ProDOP Serra da Estrela

Proteção, Promoção e Potencialização do Queijo Serra da Estrela

Entregável 1.4

Relatório Técnico: Metodologia de prova de origem de queijo Serra da Estrela por espectroscopia de infravermelho

Parceiros envolvidos na tarefa 1.4	Associação BLC3 – Campus de Tecnologia e Inovação (responsável)
Data de Início da Tarefa 1.4	01 de novembro de 2018
Data de Conclusão da Tarefa 1.4	31 de outubro de 2022

Índice

Índice de Figuras 3

Índice de Tabelas 6

Introdução 8

Execução da tarefa 10

Bibliografia 50

Índice de Figuras

Figura 1. Espectro de infravermelho de amostra Lb1 (leite de ovelha 'Bordaleira Serra da Estrela'). Azul-Região I; rosa- Região II; verde- Região III. 14

Figura 2. Comparação de espectro de infravermelho das amostras de leite de ovelha 'Bordaleira Serra da Estrela': amostra Lb1, Lb2, Lb3. Azul-Região I; rosa- Região II; verde- Região III. 14

Figura 3. Comparação do espectro de infravermelho das amostras de leite de ovelha 'Bordaleira Serra da Estrela' (Lb1) e leite de cabra (Lc). Azul-Região I; rosa- Região II; verde- Região III. 15

Figura 4. Comparação de espectro de infravermelho das amostras de leite de ovelha 'Bordaleira Serra da Estrela' (Lb1) com leite de cabra (Lc) e leite de vaca (Lv). Azul-Região I; rosa- Região II; verde- Região III. 17

Figura 5. Espectro de infravermelho do leite de ovelha da raça 'Assaf'. Azul - região I; Laranja - região II; Verde - região III. 19

Figura 6. Comparação de espectro de infravermelho das amostras de leite de ovelha 'Assaf', indivíduo 1, 2, 3. Verde (indivíduo 1); rosa (indivíduo 2); azul (indivíduo 3). Azul - região I; Laranja - região II; Verde- região III. 20

Figura 7. Espectro de infravermelho do leite de ovelha da raça 'Lacaune'. Azul - região I; Laranja - região II; Verde - região III. 21

Figura 8. Comparação de espectro de infravermelho das amostras de leite de ovelha 'Lacaune'; indivíduo 1, 2, 3. Verde (indivíduo 1); Rosa (indivíduo 2); Azul (indivíduo 3). Azul - região I; Laranja - Região II; Verde - Região III. 21

Figura 9. Comparação de espectro de infravermelho das amostras de leite de ovelha 'Lacaune' (azul) e 'Assaf' (preto). Azul - região I; Laranja - região II; Verde - região III. 22

Figura 10. Comparação de espectro de infravermelho das amostras de leite de ovelha de 'Bordaleira Serra da Estrela' (azul); leite de 'Assaf' (rosa); leite de 'Lacaune' (preto). Azul - região I; Laranja - região II; Verde - região III. 24

Figura 11. Espectro de infravermelho de amostra QOC1 (Queijo de ovelha curado). Azul-Região I; rosa Região II; verde- Região III. 27

Figura 12. Comparação das amostras: queijo de ovelha curado (azul) *vs*. queijo de mistura (preto). Azul-Região I; rosa- Região II; verde- Região III. 28

Figura 13. Comparação das amostras: queijo de vaca (azul) *vs*. queijo ovelha (preto). Azul-Região I; rosa- Região II; verde- Região III. 29

Figura 14. Comparação das amostras: queijo de ovelha curado (azul) *vs.* queijo cabra (preto).30

Figura 15. Espectro de infravermelho de amostra DOP1 (queijo de ovelha Serra da Estrela de certificação DOP (empresa Vale de Estrela). Azul-Região I; rosa- Região II; verde- Região III.... 32

Figura 16. Comparação das amostras: queijo de ovelha Serra da Estrela de certificação DOP da empresa Vale de Estrela (azul) *vs.* queijo da queijaria artesanal Paulo Rogério (preto). Azul-Região I; rosa- Região II; verde- Região III. 33

Figura 17. Comparação das amostras: queijo de ovelha Serra da Estrela de certificação DOP da empresa Vale de Estrela (azul) *vs.* queijo queijaria dos Lobos (preto). Azul-Região I; rosa- Região II; verde- Região III. 35

Figura 18. Comparação das amostras: queijo de ovelha Serra da Estrela de certificação DOP da empresa Vale de Estrela (azul) *vs* queijo da empresa Maratona de Delícias de Alvoco das Várzeas (preto). Azul-Região I; rosa- Região II; verde- Região III. 36

Figura 19. Comparação das amostras: Queijo Serra da Estrela DOP (azul); Queijo de ovelha curado (queijaria artesanal Paulo Rogério) (rosa); Queijo de ovelha curado (queijaria dos Lobos) (amarelo); Queijo de ovelha curado (empresa Maratona Delícias, Alvoco das Várzeas) (vermelho). Azul-Região I; rosa- Região II; verde- Região III. 37

Figura 20. Comparação das amostras: queijo de ovelha Serra da Estrela de certificação DOP da empresa Vale de Estrela (azul) *vs.* queijo de mistura produzido através de leite de ovelha, cabra e vaca (Continente, SONAE) (preto). Azul-Região I; rosa- Região II; verde- Região III. 38

Figura 21. Comparação das amostras: queijo de ovelha Serra da Estrela de certificação DOP da empresa Vale de Estrela (azul) *vs.* queijo de vaca (Queijos Tavares, S.A., região Seia) (preto). Azul-Região I; rosa- Região II; verde- Região III. 40

Figura 22. Comparação das amostras: ovelha Serra da Estrela de certificação DOP (azul) *vs*. queijo cabra (preto). 41

Figura 23. Comparação das amostras: ovelha Serra da Estrela de certificação DOP (azul) *vs.* queijo de ovelha desta região (Queijos Tavares, S.A., região de Seia) (preto). 42

Figura 24. Inserção de nova amostra na plataforma web. 43

Figura 25. Inserção de dados na plataforma web. 43

Índice de Tabelas

Tabela 1. Base de requisitos para a conceção de desenvolvimento da plataforma web 11

Tabela 2. Comparação das amostras: leite de ovelha 'Bordaleira Serra da Estrela' *vs*. leite de cabra, em função das zonas discriminantes do espectro: Região I; Região II; Região III[1] ([1]Intensidade de banda: p-pequena, m-média, g-grande)..... 16

Tabela 3. Comparação das amostras: leite de ovelha 'Bordaleira Serra da Estrela' *vs*. leite de cabra e de vaca, em função das zonas discriminantes do espectro: Região I; Região II; Região III. 17

Tabela 4. Comparação das amostras: leite de ovelha 'Lacaune' e 'Assaf', em função das zonas discriminantes do espectro: Região I; Região II; Região III[1] 23

Tabela 5. Comparação das amostras: leite de ovelha 'Bordaleira Serra da Estrela' *vs.* leite ovelha 'Lacaune' e 'Assaf', em função das zonas discriminantes do espectro: Região I; Região II; Região III[1]..... 24

Tabela 6. Comparação das amostras: queijo de ovelha curado *vs.* queijo de mistura, em função das zonas discriminantes do espectro: Região I; Região II; Região III[1]..... 28

Tabela 7. Comparação das amostras: queijo de ovelha curado *vs* queijo de vaca, em função das zonas discriminantes do espectro: Região I; Região II; Região III[1] 29

Tabela 8. Comparação das amostras: queijo de ovelha curado *vs* queijo de cabra, em função das zonas discriminantes do espectro: Região I; Região II; Região III[1]..... 30

Tabela 9. Comparação das amostras: queijo de ovelha Serra da Estrela de certificação DOP da empresa Vale de Estrela *vs*. queijo da queijaria artesanal Paulo Rogério, em função das zonas discriminantes do espectro: Região I; Região II; Região III[1] (Woodcock *et al*., 2008) 34

Tabela 10. Comparação das amostras: queijo de ovelha Serra da Estrela de certificação DOP da empresa Vale de Estrela *vs.* queijo da queijaria dos Lobos, em função das zonas discriminantes do espectro: Região I; Região II; Região III[1] (Woodcock *et al*., 2008)..... 35

Tabela 11. Comparação das amostras: queijo de ovelha Serra da Estrela de certificação DOP da empresa Vale de Estrela *vs*. queijo da empresa Maratona de Delícias de Alvoco das Várzeas, em função das zonas discriminantes do espectro: Região I; Região II; Região III[1] (Woodcock *et al*., 2008)..... 36

