UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

Guilherme de Oliveira Machado

Análise de qualidade de requeijões cremosos diretamente nas embalagens por RMN-DT

> São Carlos 2022

### GUILHERME DE OLIVEIRA MACHADO

## Análise de qualidade de requeijões cremosos diretamente nas embalagens por RMN-DT

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências (Química Analítica).

Orientador: Luiz Alberto Colnago

São Carlos 2022 Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Assinatura: Data:

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Referência e Atendimento ao Usuário do SBI/IQSC

Machado, Guilherme de Oliveira Análise de qualidade de requeijões cremosos diretamente nas embalagens por RMN-DT / Guilherme de Oliveira Machado. — São Carlos, 2022. 82 f.
Dissertação (Mestrado em Química Analítica e Inorgânica) — Instituto de Química de São Carlos / Universidade de São Paulo, 2022. Edição revisada
Orientador: Prof. Dr. Luiz Alberto Colnago
1. Ressonância magnética Nuclear. 2. Química analítica. 3. Quimiometria. 4. Alimentos. 5. Laticínios. I. Título.

Wilneide do C. Marchi Maiorano - CRB: 3978/8



## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais por me apoiarem ao longo de todos os anos;

Ao professor Dr. Luiz Alberto Colnago por toda confiança, dedicação e paciência ao longo do desenvolvimento desse projeto, e por toda ajuda nos momentos difíceis;

Ao professor Dr. Tiago Bueno Moraes pela ajuda no processamento dos dados no Origin e por todas as contribuições e sugestões feitas no exame de qualificação;

A professora Dra. Poliana Macedo dos Santos por auxiliar nas análises quimiométricas realizadas no desenvolvimento do projeto;

Ao Dr. Rodrigo Henrique dos Santos Garcia pela ajuda com as análises de quimiometria e por auxiliar nas análises com o Minispec;

A Dr<sup>a</sup>. Tatiana Monaretto pela ajuda a utilizar o Spinlock e com o processamento de dados no início do desenvolvimento desse trabalho;

Aos amigos da Embrapa Instrumentação: Gabriel, Luisa e Banny, por ajudarem de alguma forma para que eu pudesse concluir esse projeto;

A Embrapa Instrumentação e as técnicas de laboratório pelo suporte oferecido;

Aos funcionários do Instituto de Química de São Carlos (IQSC – USP);

Ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado e financiamento do projeto.

#### RESUMO

A técnica de Ressonância Magnética Nuclear no Domínio do Tempo (RMN-DT) vem sendo utilizada para avaliação da qualidade de produtos lácteos como leite in natura ou processado, queijos etc. Neste trabalho, foi utilizada a técnica de RMN-DT, aliada com métodos quimiométricos, para avaliar a qualidade de requeijões cremosos diretamente nas embalagens lacradas. Foram utilizadas amostras de requeijões cremosos do tipo tradicional, light, zero lactose, veganos, e com fibras. As sequências de pulsos utilizadas foram a CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill), cujo sinal é dependente do tempo de relaxação transversal (T<sub>2</sub>), e a CWFP-T<sub>1</sub> (Continuous Wave Free Precession), que é depende do tempo de relaxação longitudinal (T<sub>1</sub>). Também foram realizadas análises químicas para determinar diretamente parâmetros químicos dos requeijões, que foram liofilização, para determinação dos teores de umidade, e extrações Soxhlet, para determinação dos teores de gordura e de massa seca desengordurada. Os dados dos parâmetros químicos foram analisados por métodos estatísticos univariados, como média e coeficiente de variação, onde observou-se que houve grande variação desses parâmetros mesmo entre amostras do mesmo tipo de requeijão. Esses dados também foram analisados por métodos quimiométricos como a Análise de Componentes Principais (PCA) e Análise de Agrupamentos Hierárquicos (HCA). Os resultados das análises de PCA e HCA também mostraram a grande variação entre as amostras dentro de mesmo grupo, e que a separação entre as amostras se deve mais à composição química, ou seja, pelos teores de umidade, teor de gordura e massa seca desengordurada, e não por conta do tipo de requeijão. Os dados de CPMG e CWFP-T1 foram processados utilizados análises multiexponenciais discretas, análises multiexponenciais contínuas com a Transformada Inversa de Laplace (ILT), e com métodos quimiométricas, que foram Análise de Componentes Principais (PCA) e Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-R). Nos dados de PCA não se observou separações significativas entre as amostras. No entanto, os dados de PLS-R, tanto o modelo de calibração e validação, apresentaram valores moderados e altos de correlações com todos os parâmetros químicos estudados principalmente com a sequência CWFP-T<sub>1</sub>, o que mostra o potencial da técnica de RMN-DT para análise de determinados parâmetros químicos de requeijões cremosos, mesmo quando analisados diretamente nas embalagens comerciais.

#### ABSTRACT

The Time-Domain Nuclear Magnetic Resonance (TD-NMR) relaxometry has been used to evaluate the quality of dairy products such as fresh or processed milk, cheeses, etc. In this work, the TD-NMR technique combined with chemometric methods, was used to evaluate the quality of requeijão cremoso directly in sealed packages. Samples of traditional requeijão cremoso, light, lactose-free, vegan, and with fiber were used. The pulse sequences used were the CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill), whose signal is dependent on the transverse relaxation time  $(T_2)$ , and the CWFP-T<sub>1</sub> (Continuous Wave Free Precession), which is dependent on the longitudinal relaxation time  $(T_1)$ . Chemical analyzes were also carried out to determine the chemical parameters of the requeijões, which were freeze-drying, to determine the moisture content, and Soxhlet extractions, to determine the fat and defatted dry mass contents. The chemical data were analyzed by univariate statistical methods, such as mean and coefficient of variation, where it was observed that there was a great variation of these parameters even between samples of the same type of requeijão. These data were also analyzed by chemometric methods such as Principal Component Analysis (PCA) and Hierarchical Cluster Analysis (HCA). The results of the PCA and HCA analyzes also showed a great variation between the samples within the same group, and that the separation between the samples is more due to the chemical composition, which is, by the moisture content, fat content and defatted dry mass, and not because of the type of requeijão. The CPMG and CWFP-T<sub>1</sub> data were processed using discrete multiexponential fitting, continuous multiexponential analysis with the Inverse Laplace Transform (ILT), and with chemometric methods, which were Principal Component Analysis (PCA) and Partial Least Squares Regression (PLS-R). In the PCA data, no significant separations were observed between the samples. However, the PLS-R data showed moderate and high values of correlations, for both calibration and cross-validation models, with all the chemical parameters studied, mainly with the CWFP-T<sub>1</sub> sequence, which shows the potential of the TD-NMR technique for the analysis of certain chemical parameters of requeijão cremoso, even when analyzed directly on comercial packaging.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema do movimento de precessão do momento magnético nuclear na
presença de um campo magnético B <sub>0</sub> 17
Figura 2 - Esquema dos níveis de energia de um núcleo com spin = 1/2 na presença de um
campo magnético estático18
Figura 3 - Representação do cone de precessão e da magnetização resultante $M_0$ no eixo
z
Figura 4 - Sequência de pulsos da técnica de inversão-recuperação
Figura 5 - Representação vetorial dos eventos que ocorrem com a sequência de pulsos
inversão-recuperação22
Figura 6 - Variação da amplitude do FID em função do τ
Figura 7 - Representação do sinal de CWFP para uma amostra de óleo de amendoim24
Figura 8 - Esquema da sequência de pulsos da técnica CWFP- T <sub>1</sub>
Figura 9 - Exemplo do sinal de CWFP-T <sub>1</sub> para o complexo [Mn(H <sub>2</sub> O) <sub>6</sub> ] <sup>2+</sup>
Figura 10 - Esquema da sequência de pulsos da técnica CPMG
Figura 11 - Representação vetorial dos eventos que ocorrem na sequência de pulsos
CPMG
Figura 12 - Fluxograma das etapas de produção industrial do requeijão cremoso
Figura 13 - Esquema do processo de coagulação das micelas de caseína do leite33
Figura 14 - Equipamentos utilizados: A) Spinlock de 8Hz e B) Minispec ND mq-20 de 20Hz.
Figura 15 - Diagrama com a sequência e os tipos de análises realizadas
Figura 16 - Histogramas da (a) umidade, (b) gordura (b.u.), (c) massa seca desengordurada
(b.u.) e (d) gordura (b.s.) onde cada barra equivale a um intervalo de 2,99 e o número do
eixo x o valor inicial usado em cada faixa47
Figura 17 - Gráfico duplo com os scores e pesos obtidos com PCA dos dados de umidade,
gordura (b.u.) e massa seca desengordurada (b.u.) dos requeijões da Tabela 1, divididos
em grupos Tradicional, (azul) Light (vermelho), Vegano (rosa), Zero Lactose (verde) e fibras
(preto) e o respetivo gráfico de pesos (roxo)49

Figura 19 - Sinais CPMG obtidos no Spinlock das amostras separadas em grupos, sendo Figura 20 - Sinais CPMG obtidos no Minispec das amostras separadas em grupos, sendo Figura 21 - Sinais CWFP-T<sub>1</sub> obtidos no Spinlock das amostras separadas em grupos, sendo Figura 22 - Sinais CWFP-T<sub>1</sub> obtidos no Minispec das amostras separadas em grupos, sendo Figura 23 - a) Decaimento exponencial da técnica CPMG e b) recuperação exponencial dos sinais das amostras Tradicional 12 (preto), Zero Lactose 1 (vermelho) e Light 6 (azul) Figura 24 - a) Decaimento exponencial do sinal CPMG de uma amostra de requeijão e os ajustes mono e biexponencial. b) Gráfico de resíduos dos ajustes monoexponencial (em Figura 25 - Espectros de distribuição dos tempos de relaxação T<sub>2</sub> obtidos das amostras Figura 26 - Espectros de distribuição dos tempos de relaxação T<sub>1</sub> obtidos dos sinais CWFP-T<sub>1</sub> das amostras Tradicional 12 (preto), Zero Lactose 1 (vermelho) e Light 6 (azul). ...... 60 Figura 27 - Gráficos de correlação entre T<sub>22</sub> e os parâmetros físico-químicos: (a) teor de umidade, (b) teor de gordura em base seca, (c) teor de gordura em base úmida, (d) teor de massa seca desengordurada......63 Figura 28 - Gráficos de correlação entre T<sub>12</sub> e os parâmetros físico-químicos: (a) teor de umidade, (b) teor de gordura em base seca, (c) teor de gordura em base úmida, (d) teor de massa seca desengordurada......64 Figura 29 - Gráficos de scores dos dados de CPMG obtidos no Spinlock das 30 marcas de amostras de requeijão: a) amostras separadas nos grupos Fibras (preto), Tradicional (azul), Light (vermelho), Vegano (rosa) e Zero Lactose (verde). b) Amostras separadas em grupo A (preto) e grupo B (vermelho)......65

Figura 30 - Gráfico de scores dos dados de CPMG para as 30 marcas de amostras de requeijão analisados no Minispec: a) amostras separadas nos grupos Fibras (preto), Tradicional (azul), Light (vermelho), Vegano (rosa) e Zero Lactose (verde). b) Amostras Figura 31 - Gráfico de scores dos dados de CWFP-T<sub>1</sub> para as 30 marcas de amostras de requeijão analisados no Spinlock: a) amostras separadas nos grupos Fibras (preto), Tradicional (azul), Light (vermelho), Vegano (rosa) e Zero Lactose (verde). b) Amostras Figura 32 - Gráfico de scores dos dados de CWFP-T1 para as 30 marcas de amostras de requeijão analisados no Minispec: a) amostras separadas nos grupos Fibras (preto), Tradicional (azul), Light (vermelho), Vegano (rosa) e Zero Lactose (verde). b) Amostras Figura 33 - Gráficos de correlação entre os valores de teor de referência e teor preditos pelo modelo PLS para os teores de umidade (A), de gordura em base seca (B) e em base úmida (C) e massa seca desengordurada (D) com os dados CPMG, obtidos pelo Spinlock...... 69 Figura 34 - Gráficos de correlação entre os valores de teor de referência e teor preditos pelo modelo PLS para os teores de umidade (A), de gordura em base seca (B) e em base úmida (C) e massa seca desengordurada (D) com os dados CWFP-T<sub>1</sub>, obtidos pelo Spinlock. . 70 Figura 35 - Gráficos de correlação entre os valores de teor de referência e teor preditos pelo modelo PLS para os teores de umidade (A), de gordura em base seca (B) e em base úmida (C) e massa seca desengordurada (D) com os dados CPMG, obtidos pelo Minispec. ..... 71 Figura 36 - Gráficos de correlação entre os valores de teor de referência e teor preditos pelo modelo PLS para os teores de umidade (A), de gordura em base seca (B) e em base úmida (C) e massa seca desengordurada (D) com os dados CWFP-T<sub>1</sub>, obtidos pelo Minispec. 72

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores de porcentagens de umidade, gordura (bu) e massa seca
desengordurada (b.u.) e gordura (b.s.), médias ( $\overline{x}$ ) e coeficiente de variação (CV)46
Tabela 2 - Valores de $T_2$ e suas áreas obtidos com os ajustes monoexponenciais e
biexponenciais das amostras Tradicional 12, Zero Lactose 2 e Light 6
Tabela 3 - Valores de T <sub>2</sub> e suas áreas obtidos com a ILT dos sinais das amostras Tradicional
12, Zero Lactose 2 e Light 658
Tabela 4 - Valores de $T_1$ e suas áreas obtidos com os ajustes monoexponenciais e
biexponenciais dos sinais CWFP-T <sub>1</sub> das amostras Tradicional 12, Zero Lactose 2 e Light 6.
Tabela 5 - Valores de T $_1$ e suas áreas obtidos com a ILT dos sinais CWFP-T $_1$ das amostras
Tradicional 12, Zero Lactose 2 e Light 6 usando a ILT60
Tabela 6 - Valores de $T_{21}$ e $T_{22}$ em ms e suas respectivas amplitudes obtidos com ajuste
biexponencial
Tabela 7 - Valores de $T_{11}$ e $T_{12}$ em ms e suas respectivas amplitudes obtidos com ajuste
biexponencial
Tabela 8 - Valores de correlação entre os tempos de relaxação e os parâmetros físico-
químicos
Tabela 9 - Valores de r <sup>2</sup> do modelo de calibração obtidos com as análises de PLS-R com os
dados de RMN-DT Erro! Indicador não definido.
Tabela 10 - Valores de RMSEC obtidos com as análises de PLS-R com os dados de RMN-
DT72
Tabela 11 - Valores de r <sup>2</sup> do modelo de validação cruzada obtidos com as análises de PLS-
R com os dados de RMN-DT Erro! Indicador não definido.
Tabela 12 - Valores de RMSECV obtidos com as análises de PLS-R com os dados de RMN-
DT Erro! Indicador não definido.

