEIROS (2000) analisou a composição centesimal de três diferentes ricotas (ricota consistente, pastosa condimentada com cebola e pastosa condimentada com orégano) produzidas com leite de cabra, encontrando teores de extrato seco e umidade que variaram de 27,65 a 34,24% e de 65,75 a 73,34%, respectivamente. Em comparação com os resultados obtidos neste trabalho, as variações das concentrações desses dois componentes não foram elevadas.

5.1.6 Teor de gordura

Os teores de gordura nas amostras de ricota avaliadas, variaram de 1,84 a 19,92 (% m/m), com coeficiente de variação de 48,0%, demonstrando grande heterogeneidade nas amostras. A Tabela 1 mostra que houve diferença significativa ($F_{\text{calculado}} \gg F_{\text{crítico}}$, $p < 0,05$) entre as médias das 19 amostras. Tal fato já era esperado, uma vez que durante a obtenção das amostras foram selecionadas ricotas prensadas, tanto na versão tradicional quanto *light*.

Os teores de gordura de 3 (amostra 1, 14 e 19) das 4 amostras consideradas *light* (1, 11, 14 e 19), mostraram-se próximos ou mesmo acima dos teores de amostras consideradas tradicionais. A falta de padrões de identidade faz com que, uma amostra que foi rotulada pelo fabricante como *light* tenha mais gordura que uma amostra tradicional de outro fabricante.

Com relação ao desvio padrão para as replicatas das 19 amostras (Tabela 1), a determinação de gordura apresentou um desvio médio de 2,7%. Essa pequena variação nos desvios demonstra a boa precisão para a determinação de gordura através do método de Gerber.

Considerando o conteúdo de matéria gorda no extrato seco (GES), calculado a partir da seguinte relação $\text{GES} = \% \text{ de gordura} \times 100 / \% \text{ de extrato seco total}$ (AOAC, 1995), e segundo a classificação para queijos em geral estabelecida pela Portaria nº 146 do MAARA (BRASIL, 1996), 5,26% das amostras analisadas podem ser classificadas como queijo desnatado, 10,53% como queijo magro, 57,89% como queijo semi-gordo e 26,32% como queijo gordo.

Estes resultados corroboram com estudo feito por ESPER; BONETS; KUAYE (2007) que analisaram amostras de ricotas comercializadas no município de Campinas (SP). Os teores de gordura nas amostras de ricotas avaliadas variaram entre 5,50 a 26,67%.

A variabilidade do teor de gordura em ricotas também foi verificada por SOUZA *et al.* (2000) que do total de 30 amostras, classificaram 16,7% das ricotas como “queijo magro”, 23,3% como “queijo semi-gordo” e 60,0% como “queijo gordo”.

Esta grande variação dos dados pode ser atribuída, principalmente, à porcentagem de leite adicionado ao soro, procedimento utilizado pelas indústrias com a finalidade de melhorar o rendimento, o sabor e a textura da ricota. Além disso, a ausência de uma padronização no teor de gordura do leite (utilizado na produção e

adicionado como coadjuvante de tecnologia/aumentar rendimento) deve ser a principal responsável pelo alto valor de coeficiente de variação encontrado para este parâmetro nas amostras analisadas.

A variação elevada na composição das amostras de ricota comercializadas é preocupante, pois este produto normalmente é associado a produtos de baixo teor de gordura, sendo mais utilizado por pessoas com restrição alimentar (dietas hipocalóricas, doenças cardiovasculares, colesterol e triglicérides elevados) (ESPER; BONETS; KUAYE, 2007).

5.1.7 Teor de proteína

Um dos principais componentes da ricota são as proteínas cujos resultados revelaram uma grande variação (8,69 - 17,97% m/m), com coeficiente de variação de 23,4%. O teor de proteínas também apresentou diferença significativa ($F_{\text{calculado}} \gg F_{\text{crítico}}$, $p < 0,05$) na comparação das médias das 19 amostras de ricota.

O baixo valor de desvio padrão (2,4%) para a análise de triplicatas de todas as amostras (Tabela 1) demonstra que apesar do método padrão ser laborioso, o mesmo apresenta boa precisão.

Estes resultados corroboram com estudo feito por ESPER; BONETS; KUAYE (2007) em amostras de ricotas comercializadas no município de Campinas (SP). Com relação aos teores de proteína encontrados houve grande variação (8,84 a 16,35%).

SULTANEH; ROHM (2007) avaliaram o conteúdo de sólidos totais e proteínas em 242 amostras de requeijão, obtendo para proteínas variações entre 66,8 a 201,5 g/kg, com maior incidência de amostras com cerca de 85 g/kg de proteína (cerca de 20%).

5.2 Espectroscopia no infravermelho por reflectância difusa

Para a construção dos modelos de regressão foram utilizados os valores médios dos parâmetros físico-químicos analisados (matriz Y), além dos 38 espectros das amostras de ricota, sendo que 33 espectros foram utilizados na etapa de calibração (matriz X) e os 5 espectros restantes foram usados na validação externa dos modelos. O desenvolvimento dos modelos multivariados foi feito com o auxílio

da metodologia de Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLSR), sendo que um procedimento de seleção de variáveis baseada em dados de correlação também foi testado. Vale a pena ressaltar que esta seleção de variáveis não contribuiu significativamente para a melhora da capacidade de previsão dos modelos, e por este motivo os detalhes destes modelos não serão apresentados. A Figura 5 mostra o espectro original das amostras de ricota sem tratamentos matemáticos.

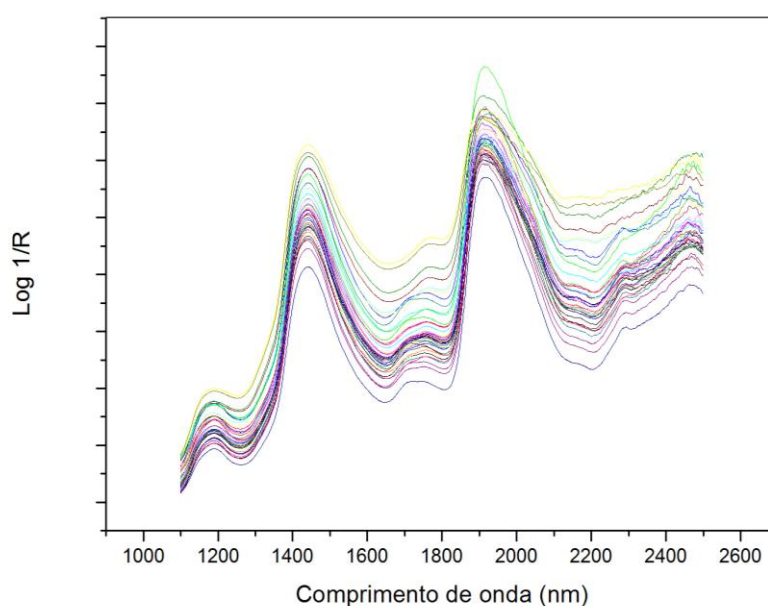


FIGURA 5 – Espectro no infravermelho próximo (NIR) das amostras de ricota sem tratamento prévio

Como é possível observar na Figura 5, os espectros no infravermelho evidenciam que as amostras de ricota apresentam uma mistura complexa de componentes. Com isso, existem em seus espectros informações de diversos grupos funcionais, cujos sinais analíticos apresentam-se sobrepostos. Isto dificulta a atribuição de uma determinada banda a uma única função química exclusivamente.

Em função dos aspectos levantados, procurou-se obter os modelos otimizados para cada determinação e, em seguida, verificar se os números de onda considerados como relevantes para a construção dos modelos estão relacionados às atribuições de absorção de radiação das ligações químicas e grupos funcionais dos respectivos componentes estudados (gordura, proteína e umidade). O Quadro 2 apresenta as ligações químicas e grupos funcionais para gordura, proteína e umidade, juntamente com dados do infravermelho próximo, que podem estar envolvidos na determinação destes componentes em ricota.

QUADRO 2 – Regiões espectrais no NIR relacionadas às absorções de umidade, gordura e proteína

Compostos	Atribuições	Regiões no NIR (nm)	Referências
Umidade	-	1940	HUANG <i>et al.</i> , 2008
	O-H e H	1938 a 2005	BÜNING-PFAUE, 2003
	Bandas de O-H	1400 a 1900	CEN; HE, 2007
	Absorção de água	1650	BURNS; CIURCZAK, 2007
	-	1850 a 1900	CEN; HE, 2007
	Referência de água	2139	BURNS; CIURCZAK, 2007
Gordura	-	2230, 2310	BURNS; CIURCZAK, 2007; HUANG <i>et al.</i> , 2008
	-	1759	BURNS; CIURCZAK, 2007
	Ácidos graxos	1900	CEN; HE, 2007
	C-H	1400 a 1430	CEN; HE, 2007; OSBORNE, 2000
Proteína	-	2180	HUANG <i>et al.</i> , 2008
	-	1650	BURNS; CIURCZAK, 2007
	Sobretons de CH ₂	1700	VESELÁ <i>et al.</i> , 2007
	NH ₂ típico de	2200	CEN; HE, 2007
	proteína		

5.2.1 Análise exploratória de dados

Na literatura atual a PCA têm recebido atenção por sua capacidade de classificação e também detecção de componentes majoritários em alimentos, como proteína, gordura, umidade, entre outros. Além de sua capacidade de discriminação sob condições similares, ela conta muitas vezes com uma análise instrumental rápida e de baixo custo.

A eficiência da PCA na análise de parâmetros físico-químicos em alimentos deve-se principalmente a possibilidade de associá-la a técnicas espectroscópicas (como a de NIRRS), as quais possuem características que possibilitam a classificação e detecção destes parâmetros.

Neste trabalho, a Análise por Componentes Principais foi empregada com o intuito de evidenciar tendências espectroscópicas das amostras em relação aos teores de acidez total titulável, extrato seco, gordura, pH, proteína e umidade. Esta análise foi realizada pelo processamento dos dados de reflectância da faixa espectral compreendida entre 1100 a 2500 nm (Figura 5), utilizando o programa Pirouette for Windows 3.11, empregando-se correção do espalhamento multiplicativo (MSC) e dados centrados na média (DCM) aos dados espectrais.

A partir da análise de scores da PC1 vs. PC2 (Figura 6) foi possível observar que as amostras com maiores concentrações de gordura (amostras 9, 10, 33, 34, 35

e 36) apresentaram valores negativos de *scores* na PC1 enquanto as amostras com os menores teores de gordura (amostras 11, 12, 21, 22, 31 e 32) apresentaram valores positivos de *scores* nesta componente principal. Já em relação aos teores de proteína, observa-se uma relação praticamente inversa, ou seja, para as amostras com maiores concentrações de proteína (21, 22, 25, 26, 37 e 38) valores positivos de *scores* na PC1 foram obtidos, enquanto que para amostras com as menores concentrações de proteína (17, 18, 23, 24, 33 e 34) apresentaram valores negativos de *scores* na PC1.