Tabela 12 - Comparação das amostras: queijo de ovelha Serra da Estrela de certificação DOP da empresa Vale de Estrela *vs.* queijo de mistura (Continente, SONAE), em função das zonas discriminantes do espectro: Região I; Região II; Região III[1] (Woodcock *et al*., 2008) 38

Tabela 13. Comparação das amostras: queijo de ovelha Serra da Estrela de certificação DOP da empresa Vale de Estrela *vs.* queijo de vaca (Queijos Tavares, S.A., região Seia), em função das zonas discriminantes do espectro: Região I; Região II; Região III[1] (Woodcock *et al*., 2008) 40

Tabela 14. Comparação das amostras: ovelha Serra da Estrela de certificação DOP *vs.* queijo de cabra, em função das zonas discriminantes do espectro: Região I; Região II; Região III[1] (Woodcock *et al*., 2008) 41

Tabela 15. Comparação das amostras: queijo de ovelha Serra da Estrela de certificação DOP da empresa Vale de Estrela *vs.* queijo de ovelha desta região (Queijos Tavares, S.A., região de Seia) sem certificação DOP, em função das zonas discriminantes do espectro: Região I; Região II; Região III[1] (Woodcock *et al*., 2008) 42

Tabela 16. Validação da plataforma web 44

Tabela 17. Resultados do ensaio para determinação do pH em leite de ovelha de raça 'Bordaleira Serra da Estrela' (LB1, LB2 e LB3), leite de cabra (LC) e leite de vaca (LV) 46

Tabela 18. Resultados do ensaio para determinação da acidez titulável em leite de ovelha de raça 'Bordaleira Serra da Estrela' (LB1, LB2 e LB3), leite de cabra (LC) e leite de vaca (LV) 47

Tabela 19. Resultados dos ensaios para determinação da gordura em leite de ovelha de raça 'Bordaleira Serra da Estrela' (LB1, LB2 e LB3) e leite de cabra (LC) 48

Tabela 20. Resultados dos ensaios para determinação da gordura em leite de vaca (LV) 49

Tabela 21. Percentagem de gordura em leite das principais espécies pecuárias leiteiras (Pereira, 2005) 49

Introdução

A espectroscopia de infravermelho tem sido uma ferramenta analítica amplamente utilizada em várias áreas, nomeadamente no controlo alimentar, devido à rapidez com que as amostras podem ser analisadas quase sem manipulação (Blanco e Villarroya, 2002).

Esta ferramenta analítica é uma técnica não invasiva que se baseia na análise das vibrações moleculares resultantes da excitação provocada por um feixe de radiação na zona do infravermelho (Cordella *et al*., 2002).

A região do infravermelho no espectro eletromagnético situa-se entre as gamas do visível e as microondas e subdivide-se em infravermelhos próximos (4000-12500 cm^{-1}), médios (400-4000 cm^{-1}) e longínquos (10-400cm^{-1}) (Reich, 2005).

Para a obtenção de um espectro de infravermelho de uma amostra é medida a quantidade de energia absorvida pela amostra a cada comprimento de onda quando sobre esta se aplica um feixe de luz infravermelha. O espectro resultante (espectro de transmissão ou absorção) identifica os comprimentos de onda do infravermelho a que a amostra absorve radiação e através do qual se pode identificar que tipos de ligações químicas estão presentes na amostra em análise.

Os espectros são mais complexos e mais difíceis de interpretar em função do número de ligações ativas no infravermelho que se encontrem na matriz analisada. Por outro lado, quanto mais complexa for a molécula a analisar, maior o número de bandas de absorção e, consequentemente, é necessário um maior cuidado na análise e interpretação de resultados.

As técnicas de espectroscopia comummente utilizadas são:

- NIR (Espectroscopia de Infravermelho Próximo) – esta técnica baseia-se na interpretação da informação espectral resultante da absorção de energia por parte das ligações existentes nas moléculas de uma determinada amostra, que podem ser causadas por sobreposições de vibrações fundamentais, combinações de vibrações fundamentais e absorções eletrónicas (região de aquisição de espectros 12000 a 4000 cm^{-1});
- FTIR-ATR (Espectroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier com refletância total atenuada) – neste método é utilizado um cristal com índice de refração muito elevado (superior ao da matriz a analisar) e baixa absorção no infravermelho (região de aquisição de espectros 4000 – 400 cm^{-1}); e

PDR 2020 PROGRAMA DE DESENVOLVIMENTO RURAL 2014·2020
PORTUGAL 2020
UNIÃO EUROPEIA Fundo Europeu Agrícola de Desenvolvimento Rural A Europa Investe nas Zonas Rurais

- Raman - esta ferramenta analítica usa um feixe de luz monocromática que ao atingir a amostra, é espelhada por ele, gerando luz da mesma energia ou de energia diferente da incidente. Esta permite identificar as ligações presentes nas moléculas constituintes de um material, seja ele sólido, líquido ou gasoso, transparente ou opaco, cristalino ou amorfo. Por outro lado, com esta técnica, é possível analisar vibrações a comprimentos de onda muito inferiores, determinar o tipo e a quantidade de ligações presentes nas estruturas moleculares de materiais orgânicos ou inorgânicos a partir dos seus estados de vibrações fundamentais (região de aquisição de espectros 4000 – 50 cm^{-1}).

As vibrações moleculares passíveis de serem medidas em espectroscopia de infravermelho podem ser classificadas em vibração de deformação angular (*bending*) e vibração de deformação axial (*stretching*).

Os espectros adquiridos por um equipamento de análise de espectroscopia de infravermelho são complexos, devido a ocorrerem sobreposições e combinações das ligações dos vários grupos funcionais presentes numa mesma amostra. Para se proceder à interpretação da informação espectral é necessário recorrer a vários métodos de quimiometria, nomeadamente calibração multivariada, que utiliza vários comprimentos de onda específicos para cada determinação de uma dada característica de uma amostra (Shurvell, 2001). Na maioria dos casos é utilizada a mesma informação espectral em regiões diferentes e com diferentes pré-processamentos, sendo possível retirar informação de vários componentes de uma mesma amostra (Shurvell, 2001; Anjos *et al*., 2016).

Devido à complexidade dos espectros, estes são geralmente transformados antes da análise multivariada. No processo de otimização dos modelos, pode ser utilizado com pré-processamento dos espectros as seguintes metodologias: (i) correção multiplicativa de dispersão; (ii) correção da linha de base; (iii) normalização pelo mínimo e máximo, normalização vetorial; (iv) primeira derivada: primeira derivada + correção multiplicativa de dispersão; (v) primeira derivada + correção da linha de base; e (vi) primeira derivada + normalização vetorial e segunda derivada.

Na calibração e validação dos modelos obtidos por espectroscopia de infravermelho a robustez dos mesmos é avaliada por uma série de parâmetros, designadamente: (i) número de componentes principais, (ii) coeficiente de determinação, (iii) erro quadrático médio de validação cruzada (iv) a diferença entre valores previstos de amostra e os valores de referência da amostra na validação do modelo e (v) desvio residual de previsão.

PDR 2020 PROGRAMA DE DESENVOLVIMENTO RURAL 2014·2020
PORTUGAL 2020
UNIÃO EUROPEIA Fundo Europeu Agrícola de Desenvolvimento Rural A Europa Investe nas Zonas Rurais

Execução da tarefa

A tarefa 1.4 teve como principal objetivo desenvolver uma metodologia que assegurasse a origem do queijo da Serra da Estrela através da técnica de espectroscopia de infravermelho. Isto é, era previsto o desenvolvimento de uma interface de recolha de dados e programação das curvas de calibração, com o cruzamento de vários casos de estudo, conferindo grau de inteligência artificial, para que seja possível através desta metodologia, para qualquer tipo de leite de ovelha, verificar se este é de origem da raça 'Bordaleira Serra da Estrela' e 'Churra Mondegueira' ou de outras raças e de cruzamentos que estão a ser utilizados na produção de queijo Serra da Estrela.