## Lista de Abreviaturas e siglas

- RMN-DT: Ressonância Magnética Nuclear no Domínio do Tempo
- FID: Free Induction Decay
- **CP: Carr-Purcell**
- CPMG: Carr-Purcell-Meiboom-Gill
- CWFP: Continuous Wave Free Precession
- CP-CWFP: Carr-Purcell Continuous Wave Free Precession
- EE: Estado Estacionário
- EQE: Estado quasi-estacionário
- IR: Inversão-Recuperação
- SSFP: Steady State Free Precession
- ILT: Transformada Inversa de Laplace
- PCA: Análises de Componentes Principais
- HCA: Análises de Agrupamentos Hierárquicos
- PLS-R: Regresão por Mínimos Quadrados Parciais
- RMSEC: Erro Quadrático Médio de Calibração Root Mean Square Error of Calibration
- RMSECV: Erro Quadrático Médio de Validação Cruzada Root Mean Square Error of Cross Validation

## Lista de símbolos

- Bo: Campo Magnético Externo
- B1: Campo Magnético Oscilante
- $\alpha$ : Estado de menor energia
- $\beta$  : Estado de maior energia
- y: Constante magnetogírica
- $\mu$  : Momento magnético nuclear
- N: Níveis de energia
- L: Número quântico de spin
- Io: Intensidade do sinal
- h: Constante de Plank
- $\Delta$  E: Diferença de energia
- N a: População de spins no nível de menor energia
- N ß: População de spins no nível de maior energia
- K: Constante de Boltzman
- T: Temperatura em Kelvin
- Mz: Magnetização no eixo z
- Mo: Magnetização no equilíbrio térmico
- Mxy: Magnetização no plano xy
- MEE: Magnetização no estado estacionário
- θ: Ângulo de rotação da magnetização
- t<sub>P</sub>: Tempo de duração do pulso
- T2\*: Constante de decaimento do FID
- T2: Tempo de relaxação transversal
- T1: Tempo de relaxação longitudinal
- Tr: Tempo de repetição
- $\Psi$ : Ângulo de precessão
- ω o: Frequência de Larmor
- ω: Frequência do campo magnético oscilante B1
- Ω: Frequência de offset
- $\tau$  : Tempo entre os pulsos

## Sumário

1. Introdução	. 15
2. Revisão Bibliográfica	. 16
2.1. Fundamentos da Ressonância Magnética Nuclear	. 16
2.1.1. Relaxação Longitudinal	. 20
2.1.2. Relaxação Transversal	. 26
2.2. Queijos	. 30
2.2.1. Requeijão cremoso	. 31
2.3 Aplicações da técnica de Ressonância Magnética Nuclear no Domínio do Tempo (RM	/N-
DT) em leite e derivados	. 35
2.4. Análises quimiométricas	. 37
2.4.1. Análise de Componentes Principais (PCA)	. 37
2.4.2. Análise de Agrupamentos Hieráquicos (HCA)	. 38
2.4.3. Análise de Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-R)	. 38
3. Objetivos	. 39
4. Materiais e Métodos	. 39
4.1. Amostras	. 39
4.2. Métodos	. 40
4.2.1. Análises por RMN no Domínio do Tempo	. 40
4.2.2. Análises químicas:	. 41
4.2.2.1. Determinação do teor de umidade	. 41
4.2.2.2. Determinação do teor de gordura	. 41
4.3. Programas utilizados para os ajustes multiexponenciais	. 42
4.4. Análise quimiométrica	. 42
5. Resultados e Discussões	. 44
5.1. Análise da composição básica dos requeijões	. 45
5.5. Análises por RMN-DT	. 51
5.5.1. Análises multiexponenciais discretas e contínuas dos dados CPMG e CWFP-T1	. 55
5.6. Análises dos dados de CPMG e CWFP-T <sub>1</sub> por métodos quimiométricos	. 65
5.6.1. Análise de Componentes Principais (PCA) dos dados CPMG	. 65

5.6.2. Análise de Componentes Principais (PCA) dos dados CWFP-T <sub>1</sub>	. 66
5.6.3. Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-R) dos dados de CPMG e CWI	FP-
T <sub>1</sub>	. 68
6. Conclusões	. 76
7. Referências Bibliográficas	. 77

#### 1.Introdução

O fenômeno de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) em matéria condensada foi observada e descrita pela primeira vez em 1946, por dois grupos independentes. Um grupo era liderado por Felix Bloch, da Universidade de Stanford, e o outro, era liderado por Edward Purcell, da Universidade de Harvard. E ambos os pesquisadores receberam o prêmio Nobel em Física, em 1952, por suas contribuições na área de RMN (GIL, V.M.S.; GERALDES, C.F.G.C, 1987).

A RMN é uma técnica bastante versátil e possui aplicações em pesquisas nas ciências básicas, mas também em áreas como engenharia de materiais (MCDONALD, P.J. et al. 2007), alimentos (MAHER, A. D.; ROCHFORT, S.J., 2014) e petróleo (MOHNKE, O.; YARAMANCI, U., 2008). Uma das aplicações da RMN é a tomografia por ressonância magnética, que é bastante utilizada para estudar a presença e distribuição de uma determinada substância, como água e/ou gordura, em sistemas biológicos, como alimentos, e é aplicada na área da Medicina, para realizar diagnósticos por imagem. Outra aplicação é a técnica de espectroscopia por RMN, que pode ser dividida em baixa (frequência de até 20 MHz referente ao núcleo de H<sup>1</sup>) e alta resolução (frequência entre 200 e 1200 MHz referente ao núcleo de H<sup>1</sup>) (LACERDA JR, V. et al., 2017).

Na RMN em alta resolução são utilizados equipamentos com alto campo magnético e com alta homogeneidade. É bastante aplicada nas áreas de Química Orgânica (BALDISSERA, A. F. et al., 2005), Bioquímica (CAVALLI, A. et al., 2007) e Metabolômica (COUTINHO, I. D. et al., 2018), sendo utilizada, por exemplo, para determinação de estruturas de compostos orgânicos, da estrutura tridimensional de proteínas, e da concentração de componentes presentes em solução (COLNAGO, L. A.; ANDRADE, F. D, 2017) (CLARIDGE, T. D.W, 2009). Na RMN em alta resolução, é necessário utilizar a Transformada de Fourier, para converter o decaimento livre da indução (*free induction decay* - FID) detectado com a sequência de pulso em um espectro no domínio da frequência para se determinar os deslocamentos químicos, acoplamentos spin-spin e outros parâmetros espectrais (LACERDA JR, V. et al., 2017).

A RMN em baixa resolução, ou RMN de bancada, usa equipamentos com baixo campo e baixa homogeneidade e por isso não se observa os parâmetros espectrais, como

o deslocamento químico etc. Nessa técnica, observa-se o FID ou eco de spin no domínio do tempo, e as diferenças entre os valores de tempo de relaxação transversal (T<sub>2</sub>) e longitudinal (T<sub>1</sub>) e coeficiente de difusão (COLNAGO, L. A.; ANDRADE, F. D, 2017). A RMN em baixa resolução possui limitações, como sua baixa sensibilidade, o que torna necessário que o isótopo estudado seja abundante e tenha alta constante magnetogírica. No entanto, possui vantagens, quando comparada com os métodos tradicionais de análises químicas, como permitir realizar análises mais rápidas, não-invasivas e não-destrutivas, com nenhum ou mínimo de prepare de amostras. Em comparação com a RMN em alto campo que utiliza imãs supercondutores, a RMN-DT usa equipamentos de baixo custo de aquisição e manutenção, e utiliza imãs permanentes. A RMN-DT possui diversas aplicações industriais, como no controle de qualidade na indústria de alimentos, de petróleo e farmacêutica (LACERDA JR, V. et al., 2017) (MORAES, T. B.; COLNAGO, L. A, 2022).

#### 2. Revisão Bibliográfica

#### 2.1. Fundamentos da Ressonância Magnética Nuclear

A técnica de RMN é uma técnica de espectroscopia, portanto, se baseia na interação da radiação eletromagnética (na região da radiofrequência) com a matéria. Para que o fenômeno da RMN seja observado, é necessário que os núcleos atômicos presentes na amostra possuam momento angular ou *spin* ( $\vec{L}$ ), e momento magnético ( $\vec{\mu}$ ) e que eles estejam na presença de um campo magnético estático B<sub>0</sub> e um campo magnético oscilante  $\vec{B}_1$ . (COLNAGO, L.\_A.; ANDRADE, F. D, 2017). Qualquer núcleo (isótopo) que possua massa atômica ímpar ou número atômico ímpar, ou ambos, possuirá as propriedades de *spin* e de momento magnético. Os isótopos mais estudados em RMN são <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C <sup>19</sup>F e <sup>31</sup>P (PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S, 2001).

O momento magnético ( $\vec{\mu}$ ) e o momento angular de *spin* ( $\vec{L}$ ) possuem uma constante de proporcionalidade, que é a constante magnetogírica  $\gamma$ , conforme na Equação 1:

$$\vec{\mu} = \mathbf{\gamma}. \vec{L} \tag{1}$$

A constante magnetogírica é característica de cada isótopo e está ligada à receptividade daquele isótopo na técnica de RMN (GIL, V.M.S.; GERALDES, C.F.G.C, 1987) (CLARIDGE, T. D.W, 2009).

A interação dos núcleos magneticamente ativos com o campo magnético, pode ser explicada usando tanto a mecânica clássica quanto a quântica. Classicamente, o campo magnético  $\vec{B}_0$  exerce um torque sobre os momentos magnéticos  $\vec{\mu}$ , que faz com que eles precessionem com uma frequência angular  $\vec{\omega}_0$ , chamada de frequência de Larmor (Figura 1) que é proporcional ao campo magnético  $\vec{B}_0 \in \mathbf{Y}$ , segundo a Equação 2. Para observar o sinal de RMN aplica-se um campo magnético oscilante com uma frequência igual a frequência de Larmor.

$$\vec{\omega}_0 = \mathbf{y}. \ \vec{B}_0 \tag{2}$$





Fonte: autoria própria.

Quanticamente, na ausência do campo magnético  $\vec{B}_0$ , os spins estão degenerados, ou seja, estão no mesmo nível energético. Porém, quando é aplicado um campo magnético, ocorre a separação desses níveis energéticos, e os núcleos que possuem *spin,* irão se orientar no eixo de  $\vec{B}_0$ . O número de níveis de energia que os núcleos podem ter depende do número de *spin*  $\vec{L}$ , conforme a Equação 3:

$$N = 2\vec{L} + 1 \tag{3}$$

No caso de um núcleo que tenha  $\vec{L} = \frac{1}{2}$ , existirão dois níveis energéticos para os spins: um nível  $\alpha$ , de menor energia, onde os spins se orientam à favor do campo magnético, e um nível  $\beta$ , de maior energia, com os spins se orientando contra o campo magnético, como esquematizado na Figura 2 (GIL, V.M.S.; GERALDES, C.F.G.C, 1987).

Figura 2 - Esquema dos níveis de energia de um núcleo com spin 1/2 na presença de um campo magnético estático.



Fonte: autoria própria.

A distribuição das populações de spins nos níveis de energia  $\alpha$  e  $\beta$  e dada pela Equação de Boltzmann (4)

$$N_{\alpha}/N_{\beta} = \exp^{(\Delta E/kT)}$$
(4)

onde N<sub> $\alpha$ </sub> e N<sub> $\beta$ </sub> representam as populações de spins nos níveis de menor e maior energia, respectivamente, K é a constante de Boltzmann (1,3806 X 10<sup>-23</sup> J.K<sup>-1</sup>) e T é a temperatura absoluta em K (CLARIDGE, T. D.W, 2009).

A equação de Boltzmann mostra que nas condições de equilíbrio, sempre haverá maior população de spins no nível de menor energia ( $\alpha$ ) (CLARIDGE, T. D.W, 2009). E devido à diferença de população entre os níveis de energia, é gerada uma magnetização líquida,  $\vec{M}_{0}$ , que aponta na direção do eixo z, e que é resultante da soma vetorial de todos os momentos magnéticos da amostra, como mostrado na Figura 3, e na Equação 5:

$$\vec{M}_0 = \Sigma \vec{\mu} \tag{5}$$



Figura 3 - Representação do cone de precessão e da magnetização resultante M<sub>0</sub> no eixo z.

Fonte: CLARIDGE, T. D.W, 2009, p. 13.

Na Figura 3 também é mostrado o cone de precessão, formado pelos vetores dos momentos magnéticos individuais alinhados na direção z, com orientação à favor e contra o campo  $\vec{B}_{0}$ .

Para obter a condição de ressonância, em espectrômetros pulsados, é necessário aplicar um campo magnético oscilante  $\vec{B}_1$ , perpendicularmente a  $\vec{B}_0$ , sob a forma de pulsos com a mesma frequência de Larmor  $\vec{\omega}_0$ . O pulso de radiofrequência aplicado exerce um torque  $\tau$  sobre M<sub>0</sub> e a resultante M<sub>0</sub> passa a precessionar em torno de  $\vec{B}_1$ , deslocando a magnetização em  $\theta$  graus em relação ao eixo z inicial. O ângulo que é deslocado a magnetização é dado pela intensidade de  $\vec{B}_1$  e pela duração do pulso aplicado, conforme a Equação 3:

$$\Theta = \mathbf{\gamma} \vec{B}_1 \mathbf{t}_{\mathrm{p}} \tag{6}$$

onde  $\theta$  representa o ângulo de rotação da magnetização e  $t_p$  é o tempo de duração do pulso de radiofrequência (COLNAGO, L.\_A.; ANDRADE, F. D, 2017).

O pulso aplicado gera uma componente da magnetização ao plano xy, denominada  $M_{xy}$ . Após o pulso a componente  $M_{xy}$  volta a precessionar em torno de  $\vec{B}_0$  e induz uma corrente elétrica em uma bobina receptora, que é responsável pela geração do sinal de RMN, denominado FID (*Free Induction Decay*).

Uma vez que a aplicação do campo oscilante  $\vec{B}_1$  é interrompida, ocorrem também dois processos de relaxação simultâneos e independentes: a relaxação longitudinal (T<sub>1</sub>) e transversal (T<sub>2</sub>), onde T<sub>1</sub> $\geq$ T<sub>2</sub>.

#### 2.1.1. Relaxação Longitudinal

O processo de relaxação longitudinal (ou relaxação spin-rede) está envolvido no retorno exponencial, com uma constante de tempo T<sub>1</sub>, da magnetização ao estado do equilíbrio térmico, ou seja, no eixo z, de forma que  $M_z = M_0$ , como mostrado na Equação 7:

$$M_{z} = M_{0} \left[ 1 - \exp^{-t/T} \right]$$
(7)

onde T<sub>1</sub> representa a constante de tempo da relaxação longitudinal.

Esse processo está envolvido na relaxação dos spins que foram excitados por  $\vec{B}_1$ , no qual ocorre transferência de energia do estado excitado para a vizinhança (ou rede). O processo de transferência de energia para a vizinhança ocorre, porque existem momentos magnéticos oscilantes com frequências em torno da frequência de Larmor, que são produzidos nas moléculas da vizinhança, e torna possível a dissipação dessa energia (GIL, V.M.S.; GERALDES, C.F.G.C, 1987).

Como é um processo exponencial é necessário esperar um tempo de cinco vezes  $T_1$ entre cada experimento de RMN, para que a magnetização retorne cerca de 99% do estado de equilíbrio térmico e evitar a saturação do sinal de RMN. Portanto, o valor da constante  $T_1$  influencia diretamente no tempo total gasto nas medições de RMN.

A sequência de pulso conhecida como inversão-recuperação (IR) é a mais utilizada para medir a constante T<sub>1</sub>. Essa sequência é formada por um pulso de 180 ° e um pulso de 90 °, separados por um tempo  $\tau$  (180°- $\tau$ -90°), como mostrado na Figura 4 (COLNAGO, L. A.; ANDRADE, F. D, 2017).



Figura 4 - Sequência de pulsos da técnica de inversão-recuperação.

Fonte: COLNAGO, L. A.; ANDRADE, F. D, 2017, p. 445.

Na Figura 5, é mostrada a descrição vetorial da sequência de inversão-recuperação. No instante inicial (A), a magnetização se encontra no eixo z, e então, no instante seguinte (B) é aplicado um pulso de 180 °, que faz a magnetização se deslocar para -z. Depois de um tempo  $\tau$ , no instante (C), o processo de relaxação longitudinal se inicia, e ocorre uma distribuição da magnetização entre z e -z. Dependendo do valor de  $\tau$  utilizado, a magnetização pode ser maior em z ou -z; caso o  $\tau$  seja muito menor que T<sub>1</sub>, a componente em -z é maior. No instante (D), é aplicado um pulso de 90°, e a componente em z, é deslocada para o eixo y, enquanto que a componente em -z é deslocada para -y. Uma vez que a magnetização está no plano xy, é possível realizar a detecção do sinal de RMN, que varia de valores negativos a positivos em função do tempo  $\tau$  (como mostrado na Figura 6). No instante (E), o sistema retornou à condição de equilíbrio térmico (COLNAGO, L. A.; ANDRADE, F. D, 2017).

É possível calcular o valor de T<sub>1</sub>, utilizando a Equação 5:

$$I(T) = I_0 [1 - 2.\exp^{(-t/T_1)}]$$
(8)

onde  $I_0$  representa a intensidade do sinal de RMN em que T<sub>r</sub>  $\ge$  5T<sub>1</sub> (COLNAGO, L. A.; ANDRADE, F. D, 2017).



Figura 5 - Representação vetorial dos eventos que ocorrem com a sequência de pulsos inversãorecuperação.

Fonte: COLNAGO, L. A.; ANDRADE, F. D, 2017, p. 446.



Figura 6 - Variação da amplitude do FID em função do T.

Fonte: COLNAGO, L.\_A.; ANDRADE, F. D, 2017, p. 445.

Outra sequência de pulsos que foi desenvolvida para determinar a constante de tempo T<sub>1</sub>, foi a CWFP-T<sub>1</sub>, que é baseada na CWFP (continuous wave free precession), que por sua vez, é um regime específico do estado estacionário de precessão livre (*Steady State Free Precession* – SSFP).

A formação do estado estacionário foi observada, pela primeira vez por Bradford em 1951, e depois por Carr, em 1958 (BRADFORD, et al, 1951) (CARR, H. Y, 1958). Quando é aplicado um trem de pulsos com mesma fase e intensidade, com um tempo  $\tau$  entre os pulsos menor que T<sub>2</sub> e maior que T<sub>2</sub>\* (T<sub>2</sub> >  $\tau$  > T<sub>2</sub>\*), ocorrerá a formação do SSFP. Após um determinado número de pulsos, o sinal terá duas componentes: o FID, que surge após o pulso, e o eco, que surge antes do próximo pulso. Além disso, quando a magnetização está no estado estacionário, o sinal não apresentará variações na sua intensidade (MONARETTO, T, 2015).

A CWFP é observada quando o valor de  $\tau$  é menor que T<sub>2</sub> e T<sub>2</sub>\* (T<sub>2</sub> > T<sub>2</sub>\* >  $\tau$ ), e nessa condição, ocorre sobreposição do FID e do eco, que possuem defasagem de 180 ° entre si, e é obtido um sinal com amplitude constante (AZEREDO, R. B. D. V. et al, 2000).