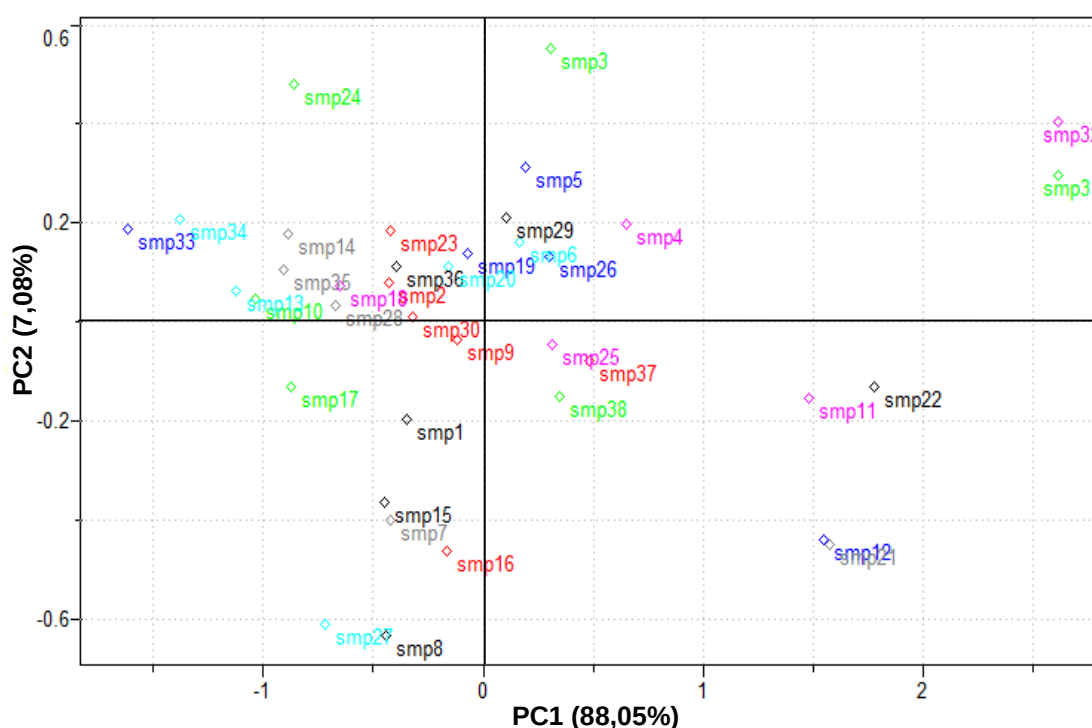


FIGURA 6 – Gráfico de *scores* da PC1 vs PC2

Para evidenciar as regiões espectrais do NIR, responsáveis por mostrar as diferentes tendências das amostras com altos e baixos teores de proteínas e gordura utilizou-se o gráfico de *loadings* (Figura 7), que mostra os comprimentos de onda de maior peso para as tendências observadas anteriormente.

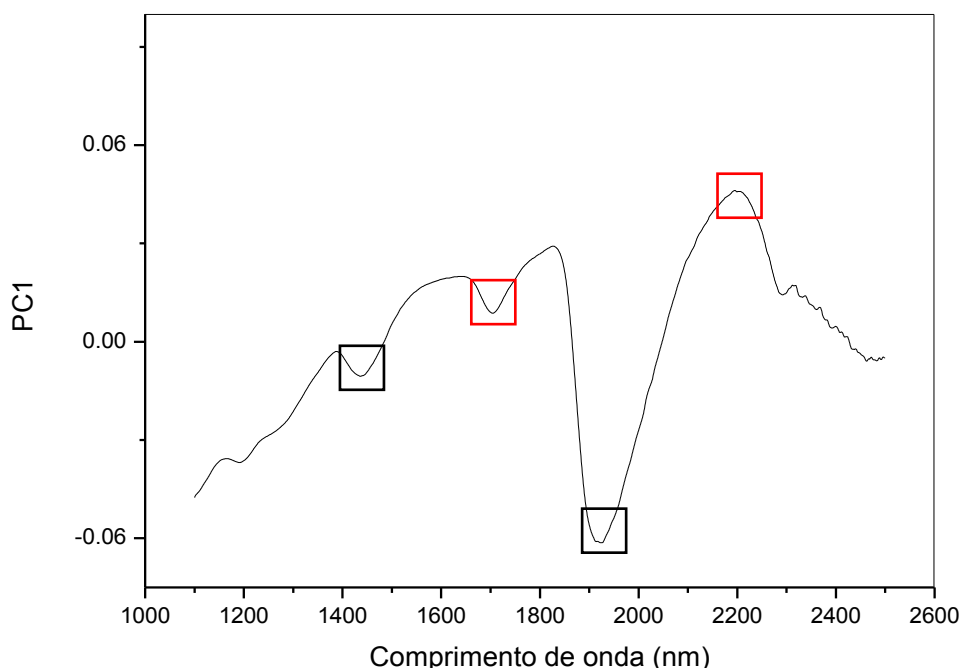


FIGURA 7 – Gráfico de *loadings* para a PC1

A análise do gráfico de *scores* juntamente com o gráfico de *loadings* indicou que as amostras com maiores teores de gordura são influenciadas por regiões do espectro com *loadings* negativos. Ou seja, onde encontram-se os sinais com comprimentos de onda de 1435 nm e entre 1919 e 1923 nm, em destaque na Figura 7 (preto). Os comprimentos de onda entre 1400 a 1430 nm são responsáveis por combinações de C-H (CEN; HE, 2007; OSBORNE, 2000). Já em comprimentos de onda de 1900 nm encontram-se as bandas de absorção de ácidos graxos (CEN; HE, 2007).

Para os teores de proteína, uma análise inversa foi realizada já que as amostras com maiores teores de proteínas são influenciadas por regiões do espectro com *loadings* positivos. Assim, podem-se destacar os sinais em comprimentos de onda de 1700 e 2200 nm, em destaque na Figura 7 (vermelho). Segundo VESELÁ *et al.* (2007), comprimentos de onda em 1700 nm representam o 1º sobreton de CH₂ típico de proteínas. Já em comprimentos de onda de 2200 nm estão as combinações de NH₂ (CEN; HE, 2007).

Na Figura 8 (*scores* da PC1 vs. PC3) foi possível observar que as amostras com maior acidez (7, 8, 23 e 24) estão localizadas em valores positivos de *scores* na PC3, enquanto as amostras com menor acidez (1, 2, 37, 38) apresentam *scores*

negativos na PC3. Com relação ao pH, em valores positivos de *scores* na PC3 encontram-se as amostras com menores valores de pH (5, 6, 13 e 14 que não são as mesmas amostras da maior acidez, em função dos aspectos já discutidos anteriormente) e em valores negativos de *scores* na PC3 estão às amostras com maiores valores de pH (1, 2, 37 e 38).

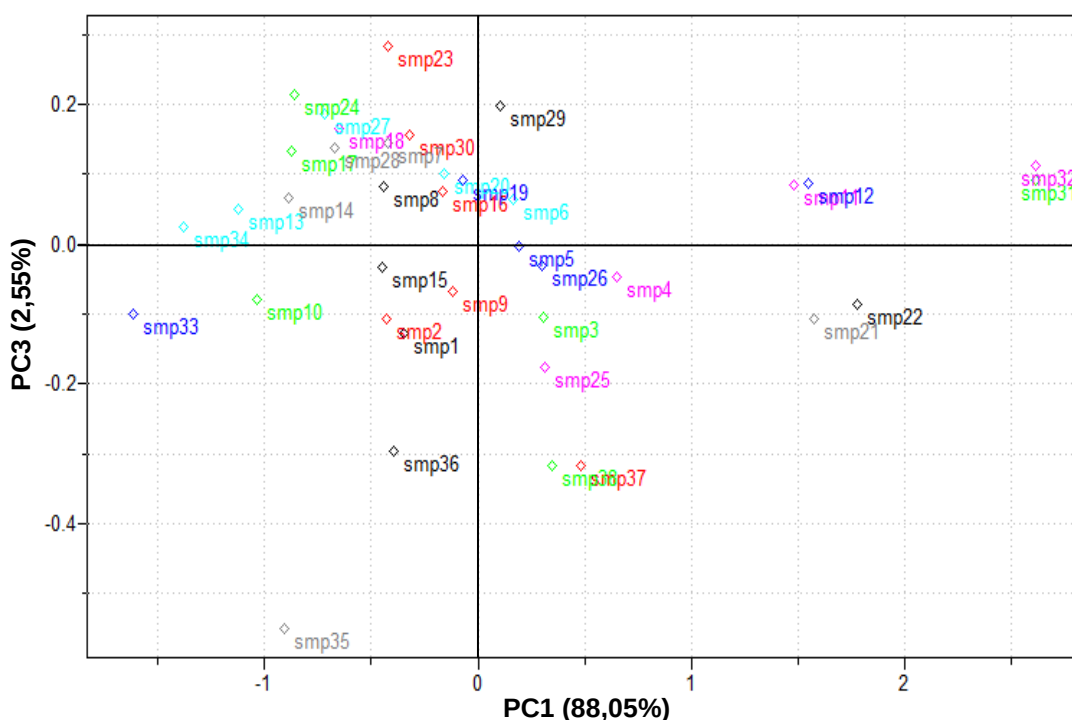


FIGURA 8 – Gráfico de *scores* da PC1 vs PC3

Analisando o gráfico de *loadings* juntamente com o gráfico de *scores* foi possível observar que as regiões do espectro com valores positivos de *loadings* para a PC3 (em destaque – preto na Figura 9) foram os responsáveis pela tendência de separação das amostras de ricota com os maiores de teores de acidez. Ou seja, principalmente os sinais entre 1320 a 1615 nm e 1850 nm, o que condiz com as observações de CEN e HE (2007), que atribuem os comprimentos de onda em 1400 nm e entre 1800 e 1900 nm como os responsáveis pela absorção de ácidos em alimentos.