Em sede de candidatura era previsto que a execução desta tarefa fosse alcançada através da utilização da metodologia NIR (*Near-Infrared Spectroscopy*). Contudo, através da análise mais aprofundada da literatura, verificou-se que uma desvantagem da utilização desta metodologia é a sua fraca sensibilidade para constituintes menores, como sais e compostos nitrogenados solúveis em água, sendo o seu limite de sensibilidade aproximadamente 0,1% para a maioria dos constituintes (Iwamoto & Kawano, 1992). Já a absorção por MIR (*Mid-Infrared Spectroscopy*) abrange tipos específicos de ligações químicas, permitindo a identificação de moléculas orgânicas e organometálicas, sendo aplicada no mundo inteiro no controlo de qualidade. As principais vantagens desta técnica são a velocidade de medida, custo moderado e facilidade na aplicação de amostra na indústria alimentar, facilitado ainda mais com a introdução do módulo de Atenuação Total de Reflexão (ATR). Para além das vantagens referidas, na área da autenticidade do queijo (Downey, 1998), que inclui a origem geográfica e a deteção de adulteração, a espectroscopia MIR é largamente empregue, proporcionando viabilidade para a discriminação do processo de produção e origem da amostragem (Pillonel *et al*., 2003; Picquet *et al*., 2004). Considerando todos estes aspetos descritos na literatura, foi definido pelo Consórcio a utilização do Espetrómetro de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) para a realização da presente tarefa, uma vez que esta tecnologia permite o fornecimento de informação estrutural, em que os vários grupos orgânicos mostram picos de absorção característicos, resultantes de transições vibracionais nas moléculas. Estas bandas de absorção são características da classe de compostos e, através da comparação com informação publicada na literatura, é possível a identificação destas bandas.

Assim, a BLC3, a UM e a ESTGOH executaram a tarefa 1.4 em parceria, desenvolvendo uma metodologia de prova de origem do queijo Serra da Estrela DOP por recurso aos dados

PDR 2020 PROGRAMA DE DESENVOLVIMENTO RURAL 2014·2020
PORTUGAL 2020
UNIÃO EUROPEIA Fundo Europeu Agrícola de Desenvolvimento Rural
A Europa Investe nas Zonas Rurais

dos espectros de FTIR-MIR e químicos. Estes dados passaram por uma ferramenta de análise inteligente de dados.

Análise FTIR-MIR

Publicações recentes têm vindo a demonstrar o potencial da espectroscopia de infravermelho, acoplada a tratamento matemático (como a quimiometria), para determinação da composição e de autenticidade na indústria alimentar, como por exemplo na área da qualidade e autenticidade do queijo (Woodcock *et al*., 2008). Estas técnicas são rápidas, não destrutivas e relativamente pouco dispendiosas, facilitando a transferência desta tecnologia do laboratório para a linha de produção na indústria.

O trabalho desenvolvido no âmbito desta tarefa foi dividido em duas etapas. Inicialmente foi efetuada a análise por FTIR- MIR das amostras de leite e queijo e levantamento da informação estrutural qualitativa; seguidamente procedeu-se ao tratamento matemático da informação obtida.

Cada amostra no FTIR-MIR deve ser analisada pelo menos 3 vezes e o espectro médio é usado para a classificação. É de salientar que é necessária uma enorme quantidade de amostras analisadas, para que seja possível desenvolver a metodologia de prova de origem do queijo Serra da Estrela DOP com recurso ao desenvolvimento de uma *plataforma web*.

Assim, procedeu-se à recolha de amostras e a sua consequente análise por espectroscopia FTIR-MIR. Complementarmente a informação obtida da análise dos parâmetros físico-químicos destas amostras de leite (já descrito no entregável da tarefa 1.1) e de queijo (já descrito no entregável da tarefa 1.2) proporcionou dados analíticos que podem completar a informação obtida da metodologia matemática desenvolvida de prova de origem do queijo Serra da Estrela DOP, com recurso a ferramentas de análise inteligente de dados aplicada a informação proveniente de análise de FTIR-MIR. Neste seguimento, foi criada uma plataforma *web* que serve para registar e, posteriormente armazenar a informação relativa aos dados de ensaios que estão a ser executados para analisar a autenticidade do queijo Serra da Estrela. A **Tabela 1** foi utilizada como base de análise de requisitos para a conceção e desenvolvimento da plataforma *web*.

Tabela 1. Base de requisitos para a conceção de desenvolvimento da plataforma web

Tipo de análise	Atributo	Tipo de dados (unidades)	Descrição
	É DOP?	Adimensional	Booleano

PROGRAMA DE DESENVOLVIMENTO RURAL 2014·2020
PORTUGAL 2020
UNIÃO EUROPEIA
Fundo Europeu Agrícola de Desenvolvimento Rural
A Europa Investe nas Zonas Rurais

Análise química	Humidade		%	Determinação do teor de água contida numa amostra
	Cinzas		%	Quantificação do conteúdo inorgânico numa amostra
	pH		Adimensional	Medição do potencial de Hidrogénio numa amostra
	Acidez titulável		%	Determinação da quantidade de ácido lático numa amostra
	Atividade de água		Adimensional	Teor de água disponível para o crescimento de microrganismos e para reações enzimáticas
	Gordura		%	Quantificação da fração lipídica de uma amostra
Análise física	TPA	Dureza	g	Determinação do perfil de textura: compreende-se por esta propriedade reológica o conjunto de propriedades físicas agrupadas que definem a estrutura dos elementos de um alimento; são sentidos primeiramente ao toque e estão relacionados a deformação, desintegração; são mensuradas objetivamente em função de massa, tempo e distância
		Coesividade	Adimensional	
		Elasticidade	mm	
		Adesividade	mJ	
Análise analítica	FTIR		cm^{-1}	Análise por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) de amostras de queijo e leite, que possibilita a determinação dos grupos moleculares e funcionais constituintes de um material através da comparação com informação publicada na literatura

A determinação dos espetros de infravermelho por FTIR para os queijos, produzidos com leite de variadas origens (queijo de ovelha, queijo de mistura, queijo de vaca, queijo de cabra), foi efetuada com espetrómetro de infravermelho por transformada de Fourier (Shimadzu, Japão) acoplado de um acessório de reflexão total atenuada (ATR) (Shimadzu, Japão). Para cada análise a amostra foi irradiada com radiação de infravermelho de 4000 a 500 cm^{-1}, no modo de transmitância.

Na presente tarefa foram analisados leite de ovinos da raça 'Bordaleira Serra da Estrela', 'Lacaune', 'Assaf' e leite de vaca e cabra. Quanto aos queijos, foram analisados queijo de ovelha, de vaca, de cabra, de mistura e 4 queijos Serra da Estrela de certificação DOP, de produtores distintos.

Este estudo foi iniciado com a análise do leite de ovelha 'Bordaleira Serra da Estrela'; para este tipo de leite foram estudadas amostras de leite de 3 ovelhas diferentes desta raça (amostras fornecidas pelo produtor Sebastião Alves). Estes espectros revelaram-se similares. A título de exemplo é mostrado um espectro de infravermelho de leite de ovelha 'Bordaleira Serra da Estrela' na **Figura 1**.

Para além do leite de ovelha 'Bordaleira Serra da Estrela' da região da Serra da Estrela com que é produzido o queijo Serra da Estrela DOP, foram também considerados no estudo de análise por espectroscopia de infravermelho, leite de vaca e leite de cabra, para efeitos comparativos e discriminatórios. Pretendendo-se através da análise espectroscópica de FTIR avaliar a existência ou não de diferenças entre as diferentes origens de leites, como informação analítica complementar para avaliação de garantia de genuinidade e qualidade do queijo Serra da Estrela DOP.

O espectro de infravermelho do leite de ovelha 'Bordaleira Serra da Estrela', revelou um conjunto variado de bandas de várias intensidades, que podem ser atribuídos a variados grupos funcionais. De forma a facilitar a interpretação do espectro, foram selecionadas 3 regiões discriminantes (I a III): a região I de 3000 a 2700 cm^{-1}; a região II de 1800 a 1500 cm^{-1} e a região III de 1500 a 500 cm^{-1}.

Na zona anterior à região I é possível observar uma banda larga em torno de 3300 cm^{-1} que corresponde a vibração *streching* N-H e O-H *stretching* indicando a presença de água e de proteínas. Uma vez que a presença de água no leite é variável, esta banda não pode ser usada como fator de discriminação, portanto não foi incluída nas regiões atrás consideradas.