Durante o tempo  $\tau$  entre os pulsos, a magnetização precessionará em torno do eixo z, com um ângulo  $\Psi$ , como mostrado na Equação 9:

$$\Psi = (\omega - \omega_0)\tau = \Omega\tau \tag{9}$$

onde  $\Psi$  representa o ângulo de precessão e  $\Omega$  representa a frequência de *offset*.

A frequência de *offset* é a diferença entre a frequência angular do campo oscilante  $B_1(\omega)$  e a frequência de Larmor ( $\omega_0$ ) (MORAES, T. B.; COLNAGO, L. A, 2014).

A sequência CWFP, tem a vantagem de tornar possível adquirir vários espectros em poucos segundos, o que permite aumentar a razão sinal/ruído dos espectros. Além disso, Venâncio et al. desenvolveram um método baseado na CWFP, no qual é possível obter os valores de T<sub>1</sub> e T<sub>2</sub> em um mesmo experimento. Essa sequência consiste em um trem de pulsos de 90° de mesma fase, no qual o tempo  $\tau << T_2^*$ .

Na Figura 7, são mostrados os três estágios do sinal de uma sequência CWFP. O primeiro estágio, mostrado na região vermelha, é iniciado a partir do equilíbrio térmico, e é caracterizado pela alternância de intensidades do sinal. O decaimento do sinal neste estado é regido pela constante  $T_2^*$  (MONARETTO, T, 2015).



Figura 7 - Representação do sinal de CWFP para uma amostra de óleo de amendoim.

Fonte: MONARETTO, T, 2015, p. 29.

Em seguida, o sinal atinge o estado *quasi*-estacionário (EQE), mostrado na região verde. A transição do estado *quasi*-estacionário para o estacionário ocorre com uma constante denominada T<sup>\*</sup>, definida pela Equação 10:

$$T^{*} = (2.T_{1}.T_{2})/(T_{1}(1 - \cos \theta) + T_{2}(1 + \cos \theta))$$
(10)

Por fim, o sinal atinge o estágio final, que é o estado estacionário (EE), mostrado na região azul.

Na sequência CWFP, quando é utilizado um trem de pulsos de 90º, a Equação 10, pode ser simplificada, como demonstrado na Equação 11:

$$T^* = (2.T_1.T_2)/(T_1 + T_2)$$
(11)

E o sinal da CWFP no estado estacionário pode ser definido pela Equação 12:

$$M_{EE} = (M_0 T_2)/(T_2 + T_1)$$
(12)

onde  $M_{EE}$  representa a intensidade do sinal no estado estacionário e  $M_0$  representa a intensidade do sinal no equilíbrio térmico.

Se as Equações 11 e 12 forem rearranjadas, é possível obter as Equações 13 e 14, onde os valores das constantes  $T_1 e T_2$ , que dependerão dos valores de  $M_{EE}$ ,  $M_0 e T_2^*$ :

$$T_1 = (T^*/2)/(M_{EE}/M_0)$$
(13)

$$\Gamma_2 = (T^*/2)/[1 - (M_{EE}/M_0)]$$
<sup>(14)</sup>

A sequência CWFP possui limitações quando é aplicada em amostras com tempos de relaxação com valores próximos, ou seja,  $T_2 \sim T_1$ . Nesse caso, o sinal obtido possuirá baixa razão sinal/ruído e uma pequena faixa dinâmica no decaimento regido por T\*, o que torna a determinação dos valores de  $T_1$  e  $T_2$  mais suscetível a erros (MONARETTO, T, 2015).

Como demonstrado por MORAES et al, a sequência CWFP-T<sub>1</sub> também permite medir, de maneira rápida, e em um único experimento, o valor da constante T<sub>1</sub>. Nesse caso, a constante T1 é medida por meio da determinação do valor da constante de decaimento do estado quase-estacionário, T<sup>\*</sup>. Além disso, também foi demonstrado que, quanto mais baixo o valor do ângulo  $\theta$  utilizado, mais próxima a constante T\* estará da constante T<sub>1</sub>, e consequentemente, maior a precisão das medidas de T<sub>1</sub>.

Na Figura 8, é mostrado um esquema da sequência CWFP-T<sub>1</sub>. Primeiramente, é aplicado um pulso de 180 ° em x, e depois de passar um tempo  $\tau/2$ , é aplicado um trem de pulsos de baixos ângulos de rotação, entre 5 e 10 °, que possuem diferença de fase de 180 ° entre si (MORAES, T. B. et al, 2016). Na Figura 9, é mostrado um exemplo de um sinal de CWFP-T<sub>1</sub>, adquirido com 4 scans, feito com uma solução 0,1 mM do complexo [Mn(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub>]<sup>2+</sup>.



Figura 8 - Esquema da sequência de pulsos da técnica CWFP- T<sub>1</sub>.

Fonte: autoria própria



Figura 9 - Exemplo do sinal de CWFP-T<sub>1</sub> para o complexo [Mn(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub>]<sup>2+</sup>.

Fonte: Adaptada de MONARETTO, T, 2015, p. 75.

#### 2.1.2. Relaxação Transversal

O processo de relaxação transversal (ou relaxação spin-spin) está envolvido na perda de coerência de fase e desaparecimento da magnetização no plano xy (M<sub>xy</sub> = 0), e não ocorre transferência de energia para a vizinhança. A perda de coerência de fase dos componentes no plano xy está ligada às interações entre os momentos magnéticos individuais presentes na amostra (COLNAGO, L. A.; ANDRADE, F. D, 2017) (GIL, V.M.S.; GERALDES, C.F.G.C, 1987).

A relaxação transversal provoca um decaimento exponencial da magnetização transversal, com uma constante T<sub>2</sub>, como mostrado na Equação 14:

$$M_{y}(t) = M_{xy} \cos(\omega_{0}t) \exp^{-t/T}_{2}$$
(14)

onde T<sub>2</sub> representa a constante de tempo de relaxação transversal e  $M_{xy}$  é a componente da magnetização no plano xy.

A relaxação transversal é maior em moléculas pequenas (alta mobilidade), e seu valor diminui com a redução da mobilidade molecular da amostra (COLNAGO, L. A.; ANDRADE, F. D, 2017).

O sinal do Decaimento Livre de Indução (FID – *Free Induction Decay*) só decai com uma constante de tempo T<sub>2</sub> se o imã for totalmente homogêneo. Como isso não ocorre na pratica, devido a não-homogeneidade do campo magnético, o FID decai mais rapidamente do que T2, com uma constante de tempo transversal efetivo T2<sup>\*</sup> (COLNAGO, L. A.; ANDRADE, F. D, 2017). A constante de tempo transversal efetivo T2<sup>\*</sup> é dada pela Equação 15:

$$1/T_2^* = 1/T_2 + \gamma \Delta B_0$$
 (15)

onde  $\mathbf{Y}$  representa a constante magnetogírica e  $\Delta B_0$  a não-homogeneidade do campo.

Com o objetivo de conseguir realizar as medições de T<sub>2</sub> na presença da nãohomogeneidade de campo, uma sequência de pulsos foi proposta por Hahn, em 1950 (HAHN, E. L., 1950). A sequência proposta por Hahn consiste em dois pulsos de 90°, com mesma fase, espaçados por um tempo  $\tau$ . Após o tempo de 2  $\tau$ , a partir do primeiro pulso de 90°, é gerado um sinal de RMN, chamado de eco de spin, cuja amplitude é independente da não-homogeneidade do campo (COLNAGO, L. A.; ANDRADE, F. D, 2017).

A técnica de Eco de Hahn não foi muito aplicada, pois em 1954, Carr e Purcell propuseram uma modificação na mesma, e a sequência criada foi denominada de Método A de CP (CARR H. Y., PURCELL E.M., 1954). Na sequência do método A, o segundo pulso de 90 ° da sequência de Hahn foi substituído por um pulso de 180 ° de mesma fase. O sinal do eco gerado tem o dobro da amplitude em relação ao sinal gerado no eco de Hahn e é defasado em 180 ° em relação ao FID (COLNAGO, L. A.; ANDRADE, F. D, 2017).

Para a determinação de T<sub>2</sub>, tanto com a sequência de pulso de Hahn (90°- $\tau$ -90°) quanto pelo no método A de CP (90°- $\tau$ -180°), é necessário realizar medições da intensidade do eco utilizando valores crescentes de  $\tau$ . Portanto, ambas as sequências são dependentes da difusão molecular, quando a amostra está em fase líquida ou em solução, quando se usa um imã de baixa homogeneidade e quando são utilizados valores altos para  $\tau$  (ANDRADE, F. D., 2011). Ao se utilizar um valor alto de  $\tau$  num campo magnético nãohomogêneo, a difusão molecular faz com que alguns núcleos mudem de posição para campos magnéticos diferentes do inicial, após primeiro pulso, e mudem a frequência de precessão e não se refocalizem no tempo 2  $\tau$ , fazendo com que a amplitude do eco, seja menor do que o esperado para medição do valor de T<sub>2</sub>.

Além disso, entre cada medida é necessário esperar um tempo de, pelo menos, cinco vezes T<sub>1</sub>, para que a magnetização retorne cerca de 99% do estado de equilíbrio térmico,  $M_0$ . Portanto, gasta-se muito tempo durante as medidas de T<sub>2</sub> utilizando essas duas técnicas (ANDRADE, F. D, 2011).

Carr e Purcell também propuseram, uma outra sequência de pulsos, chamada de Método B ou sequência CP, na qual é aplicado um pulso de 90 ° segundo x, e depois do tempo  $\tau$ , é aplicado uma série de pulsos de 180 ° espaçados por 2  $\tau$ . (CARR H. Y., PURCELL E.M., 1954) (ANDRADE, F. D, 2011).

A sequência CP trouxe diversas vantagens como economia do tempo nas medições de T<sub>2</sub>, uma vez que tornou possível obter as intensidades de todos os ecos, em uma única varredura. Portanto, com a utilização desta técnica, se tornou desnecessário esperar o tempo de 5T<sub>1</sub>, para a medição da intensidade de todos os ecos. Outra vantagem foi a eliminação do efeito da difusão da amostra, uma vez que se tornou possível utilizar um valor de  $\tau$  pequeno para obter todo decaimento do sinal de RMN. (COLNAGO, L. A.; ANDRADE, F. D, 2017).

Uma desvantagem é que a técnica CP possui muita sensibilidade a erros de calibração dos pulsos de 180°, o que leva ao acumulo de erros, tornando as medidas de T<sub>2</sub> menos exatas (COLNAGO, L. A.; ANDRADE, F. D, 2017).

Em 1958, Meiboom e Gill, propuseram uma mudança na sequência CP, com o objetivo de resolver o problema da sensibilidade de calibração dos pulsos de 180°. A mudança consistiu na aplicação dos pulsos de 180° na direção + y, com 90° de diferença de fase em relação ao pulso inicial de 90°, como mostrado na Figura 10. A técnica criada foi chamada de CPMG. A técnica de CPMG também permitiu que os ecos gerados estivessem na fase, diferentemente da sequência CP (MEIBOOM S, GILL D, 1958) (COLNAGO, L. A.; ANDRADE, F. D, 2017).



Figura 10 - Esquema da sequência de pulsos da técnica CPMG.

Fonte: LACERDA JR, V. et al., 2017, p. 246.

Na Figura 11 é mostrada a descrição vetorial da técnica CPMG. No instante inicial (A), é aplicado o pulso de 90 ° segundo x', e a magnetização é deslocada para o plano x'y' (B). Depois do tempo  $\tau$  (C), os vetores dos spins começam a separar, e em seguida, é aplicado o pulso de 180 ° segundo y' (D), o que inverte a direção dos vetores no plano x'y'. Após o tempo  $\tau$  (E), a partir do pulso de 180 °, as magnetizações são refocalizadas em y, gerando o sinal do eco. Depois do tempo  $\tau$  (F), os spins começam a se defasarem, assim como ocorreu em (C). Em seguida, é aplicado outro pulso de 180° em y'(G), invertendo os vetores no plano x'y'. Após o tempo  $\tau$  (H), ocorre refocalização das magnetizações em y', e o sinal do eco é gerado (MEIBOOM S, GILL D, 1958) (COLNAGO, L. A.; ANDRADE, F. D, 2017).

Na técnica CPMG, os erros de calibração dos pulsos de 180º não se acumulam ao longo do tempo, eles são anulados pelo pulso de 180º seguinte (CLARIDGE, T. D.W, 2009).



Figura 11 - Representação vetorial dos eventos que ocorrem na sequência de pulsos CPMG.

Fonte: COLNAGO, L. A.; ANDRADE, F. D, 2017, p. 449.

## 2.2. Queijos

Segundo PERRY, K (2004), o queijo é consumido desde as primeiras civilizações, como no Egito e na Grécia Antiga. E quanto ao consumo nacional, segundo GOMES, R. A. R. et al, 2017, entre os anos de 2009 e 2014, o consumo per capita de queijos no Brasil, cresceu cerca de 68,6 %. Além disso, houve aumento de queijos com variedade de sabores, e também houve aumento da demanda por queijos com menor teor de gordura, como os queijos ricota e Minas Frescal.

O queijo é um alimento com diversos nutrientes, tais como proteínas, carboidratos, lipídeos, sais minerais e vitaminas (PERRY, K., 2004). E segundo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade dos Queijos, regulamentado pela Portaria 146 de 7 de março de 1996, define queijo como sendo o 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 coagulados pela ação física do coalho, de enzimas específicas, de bactéria específica, de ácidos orgânicos, isolados ou combinados, com ou sem agregação de

substâncias alimentícias e, ou especiarias e, ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes (BRASIL, 1996).

No estudo de GOMES, R. A. R. et al, 2017, os queijos podem separados em três grupos: o primeiro é formado por queijos obtidos por fermentação lática e por coagulação ácida à quente; o segundo pelos queijos obtidos por coagulação enzimática; e o terceiro pelos queijos processados.

Os queijos processados, ou queijos fundidos, são produzidos por meio da fusão e mistura de outros queijos naturais, com adição de sais emulsificantes, e com adição opcional de outros produtos de origem láctea, especiarias, condimentos e outros produtos alimentícios. As vantagens dos queijos processados são custo reduzido, por utilizar produtos de origem não-láctea mais baratos, menor geração de resíduos na produção e maior tempo de prateleira do produto final (ZACARCHENCO, P. B., et al, 2012).

#### 2.2.1. Requeijão cremoso

O requeijão cremoso é um tipo de queijo fundido brasileiro, que é bastante consumido e possui grande importância econômica. (VAN DENDER et al, 2012). Segundo informações de 2013 da Associação Brasileira de Indústrias de Queijo (ABIQ) a produção de requeijão cremoso no Brasil foi de 9,8 mil toneladas em 1992 e passou para 72,1 mil toneladas em 2011. Nesse mesmo ano, o requeijão cremoso ocupou a colocação de quarto tipo de queijo mais produzido no Brasil, ficando atrás do queijo mussarela, do requeijão culinário e do queijo prato (ABIQ 2013).

Segundo a portaria 359 de 04 de setembro de 1997, do Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o requeijão é definido como o produto obtido pela fusão da massa coalhada, cozida ou não, dessorada e lavada, obtida por coagulação ácido e/ou enzimática do leite, com adição opcional de creme de leite e/ou manteiga e/ou gordura anidra de leite e/ou *butter oil*. No produto final poderá ser adicionado condimentos, especiarias e outras substâncias alimentícias (BRASIL, 1997).

Segundo a mesma portaria, os ingredientes obrigatórios para o requeijão cremoso são leite ou leite reconstituído, creme e/ou manteiga e/ou gordura anidra de leite ou *butter oil*. Também é descrito que o requeijão cremoso, deve ter, o valor mínimo de 55 g/100 g de gordura no extrato seco, e o valor máximo de umidade de 65 g/100 g (BRASIL, 1997).

Além disso, é descrito que só podem ser denominados como requeijão, os produtos que não contenham gordura vegetal ou proteínas de origem não láctea. No entanto, em 2005, o Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal, permitiu que produtos com gordura vegetal ou amido pudessem ser denominados de requeijão, e que deve ser especificado qual o ingrediente que foi adicionado (BRASIL, 1997).

O processo de fabricação do requeijão cremoso envolve as etapas de coagulação do leite, dessoragem do leite, lavagem da massa, adição dos demais ingredientes, fusão da massa, envasamento e armazenamento, como mostrado no fluxograma da Figura 12 (SILVA et al, 2012) (VIDAL e SARAN NETTO, 2018).



Figura 12 - Fluxograma das etapas de produção industrial do requeijão cremoso.

Na primeira etapa de produção ocorre a coagulação do leite, que por sua vez pode ser cru, desnatado ou pasteurizado. A coagulação do leite pode ocorrer de três maneiras: fermentação lática, na qual são utilizadas culturas láticas; acidificação direta, na qual é adicionado ácido lático no leite na temperatura entre 80 e 82 °C; ou coagulação enzimática, na qual, geralmente a renina (quimosina) é adicionada diretamente no leite (VIDAL e SARAN NETTO, 2018).