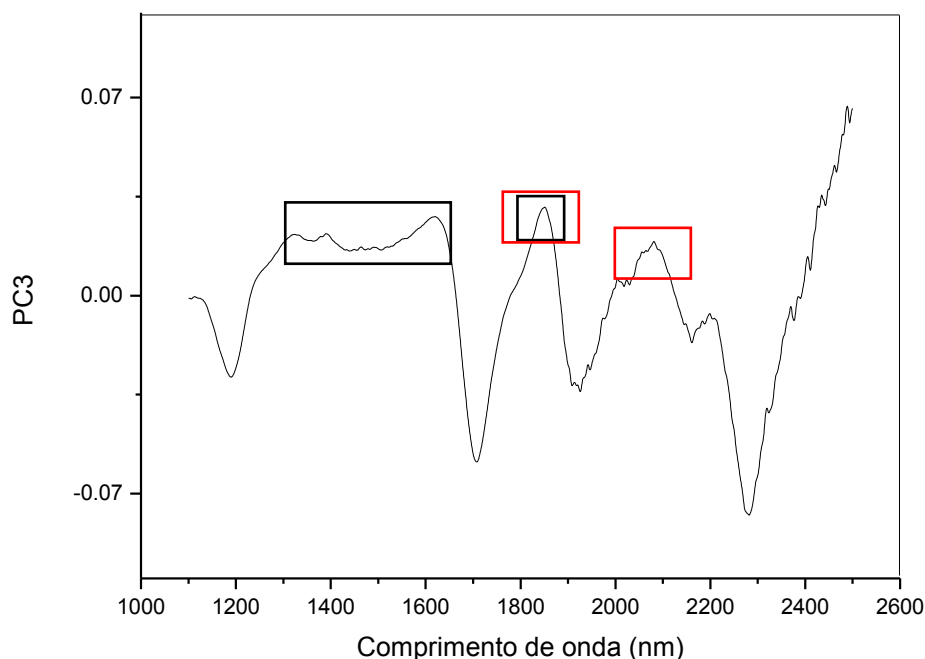


FIGURA 9 – Gráfico de *loadings* para a PC3

Com relação aos teores de extrato seco e umidade, uma nova análise de *scores* da PC1 vs. PC3 (Figura 8) foi realizada. Observou-se que em valores positivos de *scores* para a PC3 encontram-se as amostras com menores concentrações de extrato seco (11 e 12), e em valores negativos de *scores* para a PC3 localizam-se as amostras com maiores concentrações de extrato seco (35, 36, 37 e 38). Uma relação totalmente inversa pode ser obtida para os teores de umidade, já que a determinação deste parâmetro físico-químico é obtida por diferença do teor de extrato seco. A partir desta análise de *scores* foi possível analisar o gráfico de *loadings* da PC3 (Figura 9) e verificar que as regiões espectrais que tiveram um maior peso para a tendência observada foram os sinais de absorção com valores positivos de *loadings* na PC3 (em destaque – vermelho).

Nesses valores positivos, podem-se destacar os sinais em 1850 nm e entre 2000 a 2080 nm. Segundo BÜNING-PFAUE (2003) ligações entre 1938 a 2005 nm são atribuídas às ligações do tipo O-H e ligações de H e entre 1850 e 1900 nm encontram-se as bandas atribuídas à água (CEN; HE, 2007).

A PCA também foi utilizada com o intuito de obter um conjunto de validação externa representativo, a partir dos dados de espectroscopia no infravermelho próximo. Empregando-se correção do espalhamento multiplicativo (MSC) e dados

centrados na média (DCM) aos dados espectrais, a análise dos *scores* das duas primeiras componentes principais (Figura 10) possibilitou observar a distribuição das amostras em um sistema bidimensional responsável por explicar grande parte da variância dos dados (95,1%).

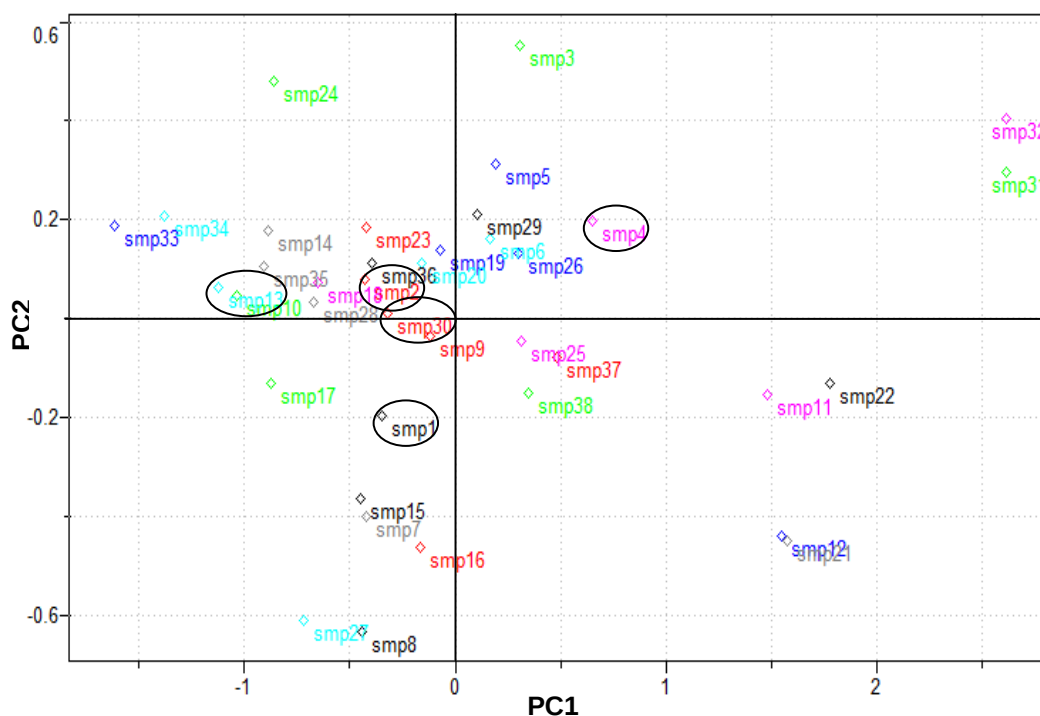


FIGURA 10 – Resultado da Análise por Componentes Principais com correção do espalhamento multiplicativo (MSC) e dados centrados na média (DCM)

Os representantes em destaque na Figura 10 são as amostras que foram selecionadas para compor o conjunto de validação externa. Esta seleção foi baseada em termos proporcionais ao número de representantes em cada quadrante. Ou seja, quanto maior o número de amostras no quadrante, maior o número de representantes selecionados para o conjunto de validação externa. Evitou-se a inclusão das amostras mais isoladas que podem configurar amostras anômalas do conjunto de dados. Esta seleção assegura a obtenção de conjuntos homogêneos e representativos tanto na etapa de calibração, quanto de validação.

As smp31 e smp32 (correspondente a amostra 16) ficaram bastante deslocadas do conjunto amostral devido às suas características físico-químicas diferenciadas, ou seja, baixo teor de gordura e elevado teor de carboidratos quando comparadas às outras amostras. Em princípio elas não foram consideradas

amostras anômalas para não limitar a faixa de concentração de aplicação dos modelos.

5.2.2 Modelos de calibração

A metodologia de calibração multivariada foi conduzida essencialmente via processo de Regressão de Mínimos Quadrados Parciais (PLSR1) que possibilita otimizar um modelo para cada determinação de interesse. A aplicação desta forma operacional envolve alguns problemas de caráter prático, principalmente relacionados com a necessidade de investir mais tempo para a elaboração do modelo. Por outro lado, os modelos obtidos por esta metodologia tendem a apresentar uma melhor capacidade de previsão.

Na tentativa de minimizar os efeitos causados pela dificuldade de obtenção de um espectro ideal, ou seja, espectros sem variações aleatórias ou variações sistemáticas indesejáveis de diferentes origens, foram empregados procedimentos de transformação e/ou pré-processamento dos dados espectrais antes da construção dos modelos, para que estas variações não tivessem influência nos resultados finais.

5.2.2.1 Modelos de calibração multivariada para as previsões dos teores de gordura, proteína e umidade

Para a construção dos modelos de gordura, proteína e umidade, utilizou-se a faixa espectral completa do NIR compreendida entre 1100 e 2500 nm. Vários tipos de transformações/pré-processamentos foram testados, dentre eles: Correção do Efeito de Espalhamento Multiplicativo (MSC), Dados Centrado na Média (DCM), autoescalamamento e normalização.

Para a escolha do melhor modelo foram analisados os valores dos menores erros de previsão (RMSEC e RMSECV) em função do menor número de Variáveis Latentes obtidas pelo método de validação cruzada. Além disso, foram avaliados os coeficientes de correlação dos conjuntos de calibração (R_{cal}) e validação externa (R_{val}). A Tabela 2 mostra um resumo dos resultados obtidos pelos modelos multivariados.

Ao avaliar a capacidade de previsão dos teores de gordura, proteína e umidade, observou-se que os melhores modelos estão associados ao uso de 6 Variáveis Latentes para gordura e proteína e 4 Variáveis Latentes para o modelo de umidade. Para gordura foi obtido um RMSECV de 1,9% (m/m), aplicando-se Correção do Efeito de Espalhamento Multiplicativo (MSC) como transformação de dados; para proteína um RMSECV de 1,4% (m/m) foi obtido aplicando Correção do Efeito de Espalhamento Multiplicativo (MSC) e Dados Centrados na Média (DCM) e finalmente, para umidade foi obtido um RMSECV de 3,3% (m/m), aplicando normalização como transformação de dados.

Vale a pena ressaltar, que o MSC foi utilizado na construção dos modelos de gordura e proteína, já que esse tipo de tratamento matemático corrige os efeitos diferenciados de espalhamento de luz produzidos pela diferente reflexão das superfícies analisadas.

TABELA 2 – Modelos de calibração para a determinação de gordura, proteína e umidade

Parâmetro analisado	Transformação/Pré-processamento	*Nº VLS	RMSEC/RMSECV (% m/m)	**Rcal/Rval
Gordura	DCM	7	1,2/2,0	0,973/0,928
	MSC	4	1,7/2,1	0,949/0,923
	MSC	5	1,4/2,0	0,963/0,929
	MSC	6	1,3/1,9	0,968/0,936
	Normalização	7	1,2/1,9	0,971/0,937
	MSC/DCM	4	1,4/1,3	0,963/0,929
	MSC/DCM	5	1,3/0,8	0,968/0,936
	Autoescalamento	7	1,2/2,0	0,973/0,931
	MSC/DCM	6	0,7/1,4	0,968/0,885
Proteína	MSC/DCM	7	0,6/1,4	0,978/0,876
	MSC/DCM	8	0,4/1,3	0,992/0,903
	DCM	15	0,04/0,6	1,000/0,915
	MSC	9	0,4/0,4	0,992/0,903
	Autoescalamento	10	0,3/0,5	0,992/0,898
	Normalização	8	0,7/0,7	0,970/0,888
	Normalização	4	2,7/3,3	0,851/0,757
Umidade	Normalização	5	2,5/3,6	0,866/0,744
	DCM	7	1,8/3,4	0,934/0,772
	DCM	8	1,6/3,3	0,948/0,780
	MSC/DCM	7	1,4/3,1	0,961/0,800
	MSC/DCM	8	1,0/3,0	0,982/0,825
	Autoescalamento	9	1,2/3,2	0,972/0,800
	Autoescalamento	10	0,7/3,1	0,990/0,817

* Número de Variáveis Latentes

** Coeficientes de correlação do conjunto de calibração (Rcal) e validação externa (Rval)

A Figura 11 apresenta a evolução dos valores de RMSEC e RMSECV em função do número de Variáveis Latentes para a construção de cada um dos modelos.

A partir dos dados da Figura 11 é possível observar que os modelos obtidos não apresentaram nenhum ganho significativo em termos de minimização dos valores de RMSECV com mais de 6 variáveis latentes para gordura e proteína e 4 variáveis latentes para umidade. A escolha de um pequeno número de VLs pode excluir do modelo informações analíticas relevantes, enquanto um grande número de VLs pode gerar modelos superestimados e ocasionar o comprometimento da previsão dos teores dos parâmetros de interesse em amostras que não participaram do conjunto de calibração, devido à agregação de ruídos ao modelo.