A região I (3000 a 2700 cm^{-1}) onde é possível observar as bandas 2920 e 2850 cm^{-1} correspondentes a C-H do metileno modo *streching* antissimétrico e simétrico, respetivamente, está relacionada com a presença de ácidos gordos (Nicolaou *et al*., 2010). Estas bandas podem apresentar intensidades variáveis consoante o tipo de leite e estão relacionadas com a gordura no leite (Nicolaou *et al*., 2010).

A região II (1800 a 1500 cm^{-1}) mostra primeiramente a banda com intensidade elevada a 1741 cm^{-1} correspondente a vibração *stretching* de C=O, indicando a presença de esteres de ácidos carboxílicos, nomeadamente triglicerídeos. A presença das bandas 1641 e 1548 cm^{-1} está relacionada com o grupo funcional amida das proteínas (Kher *et al*., 2007), sendo a 1643 cm^{-1} identificada com a vibração *stretching* de C=O, também designada de Amida I e a 1548 cm^{-1} com o modo *bending* de N-H, designada de Amida II. A elevada intensidade destas bandas é uma evidência da presença de proteínas, da sua estrutura secundária e estado de agregação (Kher *et al*., 2007).

A região III (1500 a 500 cm^{-1}) corresponde à zona da impressão digital; nesta é possível observar a 1463 cm^{-1} a banda correspondente a $-CH_2$ *scissoring* de cadeias acilo de lípidos (Mendelsohn *et al*., 2010), a 1165 cm^{-1} banda de vibração C-O, indicando a presença de lípidos (Zhou *et al*., 2006). Adicionalmente ainda é possível observar a banda larga a 1097 cm^{-1}, que

PDR 2020 PROGRAMA DE DESENVOLVIMENTO RURAL 2014·2020
PORTUGAL 2020
UNIÃO EUROPEIA Fundo Europeu Agrícola de Desenvolvimento Rural A Europa Investe nas Zonas Rurais

pode ser associada ao grupo P=O de compostos fosfatados (Jaiswal *et al*., 2007) e também a vibrações de *elongation* de C-O indicando a presença de polissacarídeos e de lactose (Markoska *et al*., 2019). Nesta região ainda é possível observar a banda larga e intensa a 650 cm^{-1} correspondente a C-H *bending* de compostos insaturados (incluindo alcenos) e aromáticos, apesar da sua intensidade não permitir a distinção espectroscópica entre diferentes tipos de leite.

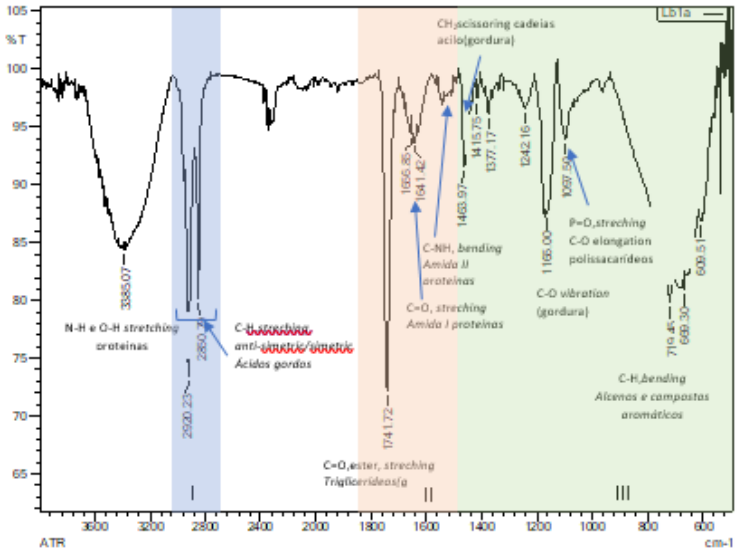


Figura 1. Espectro de infravermelho de amostra Lb1 (leite de ovelha 'Bordaleira Serra da Estrela'). Azul-Região I; rosa- Região II; verde- Região III.

Na **Figura 2** é mostrada a comparação dos espectros de leites de ovelha 'Bordaleira Serra da Estrela' provenientes de 3 ovelhas diferentes. Nesta comparação espectral de leites não foram visíveis diferenças significativas ao nível das 3 zonas discriminantes.

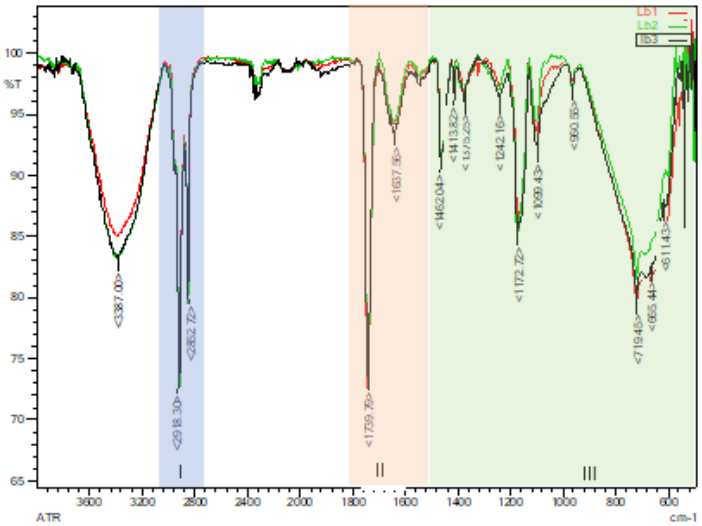


Figura 2. Comparação de espectro de infravermelho das amostras de leite de ovelha 'Bordaleira Serra da Estrela': amostra Lb1, Lb2, Lb3. Azul-Região I; rosa- Região II; verde- Região III.

PDR 2020 PROGRAMA DE DESENVOLVIMENTO RURAL 2014·2020
PORTUGAL 2020
UNIÃO EUROPEIA Fundo Europeu Agrícola de Desenvolvimento Rural
A Europa Investe nas Zonas Rurais

Adicionalmente, foi efetuada uma análise por infravermelho de outros tipos de leite, com o objetivo de simular possíveis situações de adulteração de queijo de ovelha, com leite de vaca e/ou de cabra e identificar possíveis diferenças entre estes leites e leite de ovelha usado para produzir queijo de Serra da Estrela. De seguida é apresentado, de forma resumida, a comparação entre os espectros obtidos desta análise.

Inicialmente foi efetuada a comparação do leite de ovelha 'Bordaleira Serra da Estrela' com amostra de leite de cabra (amostra fornecida pelo produtor Sebastião Alves). Os resultados obtidos encontram-se resumidos na **Figura 3** e na **Tabela 2**. Na **Tabela 2** destacam-se apenas as zonas do espectro consideradas como discriminantes (região I a III). A análise do espectro de infravermelho e respetiva tabela mostra que a diferença entre os espectros dos 2 leites se centra na região I e III. Na região I as bandas 2920 e 2850 cm^{-1}, correspondentes a C-H do metileno modo *streching* antissimétrico e simétrico, respetivamente, estão relacionadas com a presença de ácidos gordos e diretamente relacionadas com a gordura no leite, apresentam-se mais intensas para o leite de cabra. Para a zona III a diferença fundamental encontra-se banda de vibração C-O, associada à presença de lípidos, que se encontra mais intensa para o leite de cabra.

Concluiu-se que, de um modo geral, não existiram diferenças acentuadas entre o espectro das 2 amostras de leite de ovelha e de cabra, exceto no caso das bandas referenciadas, em que para o queijo de cabra são mais intensas do que no caso do leite de ovelha. Não se constatou o aparecimento de novas bandas significativas na amostra de leite de cabra.

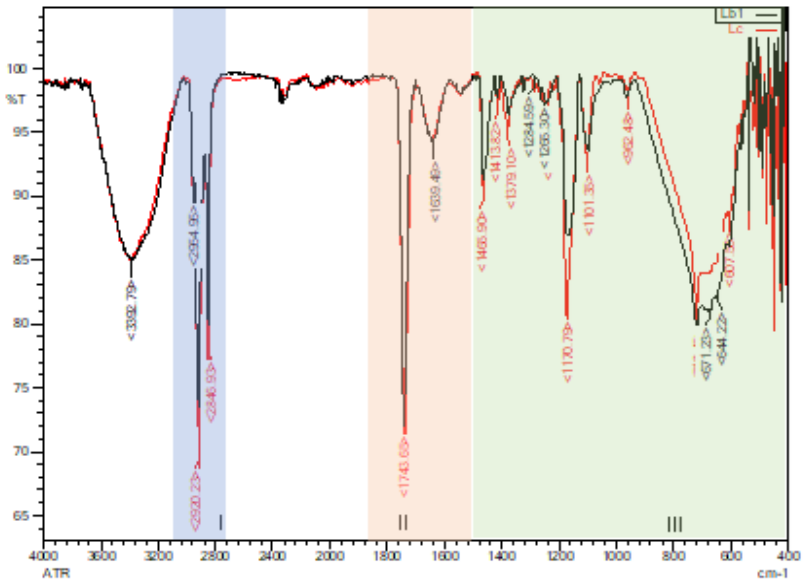


Figura 3. Comparação do espectro de infravermelho das amostras de leite de ovelha 'Bordaleira Serra da Estrela' (Lb1) e leite de cabra (Lc). Azul-Região I; rosa- Região II; verde- Região III.