No caso da coagulação enzimática, a renina age na quebra da ligação Phe 105-Met 106 da fração κ-caseína. Dessa forma, a porção hidrofóbica (a paracaseína) se torna mais

instável, e na presença dos íons cálcio, forma o coágulo de paracaseinato de cálcio, como mostrado na Figura 13. (RAPACCI, M,. 1997) (PICOLLO, K. C., 2006).



Figura 13 - Esquema do processo de coagulação das micelas de caseína do leite.

Fonte: Adaptado de BELITZ, H.-D. et al., 2009.

No processo de fermentação lática, uma cultura mesófila irá metabolizar a lactose do leite, e produzir ácido lático. Consequentemente, o pH do leite irá reduzir até 4,6 (ponto isoelétrico da caseína) e nesse momento ocorre a coagulação. Isso ocorre porque as cargas das partículas coloidais da caseína irão se neutralizar, e reduzirá a repulsão entre as mesmas, possibilitando a formação do coágulo (RAPACCI, M,. 1997).

Enquanto que na coagulação ácida direta, devido ao meio ácido e ao aquecimento do leite, o coágulo é formado quando o valor do pH do leite estiver maior que 4,6. Além disso, ocorrerá maior taxa de colisão entre as partículas, e a repulsão entre as caseínas diminuirá, possibilitando também a formação do coágulo. O processo de coagulação ácida direta apresenta vantagens em relação às demais, como menores tempos e custos na produção (RAPACCI, M, 1997).

Após a coagulação é realizada a etapa de corte onde são utilizadas liras, que são fios ou lâminas de aço inox, dispostas paralelamente com a mesma distância entre si. O coágulo é cortado no sentido horizontal e vertical. Essa etapa tem como objetivo facilitar a eliminação do soro e permitir um aquecimento mais uniforme para a massa. Após o corte da massa, a massa é agitada e aquecida até a temperatura de 45 °C (SILVA et al, 2012).

Em seguida, é realizada a dessoragem, onde o soro é drenado e separado da massa (AQUARONE et al, 2001).

Após a obtenção da massa lática, ela passa pela etapa de lavagem na qual será realizada a correção da acidez da massa. Nessa etapa, geralmente, a massa será lavada duas vezes com água filtrada e o volume de água utilizada é igual ao volume do soro retirado. Em seguida, a massa é lavada com leite desnatado ou integral, e o volume de leite utilizado corresponde de 20 a 30 % de leite utilizado na etapa de coagulação (RAPACCI, M,. 1997).

Na etapa de preparação do requeijão a massa é misturada junto dos outros ingredientes, que são o creme de leite ou manteiga ou gordura anidra de leite, cloreto de sódio, água e o sal fundente (SILVA et al, 2012).

O creme de leite, é o ingrediente responsável pelo teor de gordura, e por melhorar o sabor e a textura do requeijão cremoso. Quanto maior o teor de gordura desejado no produto final, maior deverá ser a proporção adicionada de creme de leite (RAPACCI, M,. 1997) (PICOLLO, K. C., 2006).

A água será importante para a dispersão dos componentes da massa e também para o teor de umidade e a consistência do produto final. O teor de umidade do requeijão cremoso é um fator importante na fabricação, pois quanto maior o teor de umidade maior será o rendimento do produto final (DRUNKLER, D. A., 2009).

O cloreto de sódio é importante para determinar o sabor e textura do requeijão cremoso, além de auxiliar na inibição do crescimento de esporos de bactérias prejudiciais e auxiliar na expulsão do soro (RAPACCI, M,. 1997) (PICOLLO, K. C., 2006).

O sal fundente ou emulsificante, por sua vez, tem a função de garantir a emulsificação da mistura de gordura e água na massa. Além disso, também são importantes para a solubilização da caseína, por meio da troca dos íons de cálcio e controle do pH. Dessa forma, o sal fundente é importante para a estabilidade do produto final. Os tipos de sais fundentes mais utilizados na produção de requeijões são, citratos, mono e polifosfatos de sódio (RAPACCI, M, 1997) (PICOLLO, K. C., 2006).

Uma vez que os ingredientes estão misturados, é realizada a etapa de fusão ou fundição da massa. A etapa de fusão é importante para se obter um produto homogêneo e com consistência cremosa. Nesta etapa, a mistura é cozida e agitada e pode ser feito o

aquecimento direto e indireto na forma de vapor (RAPACCI, M,. 1997). Esse processo geralmente é realizado sob vácuo e em uma temperatura que pode variar de 70 a 95 °C (VIDAL e SARAN NETTO, 2018).

A última etapa de fabricação consiste no envasamento do requeijão cremoso em, geralmente, copos de vidro ou plástico hermeticamente fechados, ou em bisnagas. A massa de requeijão cremoso nos copos normalmente é de 200 ou 250 g (PICOLLO, K. C., 2006). Em seguida, as embalagens com requeijão são resfriados e são armazenados, geralmente, em temperatura em torno de 4 °C para sua conservação (VIDAL e SARAN NETTO, 2018).

# 2.3 Aplicações da técnica de Ressonância Magnética Nuclear no Domínio do Tempo (RMN-DT) em leite e derivados

Na literatura é possível encontrar vários estudos em que a técnica de Ressonância Magnética Nuclear no Domínio do Tempo (RMN-DT) foi aplicada em diversos tipos de alimentos como carne (CORRÊA et al, 2009), azeite (SANTOS et al, 2017), frutas (PEREIRA et al, 2013) e sementes (PEDERSEN et al, 2000).

Especificamente, se tratando de análises de leite e derivados, TELLIER et al (1993) utilizaram a RMN-DT para obter os dados de relaxação transversal (T<sub>2</sub>) da água em leite desnatado depois da coagulação e durante o processo de sinérese da coalhada. Foi possível obter informações geométricas dos poros, estimar a quantidade de água na coalhada e no soro durante o processo de sinérese.

BUDIMAN et al (2002) utilizaram dados de relaxação transversal ( $T_2$ ) para avaliar a umidade presente em queijos fundidos de origem animal e vegetal. No estudo, foram comparados os modelos de ajuste multiexponencial e de exponencial estendida. Foi observado que os valores de  $T_2$  apresentaram boa correlação com os teores de umidade dos queijos (valores de r<sup>2</sup> foram maiores ou iguais a 0,946).

SALOMONSEN et al (2007) aplicaram a RMN-DT e observaram a variação dos valores de relaxação transversal (T<sub>2</sub>) da água em análises de bebidas lácteas acidificadas com diferentes composições. Variou-se a concentração de pectina (0 %, 0,1 %, 0,3 % e 0,5 %), e também foi adicionada um tipo de proteína (leite em pó desnatado ou leite em pó desnatado com proteína de soro de leite).

CHEN e LIU (2012) utilizaram a sequência CPMG para análises de queijos processados com diferentes concentrações de diferentes sais fundentes. Foi observado que a maior parte da umidade de queijos processados corresponde à água combinada com glóbulos de gordura e com a caseína.

CASTELL-PALOU et al (2013) demonstraram que a RMN-DT pode ser um método rápido para determinação do teor de gordura e umidade em queijos. Foram obtidos os valores de relaxação transversal (T<sub>2</sub>) e relaxação longitudinal (T<sub>1</sub>), e foi construído um modelo, utilizando o método de regressão PLS. O método apresentou alta correlação com os métodos gravimétricos padrões.

SANTOS et al (2016) construíram modelos quimiométricos das técnicas KNN e SIMCA, utilizando dados de relaxação transversal  $T_2$ , e dessa forma, conseguiram discriminar as amostras controle de leite com adulterações de 5, 15, 25, 35 e 50 % v/v. Portanto, demonstraram ser possível avaliar e quantificar a presença de adulterantes no leite, utilizando a técnica de RMN-DT.

NASCIMENTO et al (2017) aplicaram dois métodos não-destrutivos, RMN-DT utilizando a sequência CPMG para obter dados de relaxação transversal (T<sub>2</sub>), e espectroscopia de infravermelho próximo (NIR), e construíram modelos multivariados para determinação do teor de gordura em amostras comerciais de alimentos em pó, incluindo leite em pó. Nesse estudo, com as técnicas de RMN-DT e NIR, foi possível obter altas correlações (r = 0.95 e r = 0.99, respectivamente) com o valor do teor de gordura determinado pelo método padrão (Bligh e Dyer).

Em relação à trabalhos utilizando a técnica de RMN-DT em amostras de requeijão, pode-se citar FERRÃO et al (2017), no qual aplicaram as sequências CPMG e IR para análise de mobilidade da água com os xilooligossacarídeos (XOS), gordura e as proteínas presentes no requeijão cremoso. Nesse estudo, foi possível avaliar mudanças nos valores dos tempos de relaxação T<sub>22</sub>, T<sub>21</sub> e T<sub>1</sub>, conforme alterações nos teores de sódio, gordura e de XOS. As reduções nos teores de gordura, levaram a reduções nos valores dos tempos de relaxação T<sub>22</sub> e T<sub>21</sub>, e aumento de T<sub>1</sub>, devido ao aumento da força da ligação da água com as proteínas. E a presença dos XOS diminuiu os tempos de relaxação transversal e longitudinal devido á grande força de ligação entre as moléculas de água e as moléculas de XOS.
BELSITO et al (2017), utilizaram a sequência CPMG para analisar a mobilidade da água no requeijão cremoso com a adição de galactooligossacarídeos (GOS). Foi observado que as amostras de requeijão com GOS apresentaram aumento do tempo de relaxação  $T_{21}$  e por outro lado, apresentaram diminuição do tempo  $T_{22}$ , em relação às amostras controle (sem GOS).

Uma vez que existem muitos trabalhos de aplicações da RMN-DT em leite e queijos, e poucas aplicações em requeijões, este trabalho busca ser o primeiro a aplicar a técnica da RMN, juntos com técnicas de análise multivariada, para avaliar a qualidade de requeijões cremosos diretamente nas embalagens lacradas.

#### 2.4. Análises quimiométricas

A Quimiometria é uma área que utiliza ferramentas de matemática e estatística aplicadas na química. As técnicas quimiométricas podem ser utilizadas para planejamento e otimização de experimentos e também para extração das informações mais relevantes em uma análise de dados multivariados (FERREIRA et al, 1999).

No caso de extração de informações, os dados obtidos são organizados em uma matriz, onde são analisadas n amostras, nas quais são estudadas m variáveis. A matriz de dados possuirá, portanto, n linhas referentes às amostras e m colunas referentes às variáveis estudadas (MOITA NETO e MOITA, 1998).

## 2.4.1. Análise de Componentes Principais (PCA)

A Análise de Componentes Principais (PCA) é um método exploratório ou nãosupervisionado bastante utilizado para reconhecimento de padrões entre as amostras, ou seja, se existem agrupamentos entre elas. Em métodos não supervisionados não são levadas em conta as informações prévias sobre as classes das amostras.

O método de PCA consiste em reduzir a dimensionalidade das variáveis estudadas, por meio de combinações lineares e gerar componentes principais. As componentes principais são eixos independentes entre si e cada componente descreve uma determinada porcentagem da máxima variância. A componente principal 1 descreve a maior variância possível e quanto maior o número da componente principal, menor será a variância descrita pela mesma (MOITA NETO e MOITA, 1998).

## 2.4.2. Análise de Agrupamentos Hieráquicos (HCA)

O método de Análise de Agrupamentos Hierárquicos (HCA), assim como a PCA, é um método não supervisionado de reconhecimento de padrões. Esse método consiste em interligar todas as amostras em um diagrama, chamado de dendograma. O agrupamento das amostras é feito conforme suas similaridades nas variáveis estudadas. Para realizar o agrupamento das amostras, é feito o cálculo da distância euclidiana. Dessa forma, quanto maior a similaridade entre as amostras, menor será a distância entre as mesmas no dendograma (MOITA NETO e MOITA, 1998).

## 2.4.3. Análise de Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-R)

A PLS-R baseia-se na Regressão Multivariada por Mínimos Quadrados Parciais, que é uma técnica utilizada para relacionar diretamente variáveis independentes (sinais instrumentais) na matriz X, com variáveis dependentes (propriedades de interesse) na matriz Y. (SANTANA et al, 2020). Nesse método é construído um modelo para as variáveis independentes X, e outro modelo para as variáveis dependentes Y, e dessa forma, é calculada a correlação entre as variáveis independentes e as variáveis dependentes. O método PLS apresenta grande robustez, dessa forma, os parâmetros do modelo criado não se alteram significativamente quando amostras são incluídas ou retiradas do conjunto utilizado para calibração (FERREIRA et al, 1999) (FOLHA, T.O., 2014).

# 3. Objetivos

O objetivo do projeto de mestrado foi avaliar se a RMN-DT pode ser usada para avaliar a qualidade de requeijões cremosas diretamente nas embalagens lacradas utilizando as sequencias de pulsos CPMG e CWFP-T<sub>1</sub>, relacionando os valores dos tempos de relaxação transversal (T<sub>1</sub>) e longitudinal (T<sub>2</sub>), com os parâmetros químicos de teor de umidade e teor de lipídeos.

Objetivos específicos:

- Avaliar a qualidade de requeijões cremosos diretamente nas embalagens comerciais utilizando as técnicas de CPMG e CWFP-T<sup>1</sup> em aparelho de RMN-DT com sonda de 10 cm de diâmetro;
- Avaliar a qualidade de requeijões cremosos em amostras de cerca de 0,5 g, utilizando as técnicas de CPMG e CWFP-T<sup>1</sup> em aparelho de RMN-DT com sonda de 1 cm de diâmetro;
- Realizar ajustes multiexponenciais discretos e contínuo dos dados de CPMG, CWFP-T<sub>1</sub>;
- Analisar os dados de CPMG, CWFP-T<sub>1</sub> com PCA para ver se amostras se agrupam de acordo com o tipo de requeijão ou composição química.
- Fazer regressão multivariada (PLS-R) dos dados de CPMG e CWFP-T<sub>1</sub> com os de análise química.

# 4. Materiais e Métodos

## 4.1. Amostras

As amostras foram compradas no comércio da cidade de São Carlos/SP, Brasil. Foram escolhidas 30 marcas diferentes de requeijão cremoso, sendo 26 marcas com requeijão em embalagens de copos plásticos de 180 ou 200 g, e 4 marcas com requeijão em embalagem de bisnagas de 250 ou 400g. Foram adquiridas 3 replicatas de cada marca, totalizando 90 replicatas, e estas foram classificadas em cinco grupos distintos, conforme sua composição: Tradicional, Light, Vegano, Fibras e Zero Lactose.

### 4.2. Métodos

## 4.2.1. Análises por RMN no Domínio do Tempo

Primeiramente, foram realizadas as análises por RMN no domínio do tempo das 90 amostras, no espectrômetro Spinlock, de 8 MHz, com sonda de 10 cm de diâmetro (Figura 14 – A). Essas análises foram realizadas diretamente nas embalagens comerciais usando as sequências de pulsos CPMG e CWFP-T<sub>1</sub>. Além disso, antes e depois das análises, a temperatura das amostras foi aferida, para se certificar que a variação de temperatura não foi maior que 1 °C.

As medições de CPMG foram realizadas com as seguintes condições: largura de pulso de 90 ° igual a 33  $\mu$ s,  $\tau$  = 500  $\mu$ s, número de ecos de 1000, o tempo de aquisição de 256  $\mu$ s, 16 scans e tempo de espera de 5 s. Para as medidas de CWFP-T<sub>1</sub>, a largura do pulso de 90 ° foi igual a 33  $\mu$ s,  $\tau$  = 300  $\mu$ s, número de ecos de 3000, o tempo de aquisição de 64  $\mu$ s, 16 scans e tempo de espera de 1 s. O ajuste de fase dos sinais CPMG e CWFP-T1 foi realizado no software NTNMR da TecMag, onde o sinal real foi ajustado para o máximo, e o sinal imaginário para o mínimo.

Em seguida as embalagens foram abertas, e cerca de 0,5 g de cada tipo de requeijão (em triplicata) foi analisada no aparelho de RMN-DT Minispec ND Mq-20 de 20 MHz (Figura 14 – B). Também foram utilizadas as sequências de pulso CPMG, para medida de T<sub>2</sub>, e a sequência CWFP-T<sub>1</sub>, para medida de T<sub>1</sub>. Antes das análises, foi utilizado um banho termoestático, para que as amostras estivessem em temperatura ambiente, de 25 °C.

No Minispec ND mq-20, as medições de CPMG foram realizadas com as seguintes condições: largura do pulso de 90 ° igual a 19,32  $\mu$ s,  $\tau$  = 300  $\mu$ s, número de ecos de 20000, o tempo de aquisição de 50  $\mu$ s, 16 scans e tempo de espera de 3 s. Para as medições de CWFP-T<sub>1</sub>, a largura do pulso de 90 ° foi igual a 19,32  $\mu$ s,  $\tau$  = 300  $\mu$ s, número de ecos de 30000, o tempo de aquisição de 100  $\mu$ s, 64 scans e tempo de espera de 0,1 s.