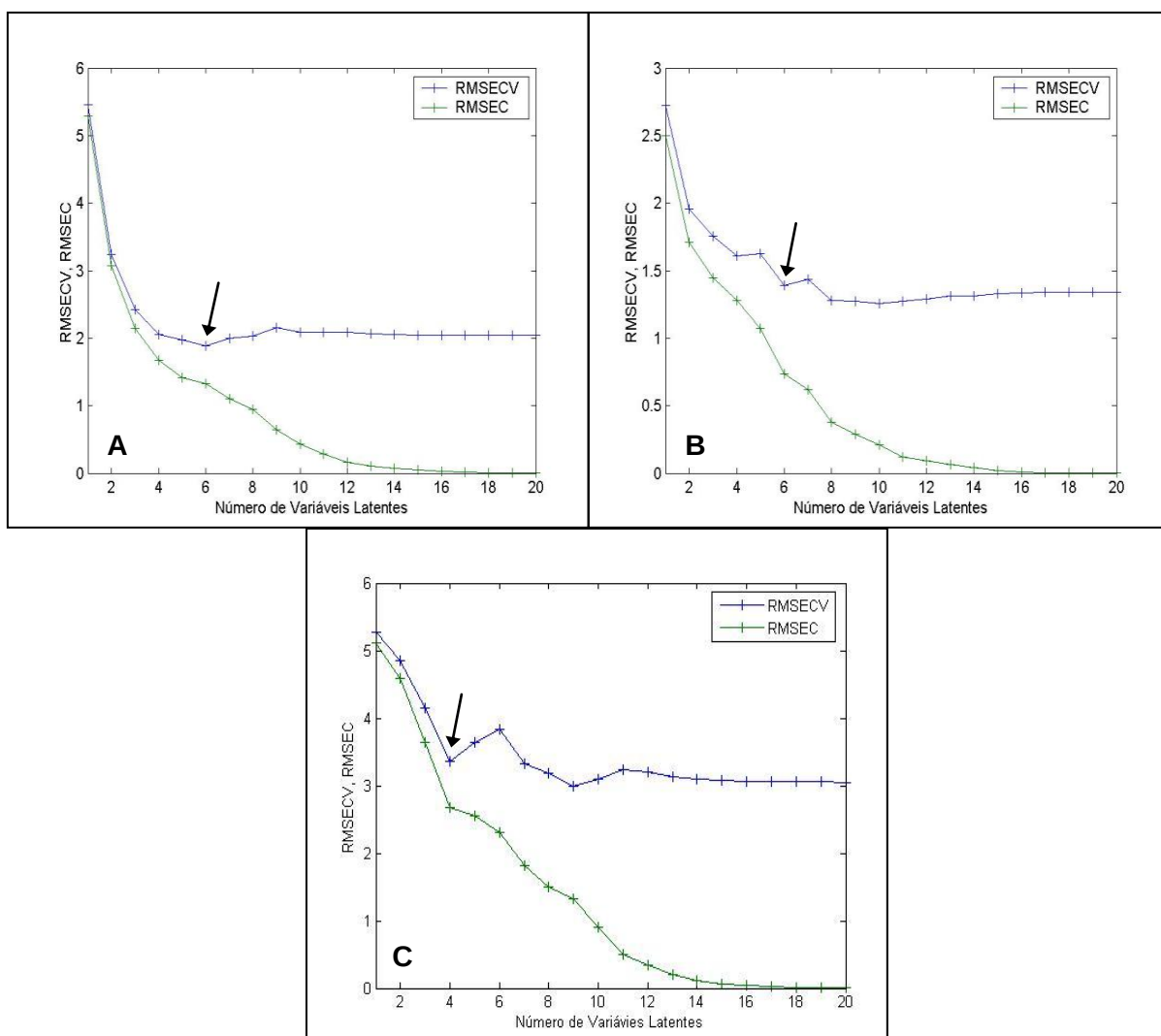


FIGURA 11 – Gráficos de RMSEC e RMSECV vs Número de Variáveis Latentes obtidos durante a construção dos modelos de (A) gordura, (B) proteína e (C) umidade

As seis variáveis latentes dos modelos para determinação de gordura e proteína são responsáveis por explicar 100% da variabilidade espectral e 98,72% da variabilidade da concentração de gordura; e 99,27% da variabilidade espectral e 93,75% da variabilidade da concentração de proteína. Já as quatro variáveis latentes do modelo de umidade são responsáveis por explicar 100% da variabilidade espectral e 99,86% da variabilidade da concentração de umidade.

Os modelos obtidos não apresentaram comportamento tendencioso em superestimar ou subestimar os teores de gordura, proteína e umidade, o que pode ser comprovado pela distribuição aleatória das amostras do conjunto de calibração em relação ao resíduo (Figura 12).

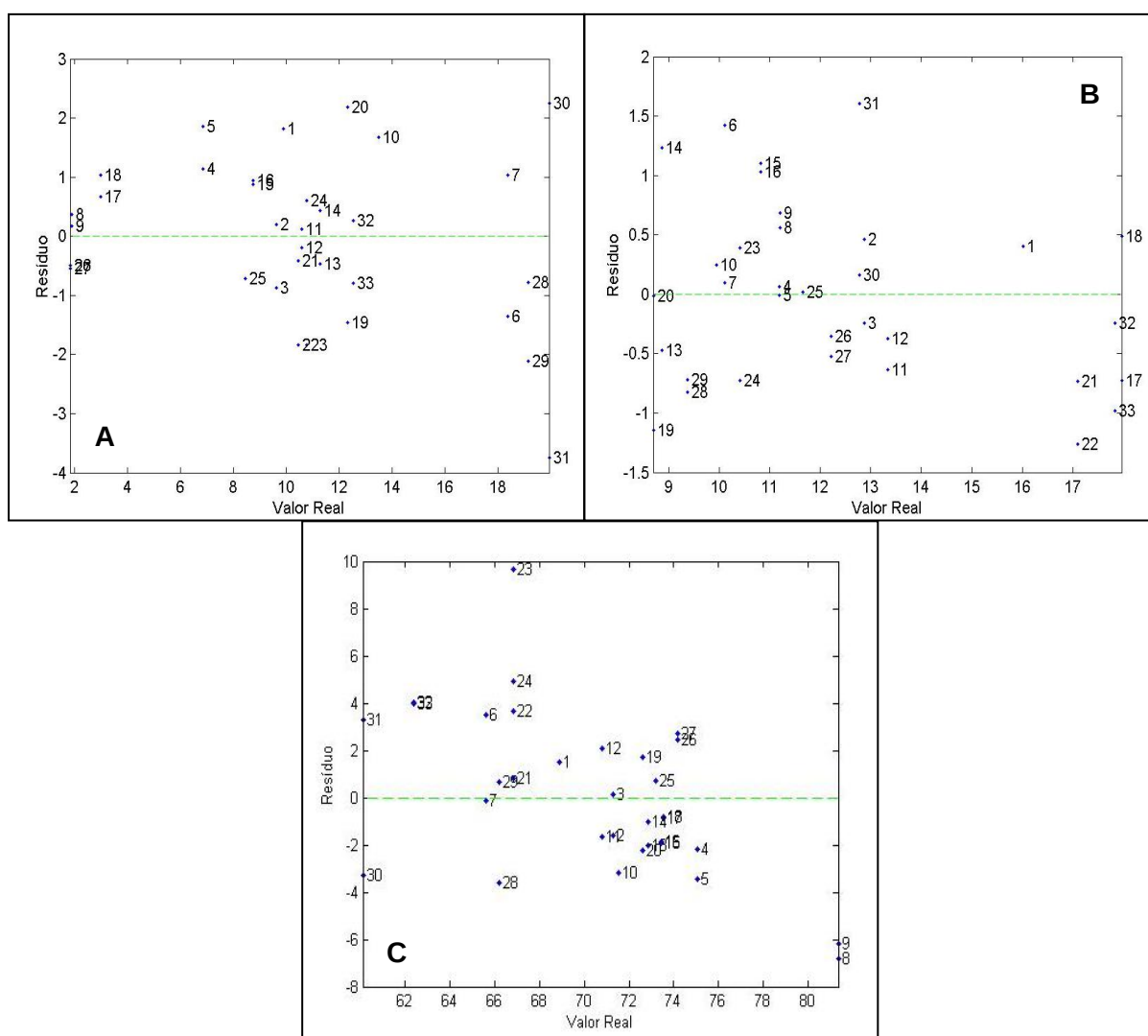


FIGURA 12 – Gráfico de Resíduos vs Valor Experimental obtidos pelo modelo de calibração para (A) gordura, (B) proteína e (C) umidade

Outro importante aspecto da otimização do modelo está relacionado à Figura 13, na qual foi possível observar que não há indícios de amostras anômalas no limite da *leverage* de 0,55 e considerando um resíduo de Student de $\pm 2,5$ (95% de confiança) para os modelos de gordura e proteína.

No modelo de umidade, a amostra 30 (em destaque) apresentou um valor de *leverage* maior que o recomendado (0,36). Para efeitos de comparação, é possível observar que a duplicata desta amostra (amostra 31) apresenta valores de *leverage* dentro do limite aceitável.