PDR 2020 PROGRAMA DE DESENVOLVIMENTO RURAL 2014·2020
PORTUGAL 2020
UNIÃO EUROPEIA
Fundo Europeu Agrícola de Desenvolvimento Rural
A Europa Investe nas Zonas Rurais

Tabela 2. Comparação das amostras: leite de ovelha 'Bordaleira Serra da Estrela' *vs*. leite de cabra, em função das zonas discriminantes do espectro: Região I; Região II; Região III[1] ([1]Intensidade de banda: p-pequena, m-média, g-grande)

Amostras	Região I	Região II	Região III	Observações
Leite de ovelha Bordaleira Serra da Estrela	2954 cm^{-1} C-H(CH3),stretching,p 2920 e 2846 cm^{-1} *streching anti-simetric/simetric,m,m*	1743 cm^{-1} C=O,*stretching,g* 1639 cm^{-1} C=O, stretching(Amida I),p 1537 cm^{-1} C-NH, bending (Amida II),p	1463 cm^{-1} -CH_2 *scissoring,m* 1170 cm^{-1} C-O,*bending(ester),m* 1101 cm^{-1} P=O,*streching e C-O elongation,m* 650 cm^{-1} C-H *bending* de compostos insaturados,*g*	A diferença entre os espectros dos leites é nas zonas I e III, que corresponde a diferenças ao nível da presença de lípidos e compostos insaturados
Leite de cabra	2954 cm^{-1} C-H(CH3),stretching,p 2920 e 2846 cm^{-1} *streching anti-simetric/simetric,g,g*	1743 cm^{-1} C=O,*streching,g* 1639 cm^{-1} C=O, stretching(Amida I),p 1537 cm^{-1} C-NH, bending (Amida II),p	1463cm^{-1} -CH_2 *scissoring,m* 1170 cm^{-1} C-O,*bending(ester),g* 1101 cm^{-1} P=O,*streching e C-O elongation,m* 650 cm^{-1} C-H *bending* de compostos insaturados,*g*	

Foi também analisado o leite de vaca (adquirido em superfície comercial, leite inteiro e de marca Mimosa) e efetuada a comparação espectroscópica com o leite de ovelha 'Bordaleira Serra da Estrela' e leite de cabra e vaca. Os resultados são apresentados na **Figura 4** e **Tabela 3**. Na **Tabela 3**, destacam-se apenas as zonas do espectro consideradas como discriminantes (região I a III). A análise da comparação do espectro de infravermelho (**Figura 4**) e respetiva tabela (**Tabela 3**Tabela 3) mostram que a diferença entre os espectros dos 3 leites é marcada para as 3 regiões I, II, III. Na zona I as bandas 2920 e 2850 cm^{-1}, correspondentes a C-H do metileno modo *streching* antissimétrico e simétrico, respetivamente, estão relacionadas com a presença de ácidos gordos e diretamente associadas com a gordura no leite, apresentando-se bastante mais intensas para o leite de ovelha e cabra do que para o leite de vaca. Para a zona II, a diferença está nas bandas 1641 e 1548 cm^{-1} relacionadas com o grupo funcional amida das proteínas (Kher *et al*., 2007), sendo a 1643 cm^{-1} identificada com a vibração *stretching* de C=O, também designada de Amida I e a 1548 cm^{-1} com o modo *bending* de N-H, designada de Amida II, verificando-se que para o leite de ovelha e cabra estas apresentam-se muito menores que no caso do leite de vaca. Para a zona III, as bandas 1463 cm^{-1} -CH_2 *scissoring* de cadeias acilo de lípidos (Mendelsohn *et al*., 2010) e a 1165 cm^{-1} banda de vibração C-O indicam a presença de lípidos, encontrando-se bastante mais elevadas para o leite de ovelha e cabra do que para o leite de vaca.

Adicionalmente ainda foi possível observar a banda larga a 1097 cm^{-1} que pode ser associada ao grupo P=O de compostos fosfatados (Jaiswal *et al*., 2007) e também a vibrações de *elongation* de C-O indicando a presença de polissacarídeos e de lactose (Markoska *et al*., 2019), de intensidade média para o leite de ovelha e cabra e semelhante à existente no leite

PDR 2020 PROGRAMA DE DESENVOLVIMENTO RURAL 2014·2020
PORTUGAL 2020
UNIÃO EUROPEIA Fundo Europeu Agrícola de Desenvolvimento Rural A Europa Investe nas Zonas Rurais

de vaca. Porém o formato da banda em torno de 1097 cm^{-1} para o leite de vaca encontra-se bastante diferente em relação aos outros leites. Nesta região ainda é possível observar a banda larga e intensa a 650 cm^{-1} correspondente a C-H *bending* de compostos insaturados (incluindo alcenos) e aromáticos, apesar da sua intensidade não permitir a distinção espectroscópica entre diferentes tipos de leite, verifica-se que esta é marcadamente mais intensa para o leite de vaca em relação aos leites de ovelha e cabra.

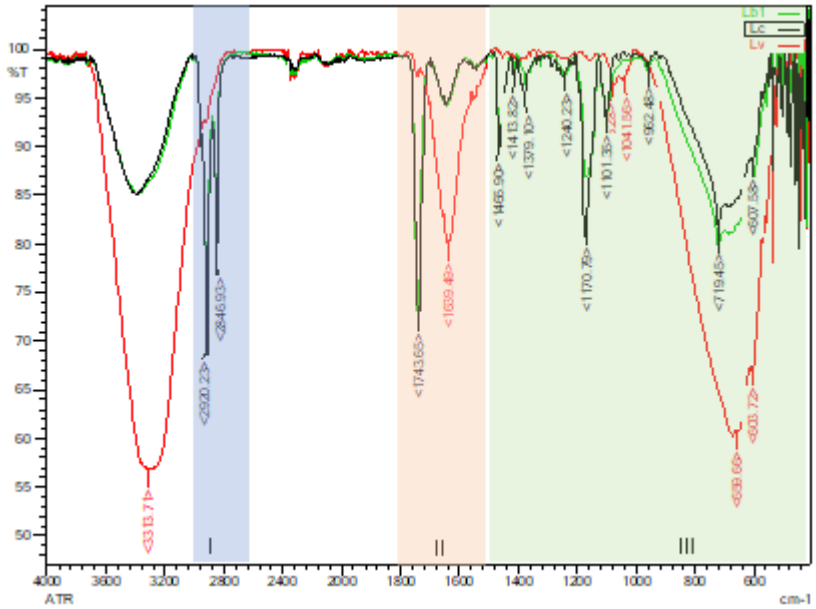


Figura 4. Comparação de espectro de infravermelho das amostras de leite de ovelha 'Bordaleira Serra da Estrela' (Lb1) com leite de cabra (Lc) e leite de vaca (Lv). Azul-Região I; rosa- Região II; verde- Região III.

Tabela 3. Comparação das amostras: leite de ovelha 'Bordaleira Serra da Estrela' *vs*. leite de cabra e de vaca, em função das zonas discriminantes do espectro: Região I; Região II; Região III.