Figura 14 - Equipamentos utilizados: A) Spinlock de 8Hz e B) Minispec ND mq-20 de 20Hz.

A)

B)



# 4.2.2. Análises químicas:

# 4.2.2.1. Determinação do teor de umidade

Para determinar a umidade, os requeijões foram abertos, congelados e colocados em um liofilizador por 10 dias. O teor de umidade foi calculado em porcentagem da massa perdida, segundo a Equação 16:

$$\text{Umidade}(\%) = \left[\frac{(\text{massa da amostra úmida-massa da amostra seca})}{\text{massa da amostra úmida}}\right] \times 100$$
(16)

Após a liofilização confirmou-se que a amostra não tinha mais umidade usando secagem em estufa a 105º C por 1 hora.

# 4.2.2.2. Determinação do teor de gordura

Para extração de gordura, foi utilizada a técnica de Soxhlet, método 032/IV descrito pelo Instituto Adolfo Lutz, utilizando 200 mL de éter de petróleo e 5 g da amostra. Foi utilizado um sistema de extração Soxhlet, permitindo extrair cinco amostras ao mesmo

tempo. Foram utilizados cartuchos de filtro de papel para a pesagem e para inserir a amostra dentro do sistema de extração. Ao final da extração, os cartuchos de filtro de papel foram retirados, e colocados em uma estufa a 105 °C por uma hora para evaporar o éter de petróleo. A massa de gordura extraída foi calculada pela diferença entre a massa da amostra antes e depois da extração. A porcentagem de gordura em base seca foi calculada pela Equação 17:

Gordura em base seca (%) = 
$$\frac{(\text{massa de gordura extraída}) \times 100}{\text{massa da amostra antes da extração}}$$
 (17)

Para calcular o teor de gordura em base úmida, foi utilizada a Equação 18:

Gordura em base úmida (%) = (Teor de gordura em base seca)x(Massa seca) (18)

E o valor da massa seca foi calculado pela Equação 19:

Massa seca (%) = 
$$1 - \text{Teor de umidade (%)}$$
 (19)

#### 4.3. Programas utilizados para os ajustes multiexponenciais

Para realizar os ajustes mono e biexponencial foi utilizado o programa Origin, versão 9.0. Os espectros da distribuição de  $T_2$  e  $T_1$  foram feitos utilizando um algoritmo da Transformada Inversa de Laplace (ILT) desenvolvido no software Origin, versão 9.0. (MORAES, T. B.; 2021).

#### 4.4. Análise quimiométrica

Para as análises de Análise de Componentes Principais (PCA) e Análise de Agrupamentos Hierárquicos (HCA) foram realizadas no programa MATLAB R2021a (The Mathworks Inc., Natick, MA, EUA) e o PLS\_Toolbox v.8.8 (Eigenvector Research Inc., Wenatchee, WA, EUA). Para a Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS) foi utilizado o software comercial The Unscrambler X (Camo Analytics Inc., Oslo, Noruega, 2019).

Antes das análises quimiométricas serem realizadas, foi realizado um préprocessamento nas matrizes dos dados de RMN-DT e das análises químicas. Os decaimentos de RMN-DT foram centrados na média, enquanto que os dados químicos foram autoescalados.

Para a avaliação dos modelos, foram analisados os valores de erro quadrático médio de calibração (RMSEC – *Root Mean Square Error of Calibration*), erro quadrático médio de validação cruzada (RMSECV – *Root Mean Square Error of Cross Validation*) e os respectivos valores dos coeficientes de correlação. O número de Variáveis Latentes utilizado foi 7. O cálculo dos valores de RMSEC e RMSECV são mostrados, respectivamente, nas Equações 20 e 21:

$$RMSEC = \sqrt[2]{\left(\frac{\sum_{i=1}^{N} (y_{ref} - y_{pred})^2}{N_c}\right)}$$
(20)

$$RMSECV = \sqrt[2]{\left(\frac{\sum_{i=1}^{N} (y_{ref} - y_{pred})^2}{N_{CV}}\right)}$$
(21)

onde N se refere ao número do conjunto de amostras do modelo (de calibração ou validação cruzada), y<sub>ref</sub> ao valor de referência do parâmetro estudado, e y<sub>pred</sub> ao valor predito pelo modelo para o parâmetro estudado, em determinada amostra.

#### 5. Resultados e Discussões

Dentre as 30 amostras (que em triplicata, totalizam 90 amostras) de requeijão cremoso utilizadas nesse trabalho, 18 amostras foram requeijão do tipo tradicional que é o requeijão padrão de cada fabricante, sem propriedade nutricional específica. Alguns desses requeijões continham condimentos como alho, ervas, essências etc. Os outros requeijões com propriedades nutricionais especifica foram 6 do tipo light, com baixo teor de energia por unidade de massa, 3 do tipo zero lactose, com ausência desse açúcar do leite e consumido por pessoas com intolerância à lactose, 2 do tipo vegano, para pessoas que não consome produtos de origem animal e 1 que tem fibras vegetais (que não são absorvidas pelo organismo) adicionadas e auxiliam no trânsito intestinal. De acordo com o rótulo, os dois requeijões veganos foram produzidos a base de soja.

Na Figura 15 está um diagrama com a sequência e os tipos de análises que foram realizadas nesse trabalho. Depois da realização das análises de RMN-DT nos espectrômetros Spinlock e no Minispec ND Mq-20, o restante de cada requeijão foi desidratado para a determinação da umidade, do teor de gordura e massa seca desengordurada, e em seguida foram realizadas as análises estatísticas, análises quimiométricas (PCA, HCA e PLS-R) e as análises multiexponenciais discretas e contínuas (por meio da Transformada Inversa de Laplace).

Apesar das análises por RMN-DT diretamente nas embalagens terem sido as primeiras a serem realizadas, os resultados das análises por via úmida, processados com métodos estatísticos univariados e multivariados serão apresentados primeiramente, para a caracterização dos requeijões por métodos padrões.

Figura 15 - Diagrama com a sequência e os tipos de análises realizadas.



# 5.1. Análise da composição básica dos requeijões.

Na Tabela 1 estão as médias ( $\overline{x}$ ) e o coeficiente de variação (CV) das porcentagens de umidade, gordura em base úmida (b.u.) e massa seca desengordurada (b.u.) e gordura em base seca (b.s.) das 30 marcas de requeijões do tipo tradicional, light, zero lactose e vegano. As amostras que estão destacadas em cinza, têm ao mesmo tempo alta umidade (acima de 66,76 %) e baixo teor de gordura em base úmida (menor que 13 %). Como podese ver nessa tabela, a umidade teve um CV abaixo de 10% para as amostras tradicional, light e vegano e de mais de 41% para os com zero lactose. Os outros 3 parâmetros só não tiveram CV acima de 10% para as duas amostras de vegano. Os CV acima de 10% indicam uma grande variação dentro dos resultados das análises. Tabela 1 - Valores de porcentagens de umidade, gordura (bu) e massa seca desengordurada (b.u.) e gordura (b.s.), médias ( $\overline{x}$ ) e coeficiente de variação (CV).

Amostra	Umidado	Gordura	Massa seca	Gordura	
Amostra	Unituatie	(b.u.)	desengordurada (b.u.)	(b.s.)	
Tradicional 1	59,74	25,18	15,08	62,54	
Tradicional 2	60,54	23,11	16,35	58,57	
Tradicional 3	63,43	22,84	13,73	62,46	
Tradicional 4	61,35	23,92	14,73	61,89	
Tradicional 5	66,67	22,73	10,60	68,20	
Tradicional 6	60,73	27,00	12,27	68,76	
Tradicional 7	60,18	26,78	13,05	67,24	
Tradicional 8	59,70	27,38	12,92	67,93	
Tradicional 9	57,40	27,67	14,93	64,96	
Tradicional 10	66,69	20,21	13,10	60,68	
Tradicional 11	63,40	21,52	15,08	58,80	
Tradicional 12	62,51	21,84	15,65	58,25	
Tradicional 13	62,07	22,16	15,77	58,43	
Tradicional 14	63,49	19,47	17,04	53,32	
Tradicional 15	71,13	9,87	19,00	34,19	
Tradicional 16	62,20	23,75	14,05	62,82	
Tradicional 17	63,94	26,38	9,68	73,15	
Tradicional 18	65,31	22,52	12,18	64,90	
Média	62,96	22,96	14,35	60,84	
CV	4,9	18,0	15,8	13,8	
Light 1	70,72	11,98	17,29	40,93	
Light 2	73,47	9,87	16,66	37,22	
Light 3	66,76	12,86	20,38	38,68	
Light 4	70,87	11,21	17,93	38,46	
Light 5	72,12	15,05	12,83	53,99	
Light 6	71,50	12,43	16,07	43,61	
Média	70,91	12,23	16,86	42,15	
CV	2,9	10,5	13,4	13,5	
Zero Lactose 1	60,60	27,32	12,08	69,35	
Zero Lactose 2	70,78	13,08	16,14	44,76	
Zero Lactose 3	77,49	11,41	11,10	50,67	
Média	69,62	17,27	13,11	54,93	
CV	12,21	50,63	20,39	23,37	
Vegano 1	57,67	30,23	12,10	71,41	
Vegano 2	58,57	27,54	13,89	66,47	
Média	58,12	28,88	13,00	68,94	

CV	0,77	4,6	6,8	3,6	
Fibras 1	65,86	16,69	17,44	48,90	
No Figure 10 estão es histographico de umidado ganduno (h.u.) massos e					

Na Figura 16 estão os histogramas da umidade, gordura (b.u.), massa seca desengordurada (b.u.) e gordura (b.s.) onde cada barra equivale a um intervalo de 2,99 e o número do eixo x equivale ao valor inicial usado em cada faixa. A maioria (19) das amostras tem umidade entre 57 e 65,99% correspondente em sua maioria os requeijões tradicionais. A umidade da maioria das amostras Light está na faixa de 60 a 71,99. A maioria das amostras tem gordura (b.u.) entre 21 e 29,99%, e a massa seca desengordura (b.u.) entre 12 e 17,99 e da gordura (b.s.) entre 58 e 72,99%.

Figura 16 - Histogramas da (a) umidade, (b) gordura (b.u.), (c) massa seca desengordurada (b.u.) e (d) gordura (b.s.) onde cada barra equivale a um intervalo de 2,99 e o número do eixo x o valor inicial usado em cada faixa.



A portaria 359 de 04 de setembro de 1997 do Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) determina que o requeijão cremoso deve ter no mínimo 55g de gordura (em 100 g em extrato seco) e em relação à umidade, deve ter no máximo 65 g/100g. Pode-se observar na Tabela 1 que, quatro dos requeijões tradicionais estudados estão com teores de umidade acima do máximo estipulado, enquanto dois estão com teores de gordura abaixo do estipulado.

No caso do requeijão light, a portaria 27 do Ministério da Saúde de 13 de janeiro de 1998, estabelece que para um produto seja considerado light, tem que ter uma redução de no mínimo 25% do teor de gordura e diferença mínima de 3g/100g em relação ao produto tradicional. Como pode-se ver na Tabela 1, todos os requeijões light tem cerca de 50% menos gordura que os produtos tradicionais, portanto, atendem o que foi estabelecido pela portaria.

Nos requeijões do tipo light, pode-se também observar que com exceção da amostra 3, todos outros cinco tem umidade acima de 70%. O uso de maior teor de água (zero caloria) para produtos light tem sido uma estratégia para reduzir a energia por massa em outros produtos como no caso de geleias, onde o produto tradicional tem cerca de até 40% de água e o light acima de 60% (SANTOS, P. M; COLNAGO, L. A., 2018). No caso de requeijão cremoso light, a redução do teor de gordura leva ao aumento da massa seca desengordurada, o que favorece interações proteína-proteína, o que leva a uma matriz de caseína muito rígida, resultando em um produto de textura firme e com menor cremosidade. Assim, aumentar a umidade tem sido uma estratégia simples para reduzir o teor de massa seca desengordurada, e restaurar a cremosidade perdida devido a redução do teor de gordura (SILVA et al, 2013). Outra estratégia encontrada pela indústria de alimentos, é utilizar o Concentrado Proteico do Soro (CPS), como substituto parcial da gordura, já que o mesmo apresenta diversas vantagens como possuir aminoácidos essenciais, apresentar viscosidade adequada, e não interferir negativamente no sabor do produto final. Além disso, a substituição da gordura pelo CPS deve vir associada com o aumento da umidade do requeijão, para a melhoria da textura do produto final (SILVA et al, 2012). Já os requeijões zero lactose e com fibras são produtos onde a lactose foi eliminada, e fibras não digeríveis foram adicionadas, respectivamente.

Também foram feitas análises multivariadas dos dados de umidade, gordura (b.u.) e massa seca desengordurada (b.u.) dos requeijões com o método exploratório de Análise Componentes Principais (PCA), e Analise de Agrupamento Hierárquico (HCA). A Figura 17 mostram os gráficos dos scores e pesos, obtidos com a PCA usando o componente principal 1 (PC1) e o componente principal 2 (PC2), respectivamente. O PC1 e PC2 correspondem a cerca de 89,72 e 10,28 %, ou seja, esses dois PCs representam a variância total dos dados. No gráfico de scores (pontos vermelhos, verdes, azuis escuros e azuis claros) observa-se que todas as amostras do grupo light se agruparam na parte mais negativa da PC 1 junto com a amostra tradicional 15 e duas amostras de zero lactose (2 e 3). A maioria das amostras dos requeijões tradicionais ficaram na parte positiva do PC1, junto com as duas amostras dos veganos e a zero lactose 1.

No gráfico de pesos (pontos roxos) mostra como cada variável contribui para a separação das amostras no gráfico de scores. Como pode-se ver pelo gráfico de pesos, a umidade e o teor de óleo foram os principais fatores que separaram as amostras em valores negativos e positivos de PC1, respectivamente. No PC1 mais negativo estão as amostras que tem ao mesmo tempo alta umidade (maior que 66,67%) e baixo teor de gordura (menor que 13%), como pode-se ver nas linhas marcadas com fundo cinza na Tabela 1. Já no PC1 positivo, estão as amostras com baixa umidade (menor que 66,69%) e alto teor de óleo (maior que 19,45%).

Figura 17 - Gráfico duplo com os scores e pesos obtidos com PCA dos dados de umidade, gordura (b.u.) e massa seca desengordurada (b.u.) dos requeijões da Tabela 1, divididos em grupos Tradicional, (azul) Light (vermelho), Vegano (rosa), Zero Lactose (verde) e fibras (preto) e o respetivo gráfico de pesos (roxo).



Um padrão similar foi observado quando aos dados da Tabela 1 foram processados com o método de análise de agrupamentos hierárquicos (HCA). Todos os processamentos de HCA, usando as distancias de Malahanobis separam muito bem os requeijões light, e outros com alta umidade e baixo teor de óleo (amostras com fundo cinza na Tabela 1) dos veganos e zero lactose e tradicionais, com baixa umidade e alto óleo. Na Figura 18, está o dendograma do HCA, utilizando a distância Mahalanobis, que apresentou separação em dois grandes grupos muito similar a observada no gráfico de scores PC1 positivo e negativo do PCA. No menor agrupamento, em verde, estão as 6 amostras light, 2 tradicionais (14 e 15), a de fibras e duas de zero lactose (2 e 3). A amostra de fibras e a tradicional que ficam no menor agrupamento são as duas amostras na Figura 23, no PC1 entre – 0,05 e -0.01.

Figura 18 - Dendograma obtido com dos dados de umidade, gordura (b.u.) e massa seca desengordurada (b.u.) dos requeijões da Tabela 1, obtido com HCA com distancia Malahanobis.



Dessa forma observa-se, que podem ocorrer variações significativas entre a umidade, gordura (b.u.) e massa seca desengordurada (b.u.) mesmo entre amostras do mesmo tipo de requeijão. Isso se deve a diferentes fontes das matérias primas, diferentes processos de fabricação ou característica (cremosidade) desejada pelo fabricante. E por isso, o agrupamento das amostras, para as outras análises (RMN-DT) serão baseadas na

umidade, gordura (base úmida), massa seca desengordurada (b.u.) e gordura (base seca), e não necessariamente por conta do tipo de requeijão.

## 5.5. Análises por RMN-DT

As amostras de requeijão foram analisadas com as sequências de pulsos CPMG e CWFP-T<sub>1</sub>, em dois equipamentos de RMN de baixo campo denominados de Spinlock e Minispec. Depois das análises com as sequências de pulsos CPMG e CWFP-T<sub>1</sub> os dados foram processados usando análise multiexponencial discreta com ajuste mono, bi e triexponencial, e análise multiexponencial contínua utilizando a transformada inversa de Laplace (ILT) e análise com métodos quimiométricos, PCA e PLS-R.