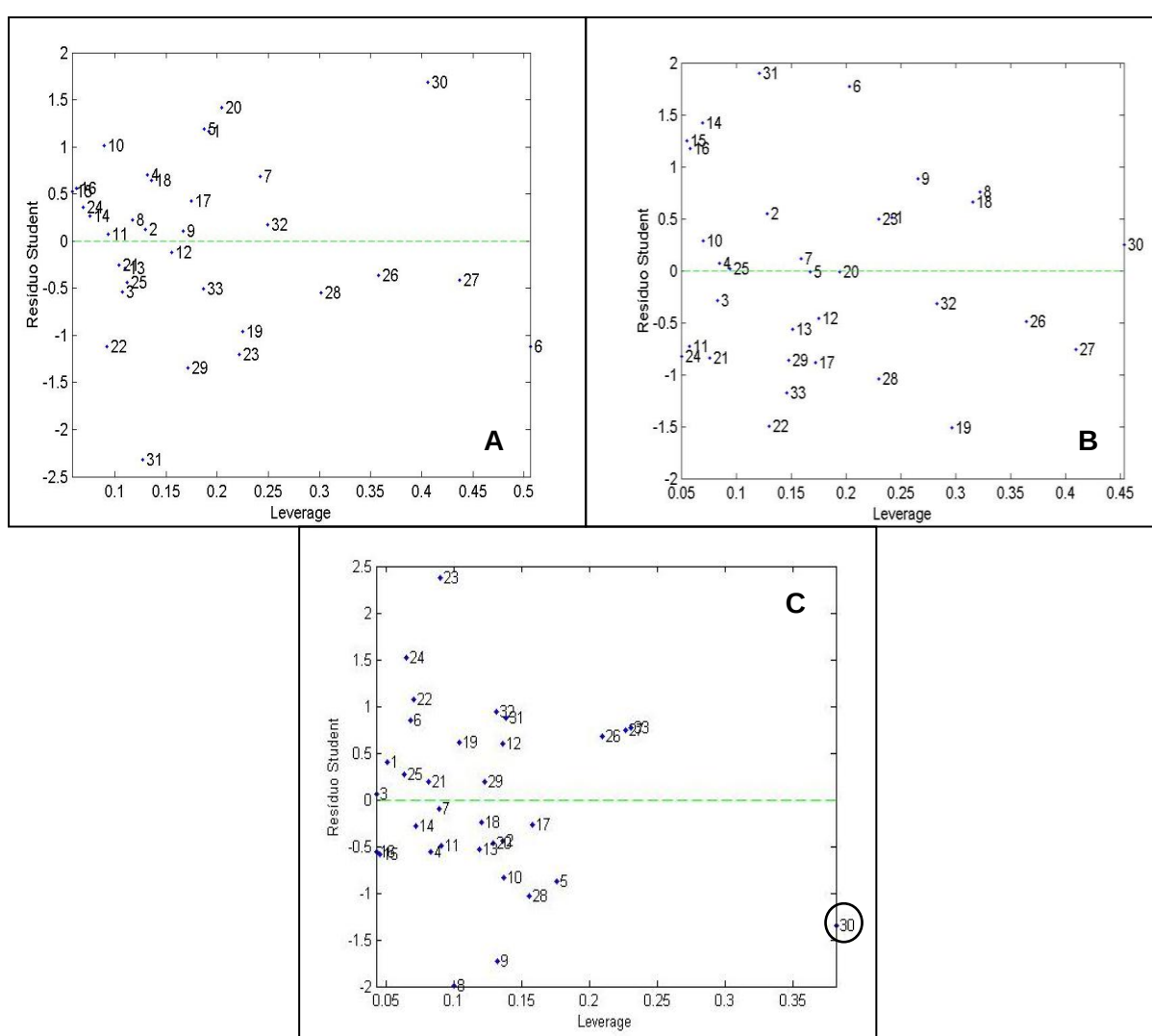


FIGURA 13 – Resíduo de Student vs Leverage obtido pelos modelos de (A) gordura, (B) proteína e (C) umidade

Tal característica pode ser um indício de que o espectro da amostra 30 pode ter sido obtido em uma superfície não tão plana se comparado com o espectro de

sua duplicata. Como esta amostra não apresentou alto resíduo, foi testada sua retirada do conjunto de calibração, o que não alterou significativamente as características do modelo (número de Variáveis Latentes e valores de RMSEC, RMSECV e Erro Padrão Relativo). Por esse motivo, não há justificativas suficientes para classificar a amostra 30 como anômala.

Os modelos obtidos com as características apresentadas anteriormente apresentaram boa correlação (Figura 14) entre os valores determinados pelo método de referência e àqueles previstos pelos modelos multivariados construídos. Os coeficientes de correlação obtidos, para os conjuntos de calibração (Rcal) e validação (Rval), foram respectivamente, 0,968 e 0,936 para gordura, 0,968 e 0,885 para proteína e 0,851 e 0,757 para umidade.

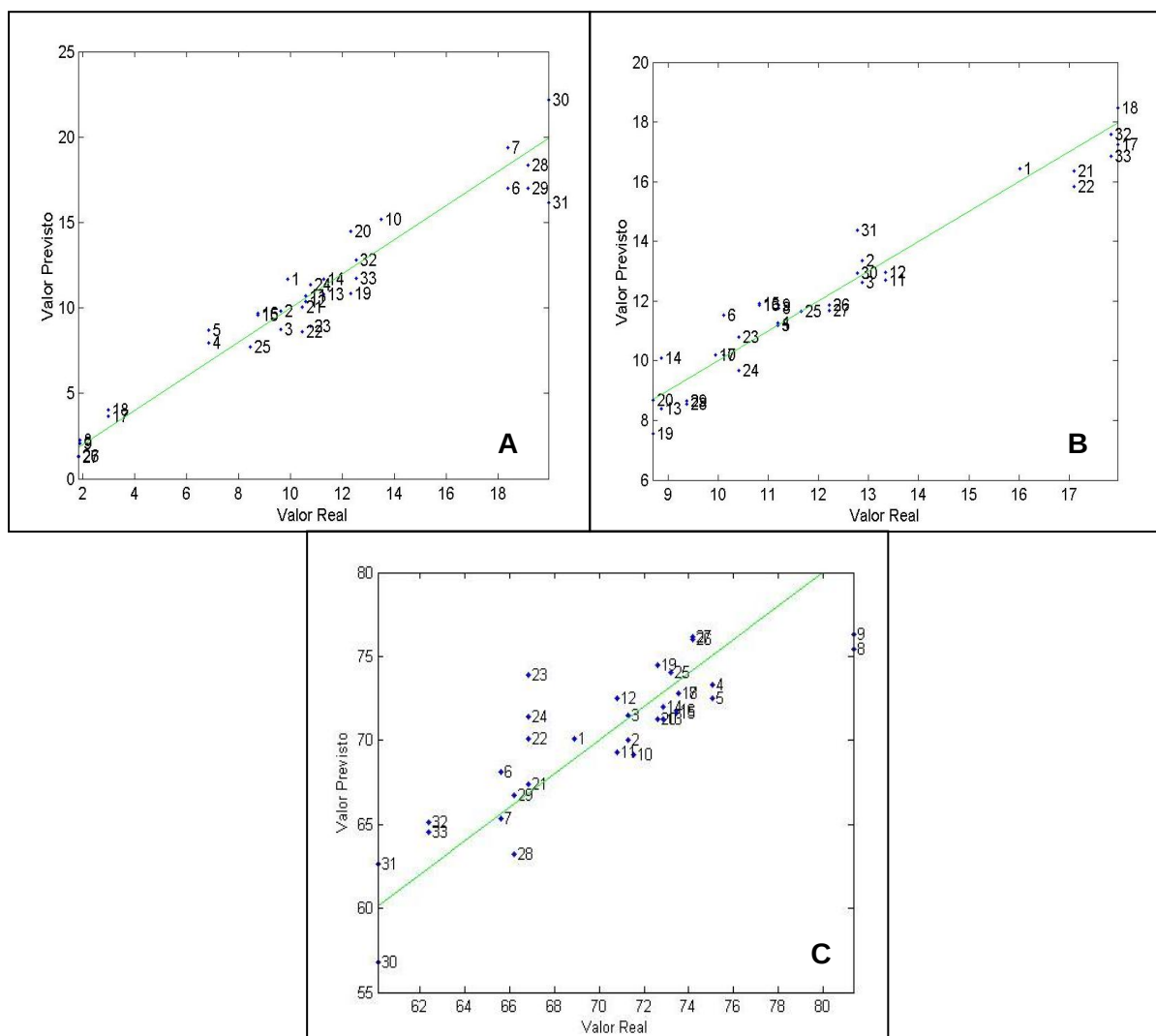


FIGURA 14 – Valores Previstos pela Calibração vs Valores Reais obtidos pelos modelos de (A) gordura, (B) proteína e (C) umidade

Através destes dados foi possível evidenciar uma menor capacidade de previsão para a determinação de umidade, principalmente para a amostra de maior concentração deste parâmetro (amostras 8 e 9).

Na Figura 15, o gráfico dos coeficientes de regressão evidencia as principais regiões do espectro que apresentam informações analíticas relevantes para a determinação de gordura. Essas regiões incluem os seguintes comprimentos de onda: 1) 1190 nm (referente a ligações de CH, CH₂ e CH₃), 2) 1400 nm (referente à absorção de ácidos) e 3) 1710 nm (também referente a ligações CH, CH₂ e CH₃) (sinais em destaque na Figura 15).

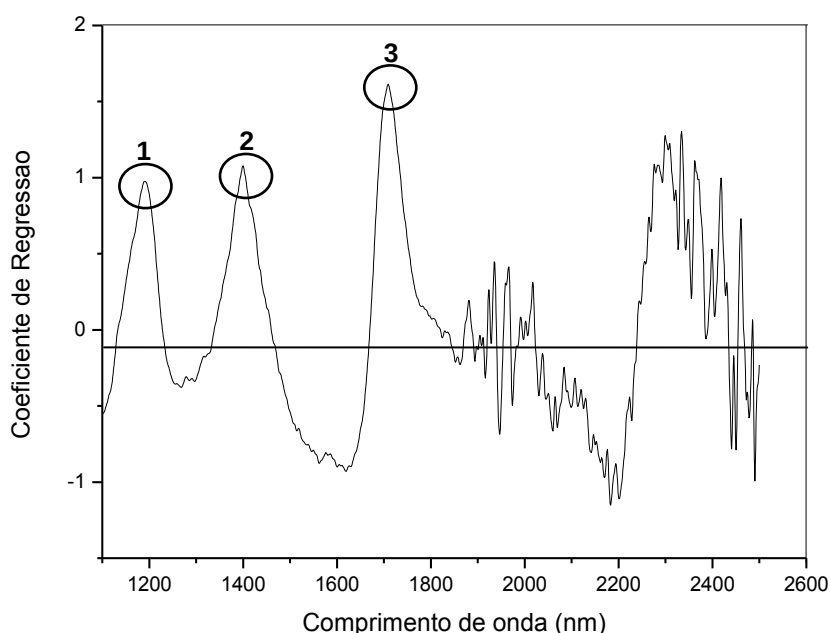


FIGURA 15 – Gráfico dos coeficientes de regressão para o modelo de gordura

A Figura 16, por sua vez, ilustra os coeficientes de regressão com as principais regiões do espectro que possuem informações analíticas relevantes para a determinação quantitativa de proteína. As regiões em questão incluem comprimentos de onda em: 1) 2160 nm (referente à absorção de NH₂ de proteínas), 2) 2264 nm (referentes à N-H de aminas) e 3) 2465 nm (ligações de CH) (sinais em destaque na Figura 16).

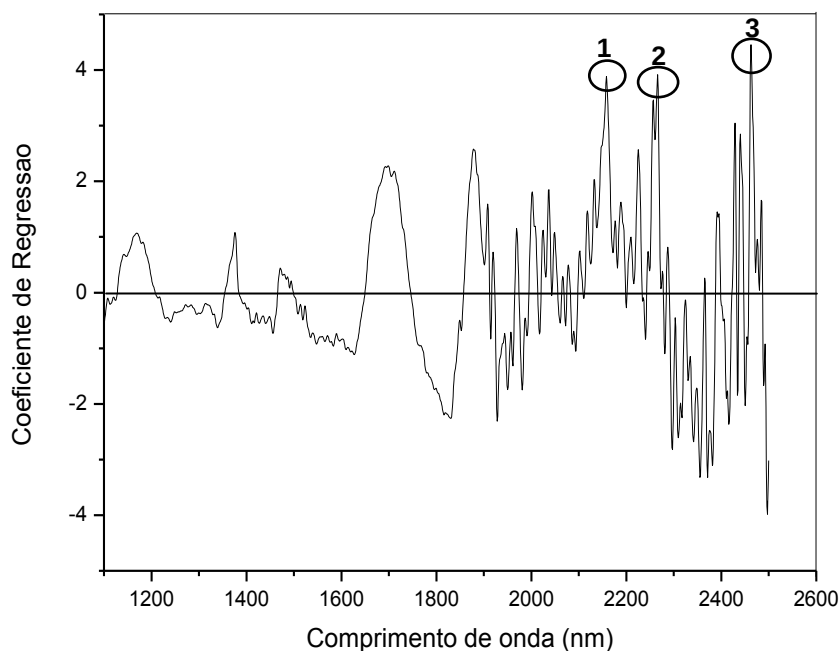


FIGURA 16 – Gráfico dos coeficientes de regressão para o modelo de proteína

Na Figura 17 o gráfico dos coeficientes de regressão evidenciam as principais regiões do espectro que apresentam informações analíticas relevantes para a determinação de umidade. Essas regiões de relevante informação incluem os seguintes comprimentos de onda: 1) 1200 nm (referente a ligações O-H), 2) 1710 nm (atribuídas à ligações O-H e grupos CH ligados à anel aromático), 3) 1920 nm (referente a ligações O-H) e 4) 2280 nm (ligações de CH₃, CH₂ e CH) (sinais em destaque na Figura 17).