Amostras	Região I	Região II	Região III	Observações
Leite de ovelha 'Bordaleira Serra da Estrela'	2954 cm^{-1} C-H(CH3),stretching,p 2920 e 2846 cm^{-1} *streching anti-simetric/simetric,m,m*	1743 cm^{-1} C=O,*stretching,g* 1639 cm^{-1} C=O, stretching(Amida I),p 1537 cm^{-1} C-NH, bending (Amida II),p	1463 cm^{-1} -CH_2 *scissoring,m* 1170 cm^{-1} C-O,*bending(ester),m* 1101 cm^{-1} P=O,*streching e C-O elongation,m* 650 cm^{-1} C-H *bending* de compostos insaturados,*g*	A diferença entre os espectros dos leites é nas zonas I, II e III, correspondendo a diferenças ao nível da presença de lípidos, proteínas, carboidratos e compostos insaturados
Leite de cabra	2954 cm^{-1} C-H(CH3),stretching,p 2920 e 2846 cm^{-1} *streching anti-simetric/simetric,g,g*	1743 cm^{-1} C=O,*streching,g* 1639 cm^{-1} C=O, stretching(Amida I),p 1537 cm^{-1} C-NH, bending (Amida II),p	1463cm^{-1} -CH_2 *scissoring,m* 1170 cm^{-1} C-O,*bending(ester),g* 1101 cm^{-1} P=O,*streching e C-O elongation,m* 650 cm^{-1} C-H *bending* de compostos insaturados,*g*	
Leite de vaca	2954 cm^{-1} C-H(CH3),stretching,p 2920 e 2846 cm^{-1} *streching anti-simetric/simetric,p,p*	1743 cm^{-1} C=O,*stretching,p* 1639 cm^{-1} C=O, stretching(Amida I),g 1537 cm^{-1} C-NH, bending (Amida II),g	1465 cm^{-1} -CH_2 *scissoring,p* 1170 cm^{-1} C-O,*bending(ester),p* 1101 cm^{-1} P=O,*streching e C-O elongation,m* 650 cm^{-1} C-H *bending* de compostos insaturados,*g*	

[1]Intensidade de banda: p-pequena, m-média, g-grande

PDR 2020 PROGRAMA DE DESENVOLVIMENTO RURAL 2014·2020
PORTUGAL 2020
UNIÃO EUROPEIA Fundo Europeu Agrícola de Desenvolvimento Rural
A Europa Investe nas Zonas Rurais

Posteriormente, procedeu-se à recolha de amostras de leite de raças de ovinos 'Lacaune' e 'Assaf' de um produtor local de Oliveira do Hospital, que serviram de referência, e à sua consequente análise por espectroscopia FTIR-MIR, como informação analítica complementar para avaliação de garantia de genuinidade e qualidade do queijo Serra da Estrela DOP.

Assim como anteriormente referido, a informação obtida da análise dos parâmetros físico-químicos destas amostras de leite proporcionará dados analíticos para completar a informação obtida proveniente de análise de FTIR-MIR.

Este estudo foi iniciado com a análise do leite de ovelha da raça 'Assaf' desta região. Para este tipo de leite foram estudadas amostras de leite de 3 ovelhas da raça 'Assaf' diferentes. A título de exemplo é mostrado um espectro de infravermelho de leite de ovelha da raça 'Assaf' (**Figura 5**)Figura 5.

O espectro de infravermelho do leite de ovelha da raça 'Assaf' revelou um conjunto variado de bandas de várias intensidades, que podem ser atribuídas a variados grupos funcionais. De forma a facilitar a interpretação do espectro, foram selecionadas 3 regiões discriminantes (I a III): a região I de 3000 a 2700 cm^{-1}; a região II de 1800 a 1500 cm^{-1} e a região III de 1500 a 500 cm^{-1}.

Na zona anterior à região I é possível observar uma banda larga em torno de 3300 cm^{-1} que corresponde a vibração *streching* N-H e O-H *stretching* indicando a presença de água e de proteínas. Uma vez que a presença de água no leite é variável, esta banda não pode ser usada como fator de discriminação, portanto não foi incluída nas regiões atrás consideradas.

A região I (3000 a 2700 cm^{-1}) onde é possível observar as bandas 2920 e 2850 cm^{-1} correspondentes a C-H do metileno modo *streching* antissimétrico e simétrico, respetivamente, está relacionada com a presença de ácidos gordos (Nicolaou *et al*., 2003). Estas bandas podem apresentar intensidades variáveis consoante o tipo de leite e estão relacionadas com a gordura no leite (Nicolaou *et al*., 2003).

A região II (1800 a 1500 cm^{-1}) mostra primeiramente a banda com intensidade elevada a 1741 cm^{-1} correspondente a vibração *stretching* de C=O indicando a presença de esteres de ácidos carboxílicos, nomeadamente triglicerídeos. A presença das bandas 1643 e 1548 cm^{-1} está relacionada com o grupo funcional amida das proteínas (Khner *et al*., 2007), sendo a 1643 cm^{-1} identificada com a vibração *stretching* de C=O, também designada de Amida I e a 1548 cm^{-1} com o modo *bending* de N-H, designada de Amida II. A elevada intensidade para estas bandas

PDR 2020 PROGRAMA DE DESENVOLVIMENTO RURAL 2014·2020
PORTUGAL 2020
UNIÃO EUROPEIA Fundo Europeu Agrícola de Desenvolvimento Rural A Europa Investe nas Zonas Rurais

é uma evidência da presença de proteínas, da sua estrutura secundária e estado de agregação (Kher *et al*., 2007).

A região III (1500 a 500 cm^{-1}) corresponde à zona da impressão digital; nesta é possível observar a 1463 cm^{-1} a banda correspondente a $-CH_2$ *scissoring* de cadeias acilo de lípidos (Mendelsohn *et al*., 2010)), a 1161 cm^{-1} banda de vibração C-O indicando a presença de lípidos (Zhou *et al*., 2006). Adicionalmente ainda é possível observar a bandas larga a 1097 cm^{-1} que pode ser associada ao grupo P=O de compostos fosfatados (Pranita *et al*., 2015) e também a vibrações de *elongation* de C-O indicando a presença de polissacarídeos e de lactose (Markoska *et al*., 2019). Nesta região ainda é possível observar a banda larga e intensa a 650 cm^{-1} correspondente a C-H *bending* de compostos insaturados (incluindo alcenos) e aromáticos, apesar da sua intensidade não permitir a distinção espectroscópica entre diferentes tipos de leite.

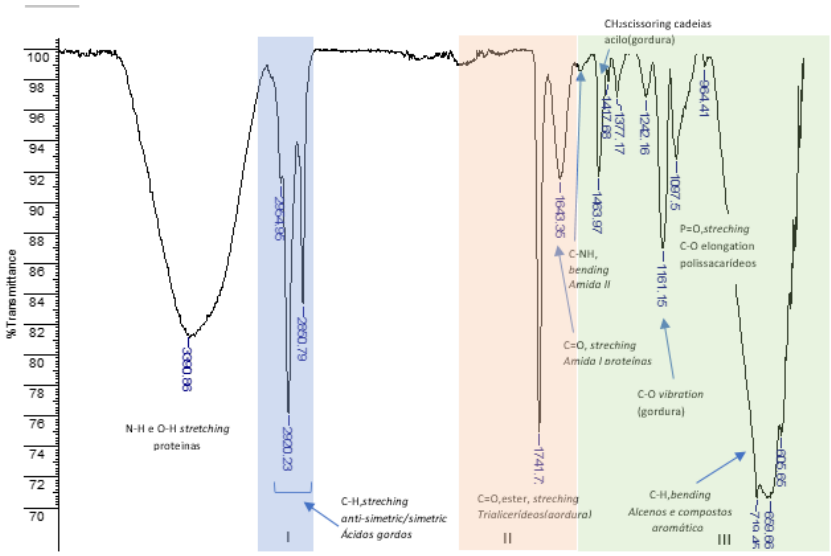


Figura 5. Espectro de infravermelho do leite de ovelha da raça 'Assaf'. Azul - região I; Laranja - região II; Verde - região III.

Na **Figura 6** é mostrada a comparação dos espectros de leites de ovelha de raça 'Assaf' provenientes de 3 ovelhas diferentes. Nesta comparação espectral de leites, não foi visível diferença significativa ao nível das 3 zonas discriminantes, apenas se observaram variações ao nível da intensidade destas.

Nomeadamente as diferenças de intensidade entre os espectros dos 3 leites encontram-se na região inicial de I, próximo de 3000 cm^{-1}, associada a quantidades variáveis de água e de proteínas; e na zona III a 1377 e a 1097 cm^{-1}, mostrando quantidades e variações nos polissacarídeos e lactose.