Na Figura 19 estão os sinais CPMG, relativo ao T<sub>2</sub>, das amostras embaladas, obtidas com o espectrômetro Spinlock 8 MHz, e estão separadas de acordo como tipo de requeijão: a) tradicional, b) light, c) zero lactose e d) vegano e com fibras (sinal em azul). Como podese ver nessas figuras, mesmo dentro de cada tipo de requeijão, os sinais CPMG mostram um decaimento muito diferentes entre as amostras o que reflete a variação na umidade, teor de gordura e massa seca desengordura conforme Tabela 1. Figura 19 - Sinais CPMG obtidos no Spinlock das amostras separadas em grupos, sendo a) tradicional, b) light, c) zero lactose e d) vegano e com fibras (sinal em azul).



Um resultado muito similar foi obtido com a sequência CPMG quando as amostras dos requeijões foram analisadas no Minispec de 20 MHz, como mostrado na Figura 20. As amostras estão separadas nos mesmos grupos: a) tradicional, b) light, c) zero lactose e d) vegano e com fibras (sinal em azul). As diferenças podem ser atribuídas ao tamanho das amostras, a largura do pulso que foram mais de 10 vezes mais longas no Spinlock do que no Minispec, entre outros fatores.

Figura 20 - Sinais CPMG obtidos no Minispec das amostras separadas em grupos, sendo a) tradicional, b) light, c) zero lactose e d) vegano e com fibras (sinal em azul).



Nas Figuras 21 e 22 estão os sinais CWFP-T<sub>1</sub>, relativo ao T<sub>1</sub>, analisadas nos espectrômetros Spinlock e Minispec, respectivamente e separadas de acordo como tipo de requeijão: a) tradicional, b) light, c) zero lactose e d) vegano e com fibras (sinal em azul). Como pode-se ver nessas figuras, assim como nos sinais CPMG, houve variação significativa entre as amostras, mesmo dentro de um grupo, refletindo a variação na umidade, teor de gordura e massa seca desengordura conforme Tabela 1. Pode-se notar ao se comparar os CPMG e CWFP-T<sub>1</sub>, é que o sinal T<sub>1</sub> tem uma constante de tempo bem mais longa que o T<sub>2</sub>, o que se deve aos diferentes mecanismos de relaxação que governam o T<sub>1</sub> e T<sub>2</sub>. Em alguns tipos de amostras, como carnes, por exemplo, o T<sub>1</sub> chega ser 10 vezes T<sub>2</sub>.

Figura 21 - Sinais CWFP-T<sub>1</sub> obtidos no Spinlock das amostras separadas em grupos, sendo a) tradicional, b) light, c) zero lactose e d) vegano e com fibras (sinal em azul).



Figura 22 - Sinais CWFP-T<sub>1</sub> obtidos no Minispec das amostras separadas em grupos, sendo a) tradicional, b) light, c) zero lactose e d) vegano e com fibras (sinal em azul).



Para determinar os valores de T<sub>1</sub> e T<sub>2</sub> dos sinais CPMG e CWFP-T<sub>1</sub> foram usados ajuste multiexpeonenciais discretos e contínuos.

# 5.5.1. Análises multiexponenciais discretas e contínuas dos dados CPMG e CWFP-T<sub>1</sub>.

Nas Figuras 23a e b estão os decaimentos e a recuperação dos sinais CPMG e CWFP-T<sub>1</sub> do Spinlock, respectivamente, de uma das replicatas das amostras Tradicional 12, Zero Lactose 1 e Light 6. Nos sinais CPMG, a amostra zero lactose (vermelho) possui um decaimento mais lento, seguido da amostra tradicional e light em relação às outras duas no CPMG. Já nos sinais CWFP-T<sub>1</sub>, a amostra zero lactose apresentou recuperação mais rápida, o que mostra que essa amostra possui maior teor de gordura ou que a água presente na amostra possui menor mobilidade. Os componentes com maiores concentrações no requeijão, são a gordura e a água. Dessa forma, esses componentes influenciarão significativamente nos sinais de CPMG e CWFP-T<sub>1</sub>.

Esse resultado está dentro do esperado, uma vez que a amostra de requeijão light deve possuir teor de gordura menor em relação à uma amostra de requeijão tradicional. No trabalho de FERRÃO et al (2017) também foi observado que as amostras de requeijão com menores teores de gordura apresentaram menores valores do T<sub>2</sub>.

Figura 23 - a) Decaimento exponencial da técnica CPMG e b) recuperação exponencial dos sinais das amostras Tradicional 12 (preto), Zero Lactose 1 (vermelho) e Light 6 (azul) adquiridos diretamente nas embalagens lacradas.



Além dessa análise visual, os valores dos tempos de relaxação dessas curvas podem ser determinados usando métodos multiexponenciais discretos e/ou métodos multiexponenciais contínuos (com transformada inversa de Laplace – ILT).

Na determinação multiexponencial discreta os dados podem ser ajustados com funções mono, bi e triexponenciais. Nesse tipo de determinação, o operador fornece o número de funções exponenciais a ser usado no ajuste. Para decidir qual é o melhor número de funções exponenciais a ser usado, pode-se avaliar o resíduo do ajuste, que é a diferença entre o ajuste exponencial ou o coeficiente de determinação do ajuste (r<sup>2</sup>). No caso do resíduo procura-se obter um sinal que só contenha ruído e no caso do r<sup>2</sup> o valor mais próximo de 1. O método dos mínimos quadrados é usado para encontrar o melhor ajuste para a curva de acordo com o número de exponenciais.

Na Figura 24a estão o decaimento exponencial do sinal CPMG de uma amostra de requeijão e os ajustes mono e biexponencial. Na Figura 24b estão os respectivos resíduos dos ajustes monoexponencial (em preto) e biexponencial (em vermelho) dos sinais da Figura 24a. No ajuste monoexponencial pode-se ver que há uma pequena diferença ente o ajuste e o decaimento CPMG. Essa diferença entre o ajuste e o sinal pode ser melhor visto no sinal preto no gráfico do resíduo (Figura 24b). Esse gráfico de resíduo mostra que ainda parte do sinal que não foi ajustada uma vez que há componentes com intensidade bem maior que o ruído.

Já no ajuste biexponencial desse mesmo sinal (na Figura 24a) não se observa uma diferença significativa entre o decaimento CPMG e o ajuste. No gráfico de resíduos (sinal vermelho) pode-se ver que ainda ficou um pequeno sinal um pouco acima do ruído. Foram realizadas tentativas de ajuste triexponencial, mas os resultados não convergiram e resultou em erro de ajuste. O valor de r<sup>2</sup> não se mostrou muito eficiente para decidir qual o melhor número de exponenciais, pois os valores de r<sup>2</sup> do ajuste mono e biexponenciais foram de 0,998 e 0,999, respectivamente.

Figura 24 - a) Decaimento exponencial do sinal CPMG de uma amostra de requeijão e os ajustes mono e biexponencial. b) Gráfico de resíduos dos ajustes monoexponencial (em preto) e biexponencial (em vermelho) dos sinais da Figura 30a.



Na Tabela 2 estão os valores de T<sub>2</sub>, para as amostras da Figura 23a (sinais CPMG), que são Tradicional 12, Zero Lactose 1 e Light 6, obtidos com o ajuste monoexponencial, além dos valores de T<sub>21</sub> e T<sub>22</sub>, e de suas áreas A<sub>1</sub> e A<sub>2</sub>, obtidos com o ajuste biexponencial. As constantes A<sub>1</sub> e A<sub>2</sub> são as intensidades dos ajustes de cada sinal.

Tabela 2 - Valores de T <sub>2</sub> e su	las áreas obtidos	s com os ajuste	s monoexponenciais	e biexponenciais
das amostras Tradicional 12	Zero Lactose 2 e	e Light 6.		

Amostras	Ajuste mono	Ajuste biexponencial				
	T₂(ms)	T <sub>21</sub> (ms)	T <sub>22</sub> (ms)	<b>A</b> 1	A <sub>2</sub>	
Tradicional 12	44,7	53,6	16,4	71,34	28,66	
Zero Lactose 1	48,2	57,7	15,6	72,28	27,72	
Light 6	39,2	45,4	17,1	75,49	24,51	

Os ajustes monoexponenciais mostram que o os requeijões Tradicional 12 e Zero Lactose 1 são similares e que o Light 6 é uma amostra com relaxação bem diferente. Além disso, no caso das intensidades de cada ajuste monoexponencial, o requeijão light novamente foi o que mais se diferenciou dos outros dois. Já no ajuste biexponencial é possível observar que os valores de T<sub>21</sub>, 53,6, 57,7 e 45,4 ms das amostras Tradicional 12,

Zero Lactose 1 e Light 6 são mais dispersos do que no caso do ajuste monoexponencial e dos valores de  $T_{22}$ , que são similares para as três amostras. Esses valores estão próximos dos valores de  $T_2$  obtidos com o ajuste monoexponencial, 44,7, 48,2 e 39,2 ms, respectivamente para as amostras Tradicional 12, Zero Lactose 1 e Light 6.

Também foi realizada a análise dos sinais de decaimento CPMG com a Transformada Inversa de Laplace (ILT). Os espectros da distribuição de T<sub>2</sub> foram feitos utilizando um algoritmo da Transformada Inversa de Laplace, desenvolvido no software Origin (MORAES, T. B.; 2021). Na Figura 25, estão os espectros da distribuição dos valores de T<sub>2</sub> nas amostras Tradicional 12, Zero Lactose 1 e Light 6.

Figura 25 - Espectros de distribuição dos tempos de relaxação T<sub>2</sub> obtidos das amostras Tradicional 12 (preto), Zero Lactose 1 (vermelho) e Light 6 (azul).



Tabela 3 - Valores de T<sub>2</sub> e suas áreas obtidos com a ILT dos sinais das amostras Tradicional 12, Zero Lactose 2 e Light 6.

Amostras	T <sub>21</sub> (ms)	T <sub>22</sub> (ms)	<b>A</b> 1	A <sub>2</sub>
Tradicional 12	4,74	46,74	26,26	73,74
Zero Lactose 1	6,65	51,71	22,36	77,64
Light 6	2,81	39,85	3,39	96,61

É possível observar que os tempos de relaxação, obtidos com a Transformada Inversa de Laplace foram dois valores de  $T_2$ , o  $T_{21}$  e  $T_{22}$ , que estão um pouco abaixo dos valores dos ajustes biexponenciais discretos da Tabela 2, para ambos os tempos das amostras Tradicional 12, Zero Lactose 1 e Light 6.

Assim como foi feito para os sinais CPMG, na Tabela 4 estão os valores de T<sub>1</sub>, para as amostras da Figura 23b (sinais CWFP-T<sub>1</sub>), que são Tradicional 12, Zero Lactose 1 e Light 6, obtidos com o ajuste monoexponencial, além dos valores de T<sub>11</sub> e T<sub>12</sub>, e de suas áreas A<sub>1</sub> e A<sub>2</sub>, obtidos com o ajuste biexponencial.

Tabela 4 -	Valores d	e T₁ e suas	áreas o	obtidos	com os	ajustes	monoex	ponenciais	e biexp	onenciai	s
dos sinais	CWFP-T <sub>1</sub>	das amostr	as Trac	dicional	12, Zer	o Lactos	e 2 e Lig	ht 6.			

Amostras	Ajuste mono	Ajuste biexponencial				
	T₁(ms)	T₁₁ (ms)	T <sub>12</sub> (ms)	<b>A</b> 1	A <sub>2</sub>	
Tradicional 12	261,9	73,6	314,1	27,18	72,82	
Zero Lactose 1	272,3	73,1	346,2	33,05	66,95	
Light 6	305,1	87,0	331,6	13,42	86,58	

Os ajustes monoexponenciais mostram novamente similaridade entre os requeijões Tradicional 12 e Zero Lactose 1, enquanto que o Light 6 apresentou uma relaxação e os valores de áreas bem diferentes dos demais. Já no ajuste biexponencial é possível observar que os valores  $T_{11}$ , ficaram bastante próximos entre si. Além disso, os valores de  $T_{12}$ , 314,1, 346,2 e 331,6 ms das amostras Tradicional 12, Zero Lactose 1 e Light 6 são os que estão mais próximos dos valores de  $T_1$  obtidos com o ajuste monoexponencial, 261,9, 272,3 e 305,1 ms, respectivamente para as amostras Tradicional 12, Zero Lactose 1 e Light 6.

Também foi realizada a análise dos sinais de decaimento CWFP-T<sub>1</sub> com a Transformada Inversa de Laplace (ILT). Na Figura 26, estão os espectros da distribuição dos valores de T<sub>1</sub> nas amostras Tradicional 12, Zero Lactose 1 e Light 6.

Figura 26 - Espectros de distribuição dos tempos de relaxação T<sub>1</sub> obtidos dos sinais CWFP-T<sub>1</sub> das amostras Tradicional 12 (preto), Zero Lactose 1 (vermelho) e Light 6 (azul).



Tabela 5 - Valores de T<sub>1</sub> e suas áreas obtidos com a ILT dos sinais CWFP-T<sub>1</sub> das amostras Tradicional 12, Zero Lactose 2 e Light 6 usando a ILT.

Amostras	T₁1 (ms)	T <sub>12</sub> (ms)	<b>A</b> 1	A <sub>2</sub>
Tradicional 12	54,93	307,39	18,44	81,56
Zero Lactose 1	46,59	289,07	25,98	74,02
Light 6	25,26	308,77	6,49	93,51

É possível observar que, os tempos de relaxação, obtidos com a Transformada Inversa de Laplace foram dois valores de T<sub>1</sub>, o T<sub>11</sub> e T<sub>12</sub>, e que, assim como nos sinais CPMG, são mais baixos que os valores obtidos o ajuste biexponencial discreto da Tabela 4 para ambos os tempos das amostras Tradicional 12, Zero Lactose 1 e Light 6.

Na Tabela 6 estão todos os valores de  $T_{21}$  e  $T_{22}$  obtidos com ajuste biexponencial de uma das replicatas das amostras, e suas respectivas amplitudes. Enquanto na Tabela 7, estão os valores de  $T_{11}$  e  $T_{12}$ , obtidos com o ajuste biexponencial de uma das replicatas das amostras, e respectivas amplitudes. Os valores destacados em cinza, são as amostras que apresentaram valores iguais de  $T_{11}$  e  $T_{12}$ .

Amostras	T <sub>21</sub>	T <sub>22</sub>	<b>A</b> <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>
Fibras 1	27,03	54,42	0,663	0,329
Light 1	22,28	48,00	0,190	0,764
Light 2	29,34	56,47	0,452	0,535
Light 3	26,55	54,43	0,654	0,327
Light 4	27,34	65,15	0,717	0,251
Light 5	21,41	83,31	0,101	0,820
Light 6	23,59	47,62	0,248	0,713
Tradicional 1	23,41	71,89	0,490	0,500
Tradicional 2	19,28	47,76	0,261	0,708
Tradicional 3	23,92	69,55	0,327	0,658
Tradicional 4	18,71	53,61	0,172	0,768
Tradicional 5	33,44	96,30	0,261	0,715
Tradicional 6	27,10	60,98	0,326	0,656
Tradicional 7	18,87	60,49	0,166	0,775
Tradicional 8	25,22	54,40	0,332	0,647
Tradicional 9	22,42	52,67	0,255	0,714
Tradicional 10	32,44	79,22	0,239	0,730
Tradicional 11	25,31	55,03	0,496	0,497
Tradicional 12	21,32	55,60	0,214	0,747
Tradicional 13	22,18	50,82	0,325	0,654
Tradicional 14	24,73	49,31	0,554	0,442
Tradicional 15	26,31	57,76	0,584	0,412
Tradicional 16	32,17	73,96	0,255	0,714
Tradicional 17	24,67	90,09	0,210	0,753
Tradicional 19	21,38	52,76	0,197	0,756
Vegano 1	31,32	94,87	0,270	0,706
Vegano 2	31,83	97,43	0,250	0,726
Zero Lactose 1	21,44	60,15	0,199	0,761
Zero Lactose 2	25,43	52,98	0,668	0,315
Zero Lactose 3	13,37	26,32	0,712	0,296

Tabela 6 - Valores de  $T_{21}$  e  $T_{22}$  em ms e suas respectivas amplitudes obtidos com ajuste biexponencial.