De maneira geral, as principais regiões espectrais consideradas para a construção de todos os modelos de calibração, estão intimamente relacionadas com os grupos funcionais que caracterizam cada um dos parâmetros de interesse.

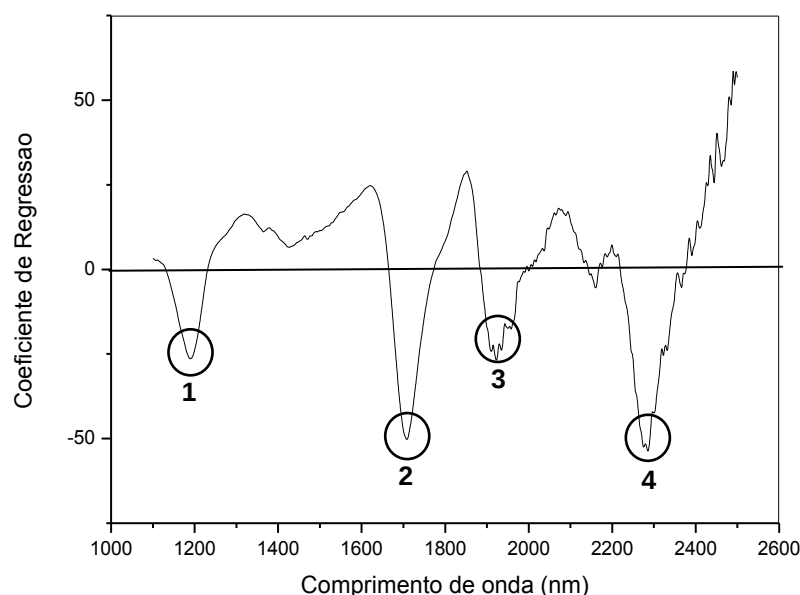


FIGURA 17 – Gráfico dos coeficientes de regressão para o modelo de umidade

Os valores previstos para as concentrações de gordura, proteína e umidade das amostras do conjunto de validação externa estão apresentados na Tabela 3. Vale a pena ressaltar que as amostras 1 e 2 são na realidade a mesma amostra de ricota com espectros obtidos de duas partes diferentes da superfície analisada, gerando indícios da reprodutibilidade da metodologia proposta.

TABELA 3 – Resultados da previsão das concentrações de gordura, proteína e umidade para os conjuntos de validação externa

Amostras	Valor Real (% m/m)			Valor Previsto (% m/m)			Erro Relativo (%)		
	Gordura	Proteína	Umidade	Gordura	Proteína	Umidade	Gordura	Proteína	Umidade
1	13,05	12,77	67,69	12,76	13,46	66,94	-2,20	5,45	-1,12
2	13,05	12,77	67,69	14,15	13,12	67,03	8,46	2,73	-0,99
3	9,89	16,02	68,88	8,83	15,14	67,48	-10,67	-5,47	-2,03
4	13,49	9,94	71,54	14,67	9,71	68,20	8,77	-2,36	-4,67
5	8,44	11,65	73,21	8,29	10,05	72,68	-1,77	-13,72	-0,74
Erro relativo médio (%)							6,37	5,95	1,91

A partir da visualização das médias de erro padrão relativo, percebe-se que os erros médios, para gordura, proteína e umidade foram de 6,37, 5,95 e 1,91%, respectivamente. Estes resultados além de demonstrarem o potencial do modelo multivariado na determinação dos teores destes parâmetros em amostras com matrizes complexas (ricota) evidenciam as vantagens da associação NIRRS-PLSR

que permite um controle de qualidade rápido com uma manipulação mínima da amostra.

Estes valores de erro relativo médio (E_r) são muito bons se comparados com os valores de desvio padrão médio das metodologias utilizadas para a determinação de gordura (2,7%), proteína (2,4%) e umidade (0,8%). Como o processo de modelagem não corrige a precisão das metodologias-padrão, esses valores estão embutidos nos valores de erros obtidos. Este fato pode ser corroborado pela tendência observada entre os valores de erros ($E_r(\text{gordura}) > E_r(\text{proteína}) > E_r(\text{umidade})$) e os desvios padrão médio das metodologias (2,7% > 2,4% > 0,8%).

Esses resultados de capacidade de previsão dos modelos construídos corroboram com o estudo feito por SULTANEH; ROHM (2007), que avaliaram os teores de proteína e sólidos totais por NIR, em amostras de requeijão homogeneizado e não homogeneizado, obtendo resultados satisfatórios com coeficientes de regressão (R^2) acima de 0,98 e boa capacidade de previsão desses teores em amostras reais. No entanto, o número de Variáveis Latentes encontradas pelos autores foi superior ao encontrado neste estudo, sendo que para proteína os autores obtiveram modelos com 10 Variáveis Latentes.

KAROUÏ *et al.* (2006), determinaram gordura, NaCl, pH, nitrogênio não protéico e nitrogênio total em amostras de queijo *Emmental*, obtendo melhores resultados, para gordura e nitrogênio total, utilizando o infravermelho próximo. Novamente, os modelos com melhor capacidade de previsão foram construídos com um número de variáveis latentes maior que os obtidos neste trabalho (gordura com 10 VLs e R^2 de 0,94, e proteína com 7 VLs e R^2 de 0,86).

Os resultados encontrados neste estudo foram similares aos encontrados por BLAZQUEZ *et al.* (2004), que avaliaram os teores de umidade e gordura em queijos fundidos no infravermelho próximo, obtendo coeficientes de correlação (R^2) de 0,98 para gordura, obtido com 5 Variáveis Latentes e para umidade R^2 de 0,99 com 4 Variáveis Latentes.

Os resultados obtidos neste estudo também foram similares aos encontrados por SAUER-LEAL; OKADA; PERALTA-ZAMORA (2008), que avaliaram os teores de gordura, proteína, umidade, sólidos totais e cinzas em amostras de queijo prato, utilizando NIR. Os resultados demonstraram que os erros médios encontrados foram menores que 2,6%, com valores de RMSEP abaixo de 0,7 e modelos construídos com 4 VLs.

Para efeitos de comparação entre as duas metodologias, aplicou-se o Teste t pareado a fim de evidenciar diferenças significativas entre ambas, para cada um dos parâmetros de interesse a um nível de confiança de 95%.

Para os três parâmetros analisados o $t_{\text{calculado}}$ foi menor que o t_{tabelado} ($v = 4$, $t = 2.776$) indicando não haver diferença significativa entre os teores obtidos via metodologia padrão e metodologia espectroscópica multivariada. Os valores de $t_{\text{calculado}}$ foram: 0,419 para gordura; 2,215 para proteína e 0,555 para umidade.

5.2.2.2 Modelos de calibração multivariada para as previsões dos teores de acidez, carboidratos, cinzas, cloreto e pH

Foram construídos modelos para acidez, carboidratos, cinzas, cloreto e pH utilizando-se também a faixa espectral completa do NIR compreendida entre 1100 e 2500 nm. Vários tipos de transformações/pré-processamentos foram testados, dentre eles: Correção do Efeito de Espalhamento Multiplicativo (MSC), Dados Centrado na Média (DCM), autoescalamento e normalização, 1ª Derivada.

A escolha do melhor modelo foi baseada nos valores dos menores erros de previsão (RMSEC e RMSECV) em função do menor número de Variáveis Latentes obtidas pelo método de validação cruzada. Também avaliaram-se os coeficientes de correlação dos conjuntos de calibração (R_{cal}) e validação externa (R_{val}). A Tabela 4 mostra um resumo dos resultados obtidos para os modelos multivariados. No entanto, foi possível constatar a partir dos dados da Tabela 4 que para todos os parâmetros não foi possível obter bons modelos, com valores de R_{cal} e R_{val} baixos. Isto demonstra a baixa capacidade de previsão mesmo para as amostras que compõem o conjunto de calibração através da metodologia proposta. Como existem trabalhos que relatam a determinação de pH, NaCl e sais inorgânicos por métodos espectroscópicos associados à calibração multivariada em matrizes similares a estudada neste trabalho, possivelmente melhores resultados poderiam ser obtidos utilizando-se uma faixa espectral mais ampla.

Esperava-se que fosse possível construir modelos para a determinação de carboidratos, porém, a partir dos dados apresentados na Tabela 4 é possível observar os baixos valores de R_{cal} e R_{val} . Dois fatores podem explicar esta ocorrência são: a) o fato de que a metodologia padrão para a determinação deste constituinte não determinar somente carboidratos, mas sim todos os compostos que

reduzam íons cobre (presentes no reagente utilizado para tal determinação); b) as baixas concentrações de carboidratos presentes nas amostras analisadas, o que poderia ser insuficiente para atingir o limite de quantificação instrumental.

SAUER-LEAL; OKADA; PERALTA-ZAMORA (2008) conseguiram avaliar o pH de queijos prato tanto utilizando a região do infravermelho próximo quanto médio, porém o melhor modelo de calibração foi obtido na região do infravermelho médio, elaborado com 6 variáveis latentes, com erro médio de 1,4% e um RMSEP de 0,11.

Em resultados encontrados por KAROUI *et al.* (2006), os melhores modelos para pH e NaCl foi utilizando as regiões do infravermelho próximo e médio em conjunto, os quais apresentaram melhores resultados (R^2 maior) que os modelos desenvolvidos somente no NIR.

BLAZQUEZ *et al.* (2004), avaliaram o conteúdo de sais inorgânicos em queijos fundidos, obtendo resultados na ordem de 2,0-4,7% (m/m) com a metodologia padrão. O melhor modelo para a previsão dos resultados utilizando o NIR (faixa espectral compreendida entre 1100 e 2500 nm) apresentou com RMSECV de 0,26 e R^2 de 0,90, utilizando 7 Variáveis Latentes.