PDR 2020 PROGRAMA DE DESENVOLVIMENTO RURAL 2014·2020
PORTUGAL 2020
UNIÃO EUROPEIA
Fundo Europeu Agrícola de Desenvolvimento Rural
A Europa Investe nas Zonas Rurais

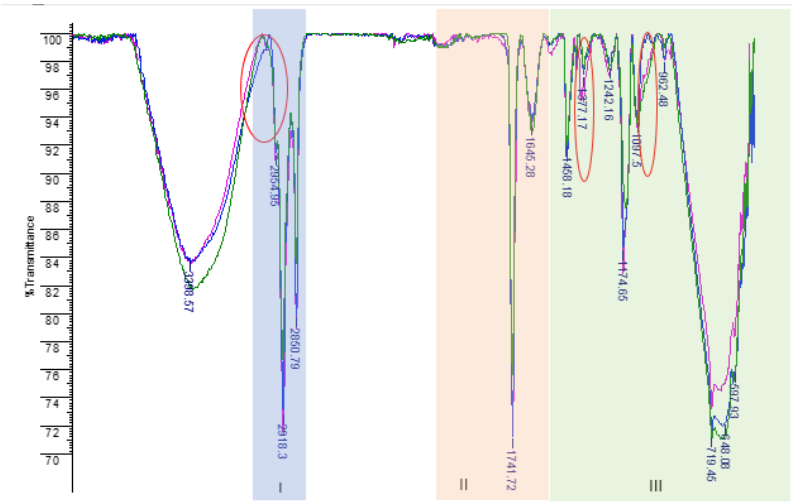


Figura 6. Comparação de espectro de infravermelho das amostras de leite de ovelha 'Assaf', indivíduo 1, 2, 3. Verde (indivíduo 1); rosa (indivíduo 2); azul (indivíduo 3). Azul - região I; Laranja - região II; Verde- região III.

Adicionalmente, foi efetuada uma análise por infravermelho de leite proveniente de outra raça designada por 'Lacaune', da zona de Serra da Estrela, leite que é utilizado para produzir queijo da Serra da Estrela (não DOP). Na **Figura 7** é mostrado o espectro de infravermelho representativo do leite de ovelha da raça 'Lacaune'.

O espectro de infravermelho do leite de ovelha da raça 'Lacaune' revelou um conjunto variado de bandas de várias intensidades, associadas a várias classes de compostos semelhantes às encontradas também na raça 'Assaf'. A região I (3000 a 2700 cm^{-1}) contém as bandas 2920 e 2850 cm^{-1} correspondentes a C-H do metileno modo *stretching* antissimétrico e simétrico, respetivamente, associadas a ácidos gordos, porém com pequena intensidade neste tipo de leite (Nicolaou *et al*., 2003).

A região II (1800 a 1500 cm^{-1}) mostrou primeiramente a banda com intensidade média a 1741 cm^{-1} correspondente a vibração *stretching* de C=O, mostrando a presença de esteres de ácidos carboxílicos, nomeadamente triglicerídeos. A presença das bandas 1642 cm^{-1} intensas (vibração *stretching* de C=O, amida I) e 1548 cm^{-1} diminutas (modo *bending* de N-H, amida II), relaciona-se com o grupo amida das proteínas (Kher *et al*., 2007). A elevada intensidade para estas bandas é uma evidência da presença de proteínas, da sua estrutura secundária e estado de agregação (Kher *et al*., 2007).

Na região III (1500 a 500 cm^{-1}), a zona da impressão digital, foi possível observar as bandas associadas aos lípidos a 1463 cm^{-1}, a banda correspondente a $-CH_2$ *scissoring* de cadeias acilo (Mendelsohn *et al*., 2010) e 1161 cm^{-1} banda de vibração C-O (Zhou *et al*., 2006), ambas de intensidade menor que o leite de raça 'Assaf'. Adicionalmente, foi visível a banda a 1097 cm^{-1} que pode ser associada ao grupo P=O de compostos fosfatados (Pranita *et al*., 2015)

PDR 2020 PROGRAMA DE DESENVOLVIMENTO RURAL 2014·2020
PORTUGAL 2020
UNIÃO EUROPEIA Fundo Europeu Agrícola de Desenvolvimento Rural
A Europa Investe nas Zonas Rurais

e também a vibrações de *elongation* de C-O, indicando a presença de polissacarídeos e de lactose (Markoska *et al*., 2019). Nesta região é mostrada a banda larga e intensa a 650 cm^{-1} correspondente a C-H *bending* de compostos insaturados (incluindo alcenos) e aromáticos, que neste leite é muito intensa.

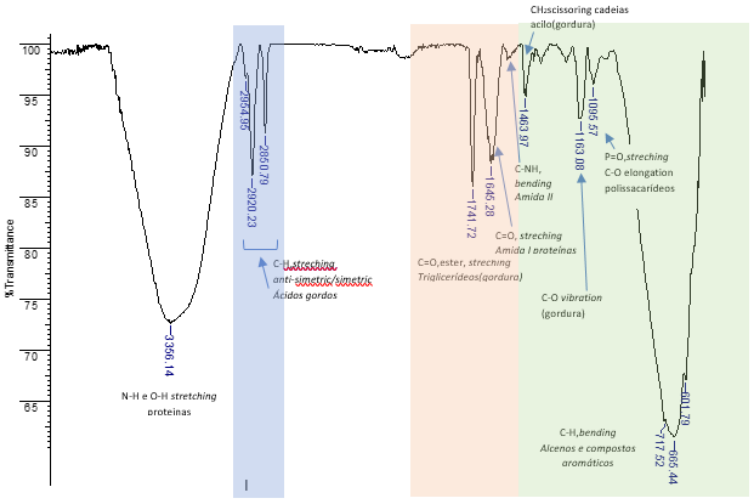


Figura 7. Espectro de infravermelho do leite de ovelha da raça 'Lacaune'. Azul - região I; Laranja - região II; Verde - região III.

Amostras de leite de 3 indivíduos da raça 'Lacaune' foram estudadas para inferir acerca das variações na composição em termos das famílias de compostos entre indivíduos desta raça. Na **Figura 8** é mostrada a comparação dos espectros de leites de ovelha de raça 'Lacaune' provenientes de 3 ovelhas diferentes. Nesta comparação espectral de leites não foi visível diferença significativa ao nível das 3 zonas discriminantes, apenas se observam variações a nível de intensidade destas entre amostras. As diferenças de intensidade entre os espectros dos 3 leites encontram-se em todas as regiões discriminantes (região I, II e III).

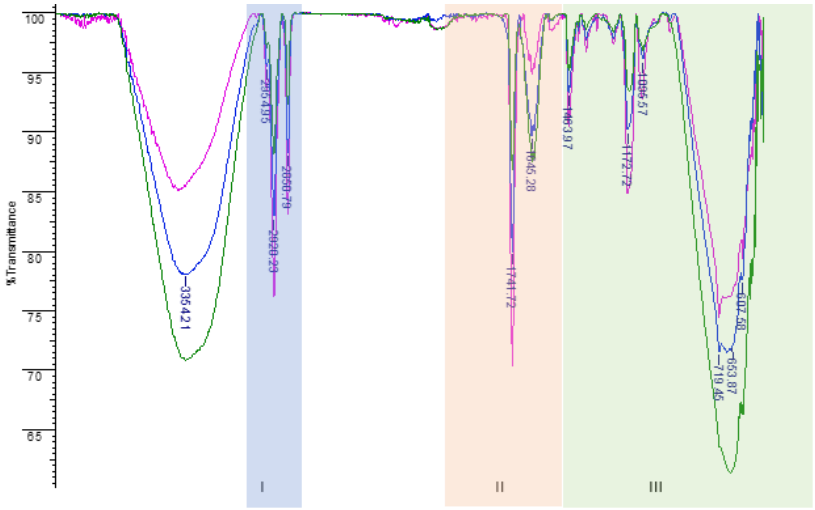


Figura 8. Comparação de espectro de infravermelho das amostras de leite de ovelha 'Lacaune'; indivíduo 1, 2, 3. Verde (indivíduo 1); Rosa (indivíduo 2); Azul (indivíduo 3). Azul - região I; Laranja - Região II; Verde - Região III.