Amostras	<b>T</b> <sub>11</sub>	<b>T</b> <sub>12</sub>	<b>A</b> <sub>1</sub>	<b>A</b> <sub>2</sub>
Fibras 1	79,48	231,40	0,211	0,736
Light 1	71,53	313,70	0,164	0,771
Light 2	73,57	309,81	0,131	0,783
Light 3	72,36	280,26	0,171	0,763
Light 4	79,75	295,58	0,143	0,775
Light 5	378,17	378,17	0,472	0,472
Light 6	87,01	331,62	0,092	0,804
Tradicional 1	130,25	295,47	0,307	0,597
Tradicional 2	69,15	285,56	0,302	0,663
Tradicional 3	77,70	371,43	0,270	0,703
Tradicional 4	76,79	342,63	0,379	0,603
Tradicional 5	51,33	365,97	0,071	0,796
Tradicional 6	69,53	324,74	0,197	0,723
Tradicional 7	78,01	358,90	0,353	0,617
Tradicional 8	74,15	238,18	0,365	0,608
Tradicional 9	68,63	300,88	0,267	0,695
Tradicional 10	342,08	342,08	0,451	0,451
Tradicional 11	71,57	321,04	0,355	0,612
Tradicional 12	73,61	314,14	0,224	0,731
Tradicional 13	74,07	305,80	0,167	0,734
Tradicional 14	73,14	297,10	0,209	0,742
Tradicional 15	77,55	308,50	0,128	0,788
Tradicional 16	305,03	305,03	0,461	0,461
Tradicional 17	66,79	474,09	0,140	0,741
Tradicional 18	75,43	359,84	0,150	0,776
Vegano 1	76,53	328,39	0,260	0,712
Vegano 2	87,40	320,13	0,318	0,654
Zero Lactose 1	73,06	346,23	0,288	0,683
Zero Lactose 2	72,96	303,82	0,163	0,771
Zero Lactose 3	99,91	492,28	0,202	0,744

Tabela 7 - Valores de  $T_{11}$  e  $T_{12}$  em ms e suas respectivas amplitudes obtidos com ajuste biexponencial.

Na Tabela 8, estão os valores de correlação entre os tempos de relaxação ( $T_{12}$ ,  $T_{21}$  e  $T_{22}$  obtidos com o ajuste biexponencial e presentes nas Tabelas 6 e 7) e os parâmetros químicos (teores de umidade, gordura em base seca, gordura em base úmida e massa seca desengordurada, presentes na Tabela 1).

	Umidade (%)	Gordura em base seca (%)	Gordura em base úmida (%)	Massa Seca Desengordurada (%)
		(70)	(70)	(70)
T <sub>12</sub>	0,30248	0,25990	0,01605	-0,66361
<b>T</b> <sub>21</sub>	-0,11938	0,04027	0,08636	0,03121
T <sub>22</sub>	-0,31295	0,46478	0,42986	-0,42459

Tabela 8 - Valores de correlação entre os tempos de relaxação e os parâmetros físico-químicos.

Na Figura 27 estão os gráficos de correlações entre o  $T_{22}$  e os parâmetros químicos, umidade, gordura (b.u.), massa seca desengordura (b.u.) e gordura (b.s.), e na Figura 28 estão os gráficos de correlações entre o  $T_{21}$  e os parâmetros químicos.

Figura 27 - Gráficos de correlação entre  $T_{22}$  e os parâmetros físico-químicos: (a) teor de umidade, (b) teor de gordura em base seca, (c) teor de gordura em base úmida, (d) teor de massa seca desengordurada.





Figura 28 - Gráficos de correlação entre  $T_{12}$  e os parâmetros físico-químicos: (a) teor de umidade, (b) teor de gordura em base seca, (c) teor de gordura em base úmida, (d) teor de massa seca desengordurada.

Em relação a umidade, obteve-se correlação fraca e negativa (r = -0.3) com T<sub>22</sub>, e correlação fraca e positiva (r = 0.3) com T<sub>21</sub>. Correlações fracas e positivas foram observadas com os teores de gordura em base seca (r~0,46 para T<sub>22</sub> e r~0.26 para T<sub>21</sub>) e em base úmida (r~0,4 para T<sub>22</sub> e r~0.02 para T<sub>21</sub>). E uma correlação negativa (r = -0,42 para T<sub>22</sub> e r = -0.66 para T<sub>21</sub>) com o teor de massa seca desengordura. Como pode-se ver nesses gráficos e pela Tabela 8, praticamente não houve correlação entre os valores de T<sub>22</sub> e T<sub>21</sub> e esses parâmetros químicos. Como não se obteve boas correlações com os parâmetros químicos nas análises utilizando os métodos univariados, analisou-se também os dados de RMN-DT com métodos multivariados ou quimiométricos.

# 5.6. Análises dos dados de CPMG e CWFP-T<sub>1</sub> por métodos quimiométricos

## 5.6.1. Análise de Componentes Principais (PCA) dos dados CPMG

Primeiramente, foram analisadas as similaridades entre as três replicatas das 30 marcas de amostras de requeijão analisadas nos equipamentos Spinlock e Minispec. Todos os dados utilizados foram centrados na média.

A matriz X dos dados CPMG do Spinlock ficou com 90 amostras e 998 dados. Na Figura 29, são apresentados os gráficos de scores entre PC1 e PC2 dos dados de CPMG adquiridos no Spinlock que juntas representam 99,6 % da variância dos dados. Na letra a, as amostras foram divididas em 5 grupos, Fibras (preto), Tradicional (azul), Light (vermelho), Vegano (rosa) e Zero Lactose (verde). Na letra b, as amostras foram divididas em 2 grupos, o grupo A (preto) com alto teor de umidade e baixos teores de gordura, e grupo B (vermelho) com baixo teor de umidade e altos teores de gordura. Na Figura 29, é possível observar que nos dois gráficos, não houve separação significativa entre as amostras.

Figura 29 - Gráficos de scores dos dados de CPMG obtidos no Spinlock das 30 marcas de amostras de requeijão: a) amostras separadas nos grupos Fibras (preto), Tradicional (azul), Light (vermelho), Vegano (rosa) e Zero Lactose (verde). b) Amostras separadas em grupo A (preto) e grupo B (vermelho).



Também foi realizada a mesma análise para os dados de CPMG obtidos com outro equipamento, o Minispec. A matriz X dos dados CPMG do Minispec ficou com 90 amostras

e 19977 dados. Na Figura 30, são apresentados os gráficos de scores entre PC1 e PC2 dos dados de CPMG adquiridos no Minispec, que juntas representam 99,8 % da variância dos dados. É possível observar que, assim como nas PCAs do Spinlock, também não houve separação significativa entre os grupos nos dois gráficos.

Figura 30 - Gráfico de scores dos dados de CPMG para as 30 marcas de amostras de requeijão analisados no Minispec: a) amostras separadas nos grupos Fibras (preto), Tradicional (azul), Light (vermelho), Vegano (rosa) e Zero Lactose (verde). b) Amostras separadas em grupo A (preto) e grupo B (vermelho).



Como pode-se ver nesses gráficos de escores não houve separação clara entre os tipos de requeijões e pelo teor de gordura e umidade.

# 5.6.2. Análise de Componentes Principais (PCA) dos dados CWFP-T<sub>1</sub>

Assim como nos dados de CPMG, também foi utilizada a Análise de Componentes Principais (PCA) nos dados de CWFP-T<sub>1</sub>, para observar as similaridades entre as três replicatas de cada marca das amostras de requeijão. Os dados foram centrados na média. A matriz X dos dados CWFP-T<sub>1</sub> do Spinlock ficou com 90 amostras e 3000 dados. Na Figura 31, é apresentado o gráfico de scores entre PC1 e PC2 que juntas representam 98 % da variância dos dados. Para os dados de CWFP-T<sub>1</sub> no Spinlock, assim como no caso dos dados de CPMG, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos de amostras nos dois gráficos.

Figura 31 - Gráfico de scores dos dados de CWFP-T<sub>1</sub> para as 30 marcas de amostras de requeijão analisados no Spinlock: a) amostras separadas nos grupos Fibras (preto), Tradicional (azul), Light (vermelho), Vegano (rosa) e Zero Lactose (verde). b) Amostras separadas em grupo A (preto) e grupo B (vermelho).



Também foi realizada a mesma análise para os dados de CWFP-T<sub>1</sub> obtidos com o Minispec. A matriz X dos dados CPMG do Minispec ficou com 90 amostras e 29926 dados. Na Figura 32, são apresentados os gráficos de scores entre PC1 e PC2 dos dados de CWFP-T<sub>1</sub> adquiridos no Minispec que juntas representam 27,8 % da variância dos dados. É possível observar que também não houve separação significativa entre os grupos nos dois gráficos.





# 5.6.3. Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-R) dos dados de CPMG e CWFP-T1

Foi realizada uma regressão multivariada com o método de mínimos quadrados parciais (PLS) relacionando os dados de CPMG e CWFP-T<sub>1</sub> com os dados de teores de umidade, gordura em base seca e em base úmida e de massa seca desengordurada.

Na Figura 33 são mostrados os gráficos de correlações dos valores de referência (obtidos com métodos padrão) e os valores preditos pelo modelo para os teores de umidade (A), de gordura em base seca (B) e em base úmida (C) e massa seca desengordurada (D) com os dados CPMG, obtidos com o equipamento Spinlock. As amostras de requeijão apresentaram coeficientes de determinação  $r^2 = 0.55171$  para umidade,  $r^2 = 0.69609$  para gordura em base seca,  $r^2 = 0.66163$  para gordura em base úmida e  $r^2 = 0.66299$  para massa seca desengordurada.

Na Figura 34, são mostrados os gráficos de correlação dos valores de referência e valores preditos dos teores de umidade (A), de gordura em base seca (B) e em base úmida (C) e massa seca desengordurada (D) com os dados CWFP-T<sub>1</sub>, também obtidos com o Spinlock. Os valores de coeficiente de determinação foram  $r^2 = 0.92829$  para umidade,  $r^2 = 0.96049$  para gordura em base seca,  $r^2 = 0.86367$  para gordura em base úmida e  $r^2 = 0.78148$  para massa seca desengordurada.

Figura 33 - Gráficos de correlação entre os valores de teor de referência e teor preditos pelo modelo PLS para os teores de umidade (A), de gordura em base seca (B) e em base úmida (C) e massa seca desengordurada (D) com os dados CPMG, obtidos pelo Spinlock.



Figura 34 - Gráficos de correlação entre os valores de teor de referência e teor preditos pelo modelo PLS para os teores de umidade (A), de gordura em base seca (B) e em base úmida (C) e massa seca desengordurada (D) com os dados CWFP-T<sub>1</sub>, obtidos pelo Spinlock.



Também foram feitas análises com os dados CPMG e CWFP-T<sub>1</sub> obtidos com o Minispec. Na Figura 35, são mostrados os gráficos de correlação dos valores de referência e valores preditos dos teores de umidade (A), de gordura em base seca (B) e em base úmida (C) e massa seca desengordurada (D) com os dados CPMG. Os valores dos coeficientes de determinação foram r<sup>2</sup> = 0.82206 para umidade, r<sup>2</sup> = 0.95887 para gordura em base seca, r<sup>2</sup> = 0.96462 para gordura em base úmida e r<sup>2</sup> = 0.65052 para massa seca desengordurada.

Figura 35 - Gráficos de correlação entre os valores de teor de referência e teor preditos pelo modelo PLS para os teores de umidade (A), de gordura em base seca (B) e em base úmida (C) e massa seca desengordurada (D) com os dados CPMG, obtidos pelo Minispec.



Na Figura 36, são mostrados os gráficos de correlação os gráficos de correlação dos valores de referência e valores preditos dos teores de umidade (A), de gordura em base seca (B) e em base úmida (C) e massa seca desengordurada (D) com os dados CWFP-T<sub>1</sub>. Os valores dos coeficientes de determinação foram  $r^2 = 0.87687$  para umidade,  $r^2 = 0.98257$  para gordura em base seca,  $r^2 = 0.9873$  para gordura em base úmida e  $r^2 = 0.91822$  para massa seca desengordurada.

Figura 36 - Gráficos de correlação entre os valores de teor de referência e teor preditos pelo modelo PLS para os teores de umidade (A), de gordura em base seca (B) e em base úmida (C) e massa seca desengordurada (D) com os dados CWFP-T<sub>1</sub>, obtidos pelo Minispec.



É possível observar que, para todos os gráficos, os valores de correlação foram maiores entre os teores de gordura em base seca, em comparação com a base úmida. Isso ocorreu porque as extrações Soxhlet para determinação de gordura foram realizadas com as amostras liofilizadas. Porém, também é importante realizar os gráficos de correlação dos teores de gordura em base úmida, uma vez que a água é componente importante e deve ser considerada durante as análises de PLS.

Nas Tabelas 9 e 10, são mostrados, respectivamente, os valores de coeficientes de correlação (r<sup>2</sup>) e, RMSEC e RMSECV obtidos com as análises de regressão por mínimos quadrados parciais. Os valores de r<sup>2</sup> expressam a correlação em uma escala positiva, entre 0 e 1. Enquanto que os valores de RMSEC e RMSECV, expressam a dispersão das medidas de calibração e validação cruzada das amostras.
Parâmetros	CPMG Spinlock		CWFP-T <sub>1</sub> Spinlock		CPMG Minispec		CWFP-T <sub>1</sub> Minispec	
químicos								
	Calibração	Validação	Calibração	Validação	Calibração	Validação	Calibração	Validação
		Cruzada		Cruzada		Cruzada		Cruzada
Umidade	0,55171	0,30460	0,92829	0,60225	0,82206	0,20413	0,87687	0,74827
Gordura em	0,69609	0,50136	0,96049	0,49599	0,95887	0,51811	0,98257	0,88431
base seca								
Gordura em	0,66163	0,41124	0,86367	0,47049	0,96462	0,35074	0,98730	0,83166
base úmida								
Massa seca	0,66299	0,61969	0,78148	0,56753	0,65052	0,64586	0,91822	0,72059
desengordurada								

Tabela 9 - Valores de r<sup>2</sup> dos modelos de calibração e validação cruzada obtidos com as análises de PLS-R com os dados de RMN-DT.

Parâmetros	CPMG		CWFP-T <sub>1</sub>		CPMG		CWFP-T <sub>1</sub>	
químicos	Spinlock		Spinlock		Minispec		Minispec	
	RMSEC	RMSECV	RMSEC	RMSECV	RMSEC	RMSECV	RMSEC	RMSECV
Umidade	0,0637	0,0804	0,0156	0,0356	0,0248	0,0468	0,0198	0,0285
Gordura em base seca	0,0637	0,0804	0,0293	0,0874	0,0310	0,0801	0,0181	0,0425
Gordura em base úmida	0,0377	0,0488	0,0267	0,0489	0,0177	0,0513	0,0997	0,0997
Massa seca desengordurada	0,0144	0,0154	0,0125	0,0176	0,0147	0,0151	0,0086	0,0138

Tabela 10 - Valores de RMSEC e RMSECV obtidos com as análises de PLS-R com os dados de RMN-DT.

Analisando os modelos de calibração, é possível observar que as correlações obtidas nas análises de PLS-R foram moderadas ou altas, em todos os gráficos, para os teores de umidade, gordura em base seca e em base úmida, e massa seca desengordurada. Além disso, também é importante destacar que o número alto de Variáveis Latentes (igual a 7), pode causar um sobreajuste dos dados. Porém, é necessário analisar os valores de RMSEC para avaliar o modelo usado para predizer os teores físico-químicos das amostras.

Comparando as sequências de pulso utilizadas no Spinlock, é possível observar, nas Tabelas 9 e 10, que a sequência CWFP-T<sub>1</sub> apresentou maiores valores de correlação, e menores valores de RMSEC em todos os parâmetros químicos, em relação a CPMG. Enquanto que, comparando as sequências utilizadas no Minispec, a CWFP-T<sub>1</sub> apresentou maiores valores de correlação em todos os parâmetros, e menores valores de erros em quase todos os parâmetros, com exceção para o teor de gordura em base úmida, que apresentou RMSEC igual a 0,0997.

Comparando os equipamentos utilizando a sequência CPMG, é possível observar que o Minispec, apresentou maiores valores de correlação, e menores valores de RMSEC em quase todos os parâmetros, com exceção para a massa seca desengordurada, em que apresentou valor de correlação igual a 0,65052 e RMSEC igual a 0,0147.

Comparando os equipamentos, utilizando a sequência CWFP-T<sub>1</sub>, o Minispec apresentou maiores valores de correlação em quase todos os parâmetros, com exceção da umidade, em que apresentou valor de correlação igual a 0,87687. Além disso, o Spinlock apresentou menores valores de RMSEC para umidade e gordura em base úmida, que foram respectivamente, 0,0156 e 0,0267. Enquanto que o Minispec apresentou os menores valores de RMSEC para gordura em base seca e massa seca desengordurada, que foram respectivamente, 0,0181 e 0,0086. Outro ponto importante, é que não foram observadas diferenças significativas nas análises ao utilizar as embalagens termosseladas com selo de alumínio, o que mostra que o método não é influenciado pelo mesmo. Analisando os modelos de calibração cruzada, que também foram obtidos por meio das análises de regressão por mínimos quadrados parciais, é possível observar que os coeficientes r<sup>2</sup> apresentaram valores de correlação baixos até altos, enquanto que os valores de RMSECV foram bastante baixos, até 9,97 %.

Comparando as sequências no Spinlock, observou-se que a sequência CWFP-T<sub>1</sub>, apresentou maiores valores de correlação para todos parâmetros químicos, com exceção para massa seca desengordurada; além disso, esta mesma sequência apresentou maiores valores de RMSECV para todos os parâmetros químicos, com exceção para umidade. Enquanto que no Minispec, a sequência CWFP-T<sub>1</sub> apresentou os maiores valores de correlação, para todos os parâmetros estudados; além disso apresentou menores valores de RMSECV para todos os parâmetros parâmetros, com exceção para a gordura em base úmida.