TABELA 4 – Modelos de calibração para a determinação de acidez, carboidratos, cinzas, cloreto e pH

Parâmetro analisado	Transformação/Pré-processamento	*Nº VLs	RMSEC/RMSE CV (% m/m)	**Rcal/Rval
Acidez	DCM	4	0,01/0,02	0,629/0,361
	Autoescalamento	4	0,01/0,02	0,611/0,323
	MSC/1ª Derivada	2	0,02/0,02	0,378/0,008
	MSC/1ª Derivada	3	0,01/0,02	0,731/0,161
	Normalização	6	0,01/0,02	0,699/0,431
Carboidratos	Autoescalamento	4	0,4/0,5	0,588/0,197
	DCM	4	0,4/0,5	0,587/0,215
	MSC/1ª Derivada	2	0,4/0,5	0,437/0,257
	MSC/1ª Derivada	3	0,3/0,5	0,722/0,356
	Normalização	4	0,4/0,5	0,582/0,269
Cinzas	DCM	4	0,4/0,5	0,733/0,612
	DCM	5	0,4/0,5	0,774/0,597
	Autoescalamento	3	0,4/0,5	0,710/0,617
	Autoescalamento	4	0,4/0,5	0,726/0,612
	DCM/1ª Derivada	3	0,3/0,7	0,862/0,197
	MSC/1ª Derivada	4	0,2/0,6	0,919/0,342
Cloreto	DCM	2	0,06/0,07	0,504/0,369
	DCM	3	0,06/0,07	0,544/0,357
	Autoescalamento	2	0,06/0,07	0,507/0,361
	Autoescalamento	3	0,06/0,07	0,530/0,352
	Normalização	4	0,06/0,07	0,605/0,418
	Normalização	5	0,06/0,07	0,628/0,394
pH	DCM/1ª Derivada	2	0,05/0,07	0,647/0,247
	DCM	4	0,2/0,3	0,526/0,198
	MSC	4	0,3/0,3	0,508/0,303
	DCM/1ª Derivada	2	0,2/0,3	0,610/0,208
	DCM/1ª Derivada	8	0,02/0,5	0,997/0,033
	MSC/DCM/1ª Derivada	2	0,2/0,3	0,679/0,134

6 CONCLUSÕES

Os resultados das análises físico-químicas evidenciaram a falta de uniformidade das diferentes marcas de ricota, observando-se a grande variabilidade em todos os parâmetros analisados. Foram obtidas as seguintes variações: entre 0,0125 e 0,0679% para acidez, 1,49 e 3,49% para carboidratos, 0,68 e 2,64% para cinzas, 0,120 e 0,362% para cloretos, 18,65 e 39,90% para extrato seco, 1,84 e 19,92% para gordura, 4,94 e 6,18 para pH, 8,69 e 17,97% para proteína e entre 60,09% e 81,35% para umidade.

Em relação à análise de variância, para todos os parâmetros houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as 19 amostras de ricota analisadas.

Segundo a classificação para queijos, 5,26% das amostras analisadas são classificadas como queijo desnatado, 10,53% como queijo magro, 57,89% como queijo semi-gordo e 26,32% como queijo gordo. Com relação aos teores de umidade, todas as amostras podem ser classificadas como queijo de muito alta umidade, com umidade superior a 55,0% como preconiza a legislação. Esta grande variação dos dados pode ser atribuída, principalmente, à porcentagem de leite adicionado ao soro, além da ausência de padronização no teor de gordura do leite (utilizado na produção e adicionado como coadjuvante de tecnologia/aumentar rendimento).

Os espectros NIR das amostras foram obtidos a partir da análise de duas partes diferentes da ricota, gerando 38 espectros que foram avaliados pela PCA para montagem dos conjuntos de calibração e validação. Nesta etapa, foram selecionados 5 espectros para compor o conjunto de validação externa. Durante a otimização dos modelos de calibração multivariada, foram selecionados o tipo de transformação/pré-processamento dos dados espectrais, número de variáveis latentes e detecção de amostras anômalas, para minimização dos erros médios de previsão do conjunto de validação interna.

Em função desta seleção, os erros médios de previsão obtidos foram inferiores a 6,4% (6,37% para gordura, 5,95% para proteína e 1,91% para umidade) para o conjunto de validação externa, com um número de Variáveis Latentes inferior (6 variáveis para gordura e proteína e 4 variáveis para umidade) ao encontrado na literatura (para matrizes alimentícias similares), demonstrando que os modelos construídos foram robustos e com boa capacidade de previsão.

Na comparação entre os resultados obtidos pela metodologia padrão e aqueles obtidos pela metodologia proposta (Teste t pareado) verificou-se que não houve diferença significativa, a um nível de confiança de 95%, entre as metodologias para os três parâmetros analisados.

As regiões mais relevantes do espectro para a determinação de gordura foram em 1190, 1400 e 1710 nm; já para proteína essas regiões compreenderam comprimentos de onda em 2160, 2264 e 2465 nm; com relação à umidade as regiões relevantes foram em 1200, 1710, 1920 e 2280 nm.

Estes resultados além de demonstrarem o potencial dos modelos multivariados na determinação dos teores de gordura, proteína e umidade em amostras com matrizes complexas (ricota) evidenciam as vantagens da associação NIRRS-PLSR que permite um controle de qualidade rápido com uma manipulação mínima da amostra.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

Em virtude das observações a respeito do estudo realizado sobre o desenvolvimento de modelos de calibração multivariada, baseados em análises de espectroscopia no infravermelho, seguem-se algumas sugestões para trabalhos futuros:

- Compreensão de uma faixa espectral maior, abrangendo tanto o infravermelho próximo quanto o infravermelho médio, na tentativa de obtenção de modelos com boa capacidade de previsão para os parâmetros não modelados neste trabalho;
- Utilização de um maior número de amostras para formar um conjunto de calibração mais consistente e que ofereça menores erros de previsão na determinação de acidez, carboidratos, cinzas, cloreto e pH.
- Aplicação da metodologia espectroscópica multivariada para avaliar mudanças nos parâmetros modelados durante a vida de prateleira de amostras de ricota.

REFERÊNCIAS

ASOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INDÚSTRIAS DE QUEIJOS (ABIQ). **Food service impulsiona setor de queijos.** http://www.abiq.com.br/imprensa/abiqnamidia_detalhes.asp?id=125. Acessado em: 01 de julho de 2009.

ALBUQUERQUE, L. C. **Queijos no mundo.** Origem e tecnologia. Vol.1, Juiz de Fora, 2002.

ALMEIDA, K. E.; BONASSI, I. A.; ROÇA, R. O. Características físicas e químicas de bebidas lácteas fermentadas e preparadas com soro de queijo Minas frescal. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, p. 187-192, 2001.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official methods of analysis of AOAC international.** 16 ed. Washington, 1995.

BELTRÁN, J. F. N.; NETO, A.C.; PIRES, E. M. F.; STAMFORD, T. L. M. Avaliação microbiológica de refeições servidas por empresas aéreas nacionais. **Revista Higiene Alimentar**, v. 13, p. 49-56, 1999.

BLAZQUEZ, C.; DOWNEY, G.; O'DONNELL, C.; O'CALLAGHAN, D.; HOWARD, V. Prediction of moisture, fat and inorganic salts in processed cheese by near infrared reflectance spectroscopy and multivariate data analysis. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, v. 12, p. 149-157, 2004.

BRASIL. Portaria nº 146, de 07 de março de 1996. Aprova regulamentos técnicos de identidade e qualidade dos produtos lácteos. **Ministério da Agricultura, Abastecimento e Reforma Agrária.** Brasília, 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária. Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento MAPA**, 1997.

BRASIL. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. **Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária.** Brasília, 2001.

BRASIL. Resolução nº 360, de 23 de dezembro de 2003. Aprova o regulamento técnico sobre rotulagem nutricional de alimentos embalados. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2003.

BURNS, A. D.; CIURCZAK, E. W. **Handbook of near-infrared analysis.** 30 ed. New York, 2007.

BÜNING-PFAUE, H. Analysis of water in food by near infrared spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 82, p. 107-115, 2003.

CARVALHO, J. D. G. **Avaliação da qualidade de queijos tipo minas frescal elaborados por diferentes processos tecnológicos e comercializados em**

Campinas. Dissertação (Mestrado Tecnologia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

CEN, H.; HE, Y. Theory and application of near infrared reflectance spectroscopy in determination of food quality. **Trends in Food Science and Technology**, v.18, p. 72-83, 2007.

CECCHI, H. M. **Fundamentos teóricos e práticos em alimentos análise de alimentos**. 2ª ed.,Campinas: Editora da UNICAMP, 2003.

CHIAPPINI, C. C. J.; SANTOS, N. N. Determinação de alguns parâmetros físicos e químicos do soro do queijo. **Revista Instituto Laticínios Cândido Tostes**, v. 50, p. 3-7, 1995.

CORDEIRO, G. A. **Desenvolvimento de metodologias espectroscópicas multivariadas para quantificação de fármacos em formas farmacêuticas**. Dissertação (Mestrado em Química Analítica). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

COSEDU, A. M.; SANTIS, E. P. L.; MAZZETTE, R.; FRESI, A., LAI, G. Ricotta bovina fresca confezionata: caratteristiche microbiologiche di interesse igienicosanitario. **Latte**, v. 7, p. 76-81, 1997.

DA SILVA, M. C. D.; HOFER, E.; TIBANA, A. Incidence of *Listeria monocytogenes* in cheese produced in Rio de Janeiro, Brasil. **Journal of Food Protection**, v. 61, p. 354-356, 1998.

DAVIDSON, M. W.; PARRY-HILL, M. J.; SUTTER, R. T. 2005. **Reflection of Light**. <http://micro.magnet.fsu.edu/optics/lightandcolor/reflection.html>. Acessado em 06 de julho de 2009.

DAVIES, E. A.; BEVIS, H. E.; DELVESBROUGHTON, J. The use of the bacteriocin, nisin, as a preservative in ricotta-type cheeses to control the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 24, p. 343-346, 1997.

DEL NOBILE, M. A.; CONTE, A.; INCORONATO, A. L.; PANZA, O. Modified atmosphere packaging to improve the microbial stability of Ricotta. **African Journal of Microbiology Research**, v. 3, p. 137-142, 2009.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). **Destino do leite**. Mensagem recebida por lisserenato@hotmail.com em 06 de julho de 2009.

ESPER, L. M. R. **Diagnóstico da qualidade de ricotas no município de Campinas-SP**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

ESPER, L. M. R.; BONETS, P. A.; KUAYE, A. Y. Avaliação das características físico-químicas de ricotas comercializadas no município de Campinas-SP e da conformidade das informações nutricionais declaradas nos rótulos. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, p. 299-304, 2007.

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

FERRÃO, M. F. Técnicas de reflexão no infravermelho aplicadas na análise de alimentos. **Tecnológica**, v. 5, p. 65-85, 2001.

FERRÃO, M. F.; CARVALHO, C. W.; MÜLLER, E. I.; DAVANZO, C. U. Determinação simultânea dos teores de cinza e proteína em farinha de trigo empregando NIR-PLS e DRIFT-PLS. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, p. 333-340, 2004.