Comparando os equipamentos ao utilizar a sequência CPMG, o Minispec apresentou maiores valores de correlação para gordura em base seca e massa seca desengordurada; além disso, apresentou menores valores de RMSECV com exceção para a gordura em base úmida. Ao utilizar sequência CWFP-T<sub>1</sub>, o Minispec apresentou os maiores valores correlação para todos os parâmetros; além de apresentar os menores valores de RMSECV, com exceção para a gordura em base úmida.

Dessa forma, tanto o modelo de calibração quanto o de validação cruzada apresentaram boas correlações entre os valores medidos por meio de análises químicas e os valores medidos pelos modelos.

## 6. Conclusões

Com base nos resultados, é possível concluir que os requeijões cremosos apresentaram composição química bastante diversa, mesmo comparando amostras do mesmo tipo de requeijão cremoso. As análises dos sinais CPMG e CWFP-T1 com a ILT (Transformada Inversa de Laplace), também apresentaram dois valores para  $T_2$  e  $T_1$ , o que mostra que esse método possui a vantagem de não ser necessário determinar previamente um número de exponenciais, porém os valores foram menores que os obtidos com os ajustes biexponenciais,

Nas análises por PCA, ao utilizar os dados de RMN-DT, as amostras de requeijão não tiveram separação significativa entre os tipos de requeijão, nem entre a sua composição química. Já nas análises por PLS, foi possível utilizar as sequências de RMN-DT, juntamente com métodos de análise multivariada, para determinar parâmetros químicos específicos em requeijões cremosos, com valores baixos, moderados e altos de correlação, e com baixos valores de erros. Além disso, a técnica de RMN-DT, possibilita que os requeijões sejam analisados rapidamente, e diretamente nas embalagens comerciais, podendo ser usada como um método para fazer triagem de produtos em pontos de vendas e verificar se os valores determinados estão de acordo com os valores constantes no rótulo dos produtos.

## 7. Referências Bibliográficas

AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHIMIDELL, W,; LIMA, U. A. Biotecnologia industrial: biotecnologia na produção de alimentos. São Paulo: **Edgard Blücher**, 2001. v. 4

AZEREDO, R. B. V.; COLNAGO, L. A.; ENGELSBERG, M. Quantitative analysis using steady-state free precession nuclear magnetic resonance. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 72, n. 11, p. 2401-2405, 2000.

AZEREDO, R. B. V.; COLNAGO, L. A.; SOUZA, A. A.; ENGELSBERG, M. Continuous wave free precession – practical analytical tool for low-resolution nuclear magnetic resonance measurements. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 478, n. 2, p. 313-320, 2003.

ANDRADE, F. D.; MARCHI NETTO, A.; COLNAGO, L. A. Use of carr-purcell pulse sequence with low refocusing flip angle to measure  $T_1$  and  $T_2$  in a single experiment. **Journal of Magnetic Resonance**, San Diego, v. 214, p. 184-188, 2012.

ANDRADE, F. D. Desenvolvimento de sequências de pulso de eco de spin de baixa potência para RMN *on-line*. Orientador: Luiz Alberto Colnago, 2011. 97 f. **Tese (Doutorado em Química Analítica)**, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

BALDISSERA, A. F.; EINLOFT, S.; FRADETA, S. Synthesis and nmr characterization of aliphatic-aromatic copolyesters by reaction of poly(ethylene

terephthalate) post-consumer and poly(ethylene adipate). **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n.2, p. 188-191, 2005.

BELITZ, H. D.; GROSCH, W.; SCHIERBELE, P. **Food chemistry**. 4. ed. Berlim: Springer, 2009.

BELSITO, P. C.; CAPPATO, L. P.; CAVALCANTI, R. N.; VIDAL, V. A. S.; PIMENTEL, T. C.; ESMERINO, E. A.; BALTHAZAR, C. F.; CUCINELLI NETO, R. P.; TAVARES, M. I. B.; ZACARCHENCO, P. B.; FREITAS, M. Q.; SILVA, M. C.; RAICES, R. S. L.; PASTORE, G. M.; POLLONIO, M. A. R.; CRUZ, A. G. Manufacture of requeijão cremoso processed cheese with galactooligosaccharide. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 174, p. 869-875, 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 146 de 07 de março de 1996. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos.** Diário Oficial, Brasília, 11 de março, 1996, p.3977-3978.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Portaria n°. 359 de 04 de setembro de 1997. **Regulamento técnico para Fixação de Identidade e Qualidade do Requeijão.** Diário Oficial da União, Brasília, DF, 08 set.1997, Seção 1, p.19.690.

BRADFORD, R.; CLAY, C.; STRICK, E. A steady-state transient technique in nuclear induction. **Physical Review**, New York, v. 84, n. 1, p. 157-158, 1951.

BUDIMAN, M.; STROSHINE, R. L.; CORNILLON, P. Moisture measurement in cheese analogue using stretched and multiexponential models of the magnetic resonance T<sub>2</sub> relaxation curve. **Journal of Dairy Research**, Oxford, v. 69, p. 619-632, 2002.

CARR, H. Y. Steady-State free precession in nuclear magnetic resonance. **Physical Review Letters**, New York, v. 1, n. 11, p. 429-430, 1958.

CARR, H. Y.: PURCELL E. M. Effects of diffusion on free precession in nuclear magnetic resonance experiments. **Physical Review.** New York, v. 94, p. 630-38, 1954.

CAVALLI, A.; SALVATELLA, X.; DOBSON, C. M.; VENDRUSCOLO, M. Protein structure determination from NMR chemical shifts. **PNAS – Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.** Washington, v. 104, n. 23, p. 9615–9620, 2007.

CHEN, L.; LIU, H. Effect of emulsifying salts on the physicochemical properties of processed cheese made from mozzarella. **Journal of Dairy Science.** New York, v. 95, p. 4823-4830, 2012.

CLARIDGE, T. D. W. High-resolution NMR: techniques in organic chemistry. 2 ed. Oxford: **Elsevier**, 2009. p. 25-26.

COLNAGO, L. A.; ANDRADE, F. D. RMN no domínio do tempo: fundamentos e aplicações offline e inline. biotecnologia aplicada à agro&indústria. São Paulo: **Blucher**, 2017. v. 12, p. 439-470.

COLNAGO, L. A.; AZEREDO, R. B. V.; SOUZA, A. A.; ENGELSBERG, M. Aplicações da espectroscopia de rmn (cwfp) na medida de umidade em sementes e grãos. São Carlos: **Embrapa Instrumentação Agropecuária**, 2002. (Circular Técnica 14).

CORRÊA, C. C.; FORATO, L. A.; COLNAGO, L. A. High-throughput non-destructive nuclear magnetic resonance method to measure intramuscular fat content in beef. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 393, p. 1357-1360, 2009.

COUTINHO, I. D.; HENNING, L. M. M.; DÖPP, S. A.; NEPOMUCENO, A.; MORAES, L. A. C.; MARCOLINO GOMES, J.; RICHTER, C.; SCHWALBE, H.; COLNAGO, L. A. Identification of primary and secondary metabolites and transcriptome profile of soybean tissues during different stages of hypoxia. **Data in Brief**, Amsterdam, v. 21, p. 1089-1100, 2018.

DRUNKLER, D. A. Produção de requeijão cremoso simbiótico. Orientador: Georges Kaskantzis Neto. 2009. 178 f. **Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos)**, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

FERRÃO, L. L.; FERREIRA, M. V. S.; CAVALCANTI, R. N.; CARVALHO, A. F. A.; PIMENTEL, T. C.; SILVA, R.; ESMERINO, E. A.; CUCINELLI NETO, R. P.; TAVARES, M. I. B.; FREITAS, M. Q.; MENEZES, J. C. V.; CABRAL, L. M.; MORAES, J.; SILVA, M. C.; MATHIAS, S. P.; RAICES, R. S. L.; PASTORE, G. M.; CRUZ, A. G. The xylooligosaccharide addition and sodium reduction in requeijão cremoso processed cheese. **Food Research International**, Oxford, v. 107, p. 137-147, 2018.

FERREIRA, M. M. C.; ANTUNES, A. M.; MELGO, M. S.; VOLPE, P. L. O. Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**, São Paulo, v. 22, n. 5, p. 724-731, 1999.

GIL, V. M. S.; GERALDES, C. F. G. C. Ressonância magnética nuclear: fundamentos, métodos e aplicações. Lisboa: **Fundação Calouste Gulbenkian**, 1987, p 39-62.

GOMES, R. A. R.; PITHAN SILVA, R. O.; VAN DENDER, A. G. F.; ZACARCHENCO, P. B. O setor de produtos lácteos. *In*: ZACARCHENCO, P. B.; VAN DENDER, A. G. F.; REGO, R. A. (Org.). Brasil Dairy Trends 2020 - Tendências do Mercado de Produtos Lácteos. **ITAL – Instituto de Tecnologia em Alimentos**: Campinas, 2017, v. 1, Cap. 1, p. 11-45.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Métodos físico-químicos para análise de alimentos: 023. 4. ed. Brasília: **ANVISA**; 2005.

SOUZA, A. A.; BARBOSA, L. L.; COLNAGO, L. A.; AZEREDO, R. B. V. Fundamentos de RMN em Baixo Campo e Aplicações. *In*: LACERDA JR, V.; BEATRIZ, A. (Org.). Fundamentos de espectrometria e aplicações. **Atheneu**: Rio de Janeiro, 2017. v. 1, Cap. 7, p. 234-247.

HAHN, E. L. Spin echos. Physical Review, New York, v. 80, p. 580-594, 1950.

MAHER, A. D.; ROCHFORT, S. J. Applications of nmr in dairy research. **Metabolites**. v. 4, 131-141, 2014.

MCDONALD, P. J.; MITCHELL, J.; MULHERON, M.; MONTEILHET, L.; KORB, J. P. Two-dimensional correlation relaxation studies of cement pastes. **Magnetic Resonance Imaging,** New York, v. 25, p. 470–473, 2007.

MEIBOOM, S.; GILL, D. Modified spin-echo method for measuring nuclear relaxation times. **Review of Scientific Instruments,** New York, Vol. 29, p. 688-91, 1958.

MOHNKE, O.; YARAMANCI, U. Pore size distributions and hydraulic conductivities of rocks derived from magnetic resonance sounding relaxation data using multiexponential decay time inversion. **Journal of Applied Geophysics**, Amsterdam, v. 66, p. 73–81, 2008.

MOITA NETO, J. M.; MOITA, G. C. Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados. **Química Nova**, São Paulo, v. 21, n. 6, p. 467-469, 1998.

MONARETTO, T. Desenvolvimento e aplicações de sequências de pulsos CWFP com alternância de fase em RMN no domínio do tempo. Orientador: Luiz Alberto Colnago. 2015. 77 p. **Dissertação (Mestrado em Físico-Química)**, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

MONARETTO, T.; ANDRADE, F. D.; MORAES, T. B.; SOUZA, A. A.; DE AZEVEDO, E. R.; COLNAGO, L. A. On resonance phase alternated CWFP sequences for rapid and simultaneous measurement of relaxation times. **Journal of Magnetic Resonance**, San Diego, v. 259, p. 174-178, 2015.

MORAES, T. B. Transformada inversa de Laplace para análise de sinais de ressonância magnética nuclear de baixo campo. **Química Nova**, São Paulo, v. 44, p. 1020-1027, 2021.

MORAES, T. B.; COLNAGO, L. A. Simulation of NMR signals through the Bloch equations. **Química Nova**, São Paulo, v. 36, p. 1410-1416, 2014.

MORAES, T.B.; COLNAGO, L.A. Noninvasive analyses of food products using lowfield time-domain nmr: a review of relaxometry methods. **Brazilian Journal of Physics**, São Paulo, 52, 43, 2022.

MORAES, T. B.; MONARETTO, T.; COLNAGO, L. A. Rapid and simple determination of t<sub>1</sub> relaxation times in time-domain nmr by continuous wave free precession sequence. **Journal of Magnetic Resonance**, San Diego, v. 270, p. 1-6, 2016.

NASCIMENTO, P. A. M.; BARSANELLI, P. L.; REBELLATO, A. P.; ALLONE, J. A. L.; COLNAGO, L. A.; PEREIRA, F. M. V. Time-domain nuclear magnetic resonance (td-nmr) and chemometrics for determination of fat content in commercial products of milk powder. **Journal Of AOAC International**, Cary, v. 100, p. 330-334, 2017.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. Introduction to spectroscopy a guide for students of organic chemistry. 3. ed. Austrália: **Brooks/Cole Thomson** Learning, 2001. p. 101-102.

PEDERSEN, H. T.; MUNCK, L.; ENGELSEN, S. B. Low-field <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance and chemometrics combined for simultaneous determination of water, oil, and protein contents in oilseeds. **Journal of the American Oil Chemists' Society.** Oxford, v. 77, p.1069-1077, 2000.

PEREIRA, F. M. V.; CARVALHO, A. S.; CABEÇA, L. F.; COLNAGO, L. A. Classification of intact fresh plums according to sweetness using time-domain nuclear magnetic resonance and chemometrics. **Microchemical Journal**. Philadelphia, v. 108, p. 14–17, 2013.

PICCOLO, K. C. Avaliação do efeito da enzima transglutaminase no processo de produção de requeijão cremoso. Orientador: Eliana Paula Ribeiro. 2006. 116 p. **Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos)**, Centro Universitário Instituto Mauá. São Caetano do Sul (SP), 2006.

RAPACCI, M. Estudo comparativo das características físicas, químicas, reológicas e sensoriais do requeijão cremosos obtido por fermentação láctica e acidificação direta. Orientador: Ariene Gimenez Fernandes Van Dender, 1997. **Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos)**, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1997.

SALOMONSEN, T.; SEJERSEN, M. T.; VIERECK, N.; IPSEN, R.; ENGELSEN, S. B. Water mobility in acidified milk drinks studied by low-field <sup>1</sup>H NMR. **International Dairy Journal**, Oxford, v. 17, p. 294, 2007.

SANTANA, F.; SOUZA, A.; ALMEIDA, M.; BREITKREITZ, M.; FILGUEIRAS, P.; SENA, M.; POPPI, R. Experimento didático de quimiometria para classificação de óleos vegetais comestíveis por espectroscopia de infravermelho médio combinado com análise discriminante por mínimos quadrados parciais: um tutorial, parte v. **Química Nova**, São Paulo, v. 43, p. 371-381, 2020.

SANTOS, P. M.; PEREIRA FILHO, E. R.; COLNAGO, L. A. Detection and quantification of milk adulteration using time domain nuclear magnetic resonance (TD-NMR). **Microchemical Journal**, Philadelphia, v. 124, p. 15-19, 2016.

SANTOS, P. M.; KOCK, F. V. C.; SANTOS, M. S.; LOBO, C. M. S.; CARVALHO, A. S.; COLNAGO, L. A. Non-invasive detection of adulterated olive oil in full bottles using time-domain nmr relaxometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 28, p. 385-390, 2017.

SILVA, G.; SILVA, A. M. A. D.; FERREIRA, M. P. B. Produção alimentícia: processamento de leite. Pernambuco: **E-Tec/mec**, 2012. 172 p.

SILVA, R. C. S. N.; MINIM, V. P. R.; SIMIQUELI, A. A.; MINIM, L. A. Influence of fat and moisture content in the processing of light requeijão. **Journal of Food Research**, Richmond Hill, v. 2, p. 12-23, 2013.

SILVA, R. C. S. N.; MINIM, V. P. R.; VIDIGAL, M. C. R. T.; TEIXEIRA, J. A.; MORAES, L. E. S.; LIMA, L. P.; MINIM, L. A. Teor de gordura e de água: fatores determinantes na textura e na aceitabilidade de requeijão *light*. **Revista Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo, v. 71, p.118-126, 2012.

TELLIER, C.; MARIETTE, F.; GUILLEMENT, J. P.; MARCHAL, P. Evolution of water proton nuclear magnetic relaxation during milk coagulation and syneresis: structural implications. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 41, n. 12, p. 2259-2266, 1993.

VENANCIO, T.; ENGELSBERG, M.; AZEREDO, R.; LEM, N.; COLNAGO, L. Fast and simultaneous measurement of longitudinal and transverse NMR relaxation times in a single continuous wave free precession experiment. **Journal of Magnetic Resonance.** San Diego, v. 173, n. 1, p. 34-39, 2005.

VIDAL, A. M. C.; SARAN NETTO, A. Obtenção e processamento do leite e derivados. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo: Pirassununga, v. 1. 220 p. 2018. Disponível em: http://www.livrosabertos.sibi.usp.br/portaldelivrosUSP/catalog/download/200/181/85 0?inline=1. Acesso em: 07/01/2021. DOI: 10.11606/9788566404173.

ZACARCHENCO, P. B.; VAN DENDER, A. G. F.; SPADOTI, L. M. Requeijão culinário - aspectos históricos, de mercado e tecnológicos. **Indústria de Laticínios**, São Paulo, v. XVII, n. 96, p. 70-74, 2012.