FERRARINI, H. **Determinação de teores nutricionais do milho por espectroscopia no infravermelho e calibração multivariada**. Dissertação (Mestrado em Química) Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

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

GONZÁLEZ-MARTÍN, I.; GONZÁLEZ-PÉREZ, C.; HERNÁNDEZ-HIERRO, J. M.; GONZÁLEZ-CABRERA, J. M. Use of NIRS technology with a remote reflectance fibre optic probe for predicting major components in cheese. **Talanta**, v. 75, p. 351-355, 2008.

HART, J. R.; NORRIS, K. H.; GOLUMBIC, C. Determination of the Moisture Content of Seeds by Near-Infrared Spectrophotometry of Their Methanol Extracts. **Cereal Chemistry**, v. 39, p. 94-99, 1962.

HERMIDA, M.; GONZALEZ, J. M.; SANCHEZ, M.; RODRIGUEZ, O.; JOSE, L., Moisture, solids-non-fat and fat analysis in butter by near infrared. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 93-98, 2001.

HINDIN, E. Determination of Lactose in Dairy Wastes. **Water Environment Federation**, 1953.

HOUGH, G.; PUGLIESO, M. L.; SANCHHEZ, R.; DA SILVA, M. O. Sensory and Microbiological Shelf-Life of a Commercial Ricotta Cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 454-459, 1999.

HOPKE, P. K. The evolution of chemometrics. **Analytica Chimica Acta**, v. 500, p. 365-377, 2003.

HUANG, H.; YU, H.; XU, H.; YING, Y. Near infrared spectroscopy for on/in-line monitoring of quality in foods and beverages: A review. **Journal of Food Engineering**, v. 87, p. 303-313, 2008.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION (IDF). **Determination of the total nitrogen content of milk by the Kjeldahl method**. Brussels, n. 20, p. 1-3, 1962.

KAROUI, R.; MAZEROLLES, G.; DUFOUR, É. Spectroscopic techniques coupled with chemometric tools for structure and texture determinations in dairy products. **International Dairy Journal**, v. 13, p. 607-620, 2003.

LONGHI, C.; MAFFEO, A.; PENTA, M.; PETRONE, G.; SEGANTI, L.; CONTE, M. P. Detection of *Listeria monocytogenes* in Italian-style soft cheeses. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, p. 879-885, 2003.

LUCAS, A.; ANDUEZA, D.; FERLAY, A.; MARTIN, B. Prediction of fatty acid composition of fresh and freeze-dried cheeses by visible–near-infrared reflectance spectroscopy. **International Dairy Journal**, v. 18, p. 595-604, 2008.

MCCAIG, T. N., Extending the use of visible/near-infrared reflectance spectrophotometers to measure colour of food and agricultural products. **Food Research International**, v. 35, p. 731-736, 2002.

MEDEIROS, R. S. **Processamento e avaliação físico-química, microbiológica e sensorial de ricota produzida a partir de leite de cabra**. Dissertação (Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2000.

MESSERSCHMIDT, I. **Análise quantitativa por espectroscopia no infravermelho médio empregando técnicas de reflectância e calibração multivariada**. Tese (Doutorado em Química) Instituto de Química. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999.

MIRALBÉS C., Quality control in the milling industry using near infrared transmittance spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 88, p. 621-628, 2004.

MODLER, H.W.; EMMONS, D.B. The use of continuous ricotta processing to reduce ingredient cost in further processes cheese products. **International Dairy Journal**, v. 11 p. 517-523, 2001.

MORESI, M. Cost/benefit analysis of yeast and yeast autolysate production from cheese whey. Italian **Journal of Food Science**, v. 6, p. 357-370, 1994.

MORGANO, M. A. **Aplicação de métodos quimiométricos em análise de alimentos**. Tese (Doutorado em Química) Instituto de Química. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

MORGANO, M. A.; FARIA, C. G.; FERRÃO, M. F.; BRAGAGNOLO, N.; FERREIRA, M. M. C. Determinação de proteína em café cru por espectroscopia NIR e regressão PLS. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, p. 25-31, 2005.

MORGANO, M. A.; FARIA, C. G.; FERRÃO, M. F.; FERREIRA, M. M. C. Determinação de açúcar total em café cru por espectroscopia no infravermelho próximo e regressão por mínimos quadrados parciais. **Química Nova**, v. 30, p. 346-350, 2007.

NAGATA, N. **Uso de métodos de calibração multivariada na análise de amostras de interesse industrial e espécies de importância ambiental por fluorescência de raios-X**. Tese (Doutorado em Química) Instituto de Química. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

NAGATA, N.; BUENO, M. I. M. S.; PERALTA-ZAMORA, P. Métodos matemáticos para a correção de interferências espectrais e efeitos interelementos na análise quantitativa por fluorescência de raios-X. **Química Nova**, v. 24, p. 531-539, 2001.

NICOLAÏ, B. T. M.; BEULLENS, K.; BOBELYN, E.; PEIRS, A.; SAEYS, W.; THERON, K. I.; LAMMERTYN, J. Nondestructive measurement of fruit and vegetable quality by means of NIR spectroscopy: A review. **Postharvest Biology and Technology**, v. 46, p. 99-118, 2007.

QUEJI, M. D. **Determinação de açúcares simples, ácido málico e compostos fenólicos totais em bagaço de maçã por espectroscopia no infravermelho e métodos de calibração multivariada**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2008.

PINTADO, M. E.; MACEDO, A. C.; MALCATA, F. X. Review: Technology, Chemistry and Microbiology of Whey Cheese. **Food Science Technology International**, v. 7, p. 105-116, 2001.

PHILIPPE, M.; GAUCHERON, F.; LE GRAËT, Y.; MICHEL, F.; & GAREM, A. Physicochemical characterization of calcium-supplemented skim milk. **Le Lait**, v. 83, p. 45-59, 2003.

RAIMUNDO, I. C. **Avaliação microbiológica de amostras de ricotas comercializadas no município de Alfenas**. 2004. 36p. Dissertação (Mestre em Ciências de Alimentos) Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.

REEVES, J. B.; MCCARTY, G. W.; REEVES, V. B. Mid-infrared Diffuse Reflectance Spectroscopy for the Quantitative Analysis of Agricultural Soils, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 766 -772, 2001.

RIBEIRO, A. C.; MARQUES, S. C.; SODRÉ, A. F.; ABREU, L. R.; PICCOLI, R. H. Controle microbiológico da vida de prateleira de ricota cremosa. **Revista Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, p. 113-117, 2005.

ROCHA, F. A. **Análise da gordura total e do perfil de ácidos em queijos mussarela, prato e ricota e comparação dos resultados experimentais com os teóricos**. Dissertação (Mestrado em Nutrição), Universidade de Brasília, Brasília, 2004.

SALAÜN, F.; MIETTON, B.; GAUCHERON, F. Buffering capacity of dairy products. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 95-109, 2005.

SANTOS, M. C. S. **Utilização na região do infravermelho (FTIR) e quimiometria na identificação do café torrado e moído adulterado**. Dissertação (Mestrado em Agronomia) Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

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

SCHUSTER, J. H. Semi-automated proximate analysis. **Cereal Foods**, v. 23, p. 180-182, 1978.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRIL, T. C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 5ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994.

SIMAS, R. C. **Determinação de proteína bruta e aminoácidos em farelo de soja por espectroscopia no infravermelho próximo**. Dissertação (Mestrado em Química) Instituto de Química. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

SINELI, N.; BARZAGHI, S.; GIARDINA, C.; CATTANEO, T. M. P. A preliminary study using Fourier transform near infrared spectroscopy to monitor the shelf-life of packed industrial ricotta cheese. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**. v. 13, p. 293-300, 2005.

SIQUEIRA, I. M. C.; SOUZA, M. R.; CERQUEIRA, M. M.; GLORIA, M. B. A. Importância e utilização dos derivados de soro de queijo. **Revista Higiene Alimentar**, v. 16, p. 31-35, 2002.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. 5ª ed., Porto Alegre: Bookman, 2002.

SOARES, A. M. B.; MURRAY, I.; PATERSON, R. M.; ABREU, J. M. F., Use of near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) for the prediction of the chemical composition and nutritional attributes of green crop cereals. **Animal Feed Science and Technology**, v. 75, p. 15-25, 1998.

SOUZA, M. R.; MORAIS, C. F. A.; CORRÊA, C. E. S.; RODRIGUES, R. Características Físico-Químicas em Belo Horizonte, MG. **Revista Higiene Alimentar**, v. 14, p. 68-71, 2000.

SULTANEH, A.; ROHM, H. Using near infrared spectroscopy for the determination of total solids and protein content in cheese curd. **International Journal of Dairy Technology**, v. 60, p. 241-244, 2007.

THOMAS, E. V. A primer on multivariate calibration. **Analytical Chemistry**, v. 66, p. 795-804, 1994.

TOZETTO, A. **Controle de qualidade de edulcorante em adoçantes comerciais via espectrometria e métodos de calibração multivariada**. Dissertação (Mestrado

em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ponta Grossa, 2005.

UDABAGE, P.; MCKINNON, I. R.; AUGUSTIN, M. A. Mineral and casein equilibria in milk: effects of added salts and calcium chelating agents. **Journal of Dairy Research**, v. 67, p. 361–370, 2000.

VALDERRAMA, P. **Avaliação de figuras de mérito em calibração multivariada na determinação de parâmetros de controle de qualidade em indústria alcooleira por espectroscopia no infravermelho próximo**. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

VESELÁ, A.; BARROS, A. S.; SYNITSYA, A.; DELGADILLO, I.; COPÍKOVÁ, J.; COIMBRA, M. A. Infrared spectroscopy and outer product analysis for quantification of fat, nitrogen, and moisture of cocoa powder. **Analytica Chimica Acta**, v. 60, p. 77-86, 2007.

VILLAMARÍN, B.; FERNÁNDEZ, E.; MENDEZ, J.; COEERN, S. C. L., Analysis of grass silage from Northwestern Spain by near-infrared reflectance spectroscopy. **Journal of AOAC International**, v. 85, p. 541-545, 2002.

XICCATO, G.; TROCINO, A.; CARAZZOLO, A.; MEURENS, M.; MAERTENS L.; CARABAÑO, R., Nutritive evaluation and ingredient prediction of compound feeds for rabbits by near-infrared reflectance spectroscopy (NIRS). **Animal Feed Science and Technology**, v. 77, p. 201-212, 1999.

XICCATO, G.; TROCINO, A.; BOEVER, J. L. DE; MAERTENS, L.; CARABAÑO, R.; PASCUAL, J. J.; PEREZ, J. M.; GIDENNE, T. FALCAO-ECUNHA, L., Prediction of chemical composition, nutritive value and ingredient composition of European compound feeds for rabbits by near infrared reflectance spectroscopy (NIRS). **Animal Feed Science and Technology**, v. 104, p. 153-168, 2003.

WAN, J.; KING, K.; CRAVEN, H.; MCAULEY, C.; TAN, S. E.; COVENTRY, M. J.; Probelia ((TM)) PCR system for rapid detection of Salmonella in milk powder and ricotta cheese. **Letters in Applied Microbiology**, v. 30, p. 267-271, 2000.

WATSON, C. A., Near-infrared reflectance spectrophotometric analysis of agricultural products. **Analytical Chemistry**, v. 49, p. 835A-840A, 1977.