PDR 2020 PROGRAMA DE DESENVOLVIMENTO RURAL 2014·2020
PORTUGAL 2020
UNIÃO EUROPEIA
Fundo Europeu Agrícola de Desenvolvimento Rural
A Europa Investe nas Zonas Rurais

A comparação dos leites de ovelha obtido para as duas raças 'Assaf' e 'Lacaune' é um aspeto importante a ter em conta, porque apesar das ovelhas serem ambas da zona de Serra da Estrela, têm características diferentes, tornando-se importante observar as diferenças existentes entre os seus espectros de infravermelho. Os resultados obtidos encontram-se resumidos na **Figura 9** e na **Tabela 4**. A análise dos resultados mostrou que a diferença entre os espectros dos 2 leites se centra na região I e III. Na zona anterior à região I a principal diferença residiu na banda larga em torno de 3300 cm^{-1}, que corresponde a vibração *stretching* N-H e O-H *stretching*, indicando a presença de água e de proteínas, que pode ser variável dependendo das raças de ovelha, sendo que a região I apresentou bandas mais intensas para o leite de ovelha 'Lacaune'. Para a zona III a diferença fundamental encontrou-se na banda de vibração a 1097 cm^{-1}, que pode ser associada ao grupo P=O de compostos fosfatados e também a vibrações de *elongation* de C-O indicando a presença de polissacarídeos e de lactose, que se encontra mais intensa para o leite de ovelha 'Assaf'. Na **Tabela 4**, destacam-se apenas as zonas do espectro consideradas como discriminantes (região I a III).

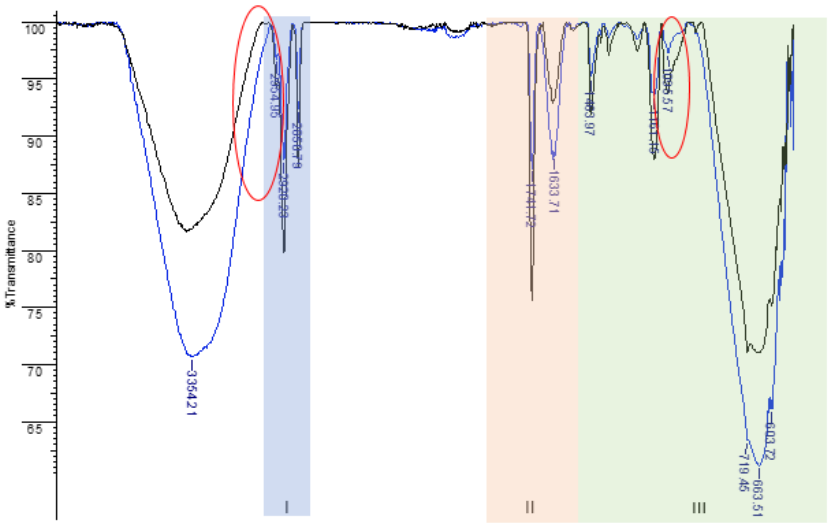


Figura 9. Comparação de espectro de infravermelho das amostras de leite de ovelha 'Lacaune' (azul) e 'Assaf' (preto). Azul - região I; Laranja - região II; Verde - região III.

PDR 2020 PROGRAMA DE DESENVOLVIMENTO RURAL 2014·2020
PORTUGAL 2020
UNIÃO EUROPEIA
Fundo Europeu Agrícola de Desenvolvimento Rural
A Europa Investe nas Zonas Rurais

Tabela 4. Comparação das amostras: leite de ovelha 'Lacaune' e 'Assaf', em função das zonas discriminantes do espectro: Região I; Região II; Região III[1]

Amostras	Região I	Região II	Região III	Observações
Leite de ovelha 'Assaf'	3300 cm-1 *stretching* N-H e O-H *stretching* 2954 cm^{-1}CH(CH3), *stretching*, p 2920 e 2850 cm^{-1} *stretching anti-simetric/simetric, m, m*	1741 cm^{-1} C=O, *stretching, g* 1633 cm-1 C=O, *stretching*(Amida I), p 1537 cm-1 C-NH, *bending* (Amida II), p	1463 cm^{-1} -CH_2 *scissoring, m* 1161 cm^{-1} C-O, *bending (ester) ,m* 1095 cm^{-1} P=O, *streching e C-O elongation, m* 663 cm^{-1} C-H *bending* de compostos insaturados, *g*	A diferença entre os espectros dos leites é nas zonas anterior à I e III Correspondendo a diferenças a nível de presença de água e de proteínas e polissacarídeos e de lactose
Leite de ovelha de 'Lacaune'	3300 cm-1 *stretching* N-H e O-H *stretching* 2954 cm^{-1} C-H(CH3), *stretching*, p 2920 e 2850 cm^{-1} *stretching anti-simetric/simetric, g, g*	1741 cm^{-1} C=O, *stretching, g* 1633 cm-1 C=O, *stretching* (Amida I), p 1537 cm-1 C-NH, *bending* (Amida II), p	1463cm^{-1} -CH_2 *scissoring, m* 1161 cm^{-1} C-O, *bending (ester), g* 1095 cm^{-1} P=O, *stretching e C-O elongation, m* 663 cm^{-1} C-H *bending* de compostos insaturados, *g*	

[1]Intensidade de banda: p - pequena, m - média, g - grande

Concluindo, de um modo geral, as diferenças registadas entre o espectro das 2 amostras de leites de ovelha 'Lacaune' e 'Assaf', estão relacionadas com a diferença relativa na intensidade das bandas.

Para finalizar, é interessante comparar estas amostras de leite com amostra de leite de raça de ovelha 'Bordaleira Serra da Estrela', sendo que a comparação espectroscópica com o leite de ovelha 'Assaf', 'Lacaune' e 'Bordaleira Serra da Estrela' é mostrada na **Figura 10** e **Tabela 5**.

Nesta comparação, destacam-se apenas as zonas do espectro consideradas como discriminantes (região I a III). A análise da comparação do espectro de infravermelho (**Figura 10** e **Tabela 5**) mostrou que a diferença entre os espectros dos 3 leites residiu na intensidade relativa das bandas, sendo marcada para as 3 regiões I, II, III. Na zona I as bandas 2920 e 2850 cm^{-1} correspondentes a C-H do metileno modo *streching* antissimétrico e simétrico, respetivamente, estão relacionadas com a presença de ácidos gordos e diretamente associadas com a gordura no leite, apresentam-se bastante mais intensas para o leite de ovelha 'Bordaleira Serra da Estrela', seguida de 'Assaf', do que para 'Lacaune'. Para a zona II, a diferença está nas bandas 1741 cm^{-1} correspondente a vibração *stretching* de C=O indicando a presença de esteres de ácidos carboxílicos, nomeadamente triglicerídeos, tendo sido extremamente intensa para o leite de ovelha 'Bordaleira Serra da Estrela', seguida de 'Assaf' e diminuta para a 'Lacaune'. As bandas a 1641 cm^{-1} e 1548 cm^{-1} estão relacionadas com o grupo funcional amida das proteínas, sendo a 1641 cm^{-1} identificada com a vibração *stretching* de C=O, também designada de Amida I e a 1548 cm^{-1} com o modo *bending* de N-H, designada de Amida II. Estas bandas mostram o oposto do verificado anteriormente: para o leite de ovelha

PDR 2020 PROGRAMA DE DESENVOLVIMENTO RURAL 2014·2020
PORTUGAL 2020
UNIÃO EUROPEIA Fundo Europeu Agrícola de Desenvolvimento Rural
A Europa Investe nas Zonas Rurais

'Lacaune' a banda da amida I apresentou-se muito maior que no caso do leite de ovelha 'Bordaleira Serra da Estrela' e 'Assaf'. Para a zona III, as bandas 1463 cm-1 -CH_2 *scissoring* de cadeias acilo de lípidos e a 1165 cm^{-1} banda de vibração C-O indicam a presença de lípidos, encontram-se bastante mais elevadas para o leite de ovelha 'Bordaleira Serra da Estrela' e 'Assaf' do que para o leite de 'Lacaune' Adicionalmente, ainda foi possível observar a banda larga a 1097 cm^{-1}, que pode ser associada ao grupo P=O de compostos fosfatados e também a vibrações de *elongation* de C-O, indicando a presença de polissacarídeos e de lactose, de intensidade média para o leite de ovelha Bordaleira Serra da Estrela' e 'Assaf' e menor para o leite de raça 'Lacaune'. Nesta região ainda foi possível observar a banda larga e intensa a 673 cm^{-1} correspondente a C-H *bending* de compostos insaturados (incluindo alcenos) e aromáticos. Apesar da sua intensidade não permitir a distinção espectroscópica entre diferentes tipos de leite, verificou-se que esta é marcadamente mais intensa para o leite de ovelha 'Lacaune' em relação aos leites de ovelha 'Bordaleira Serra da Estrela' e 'Assaf'.

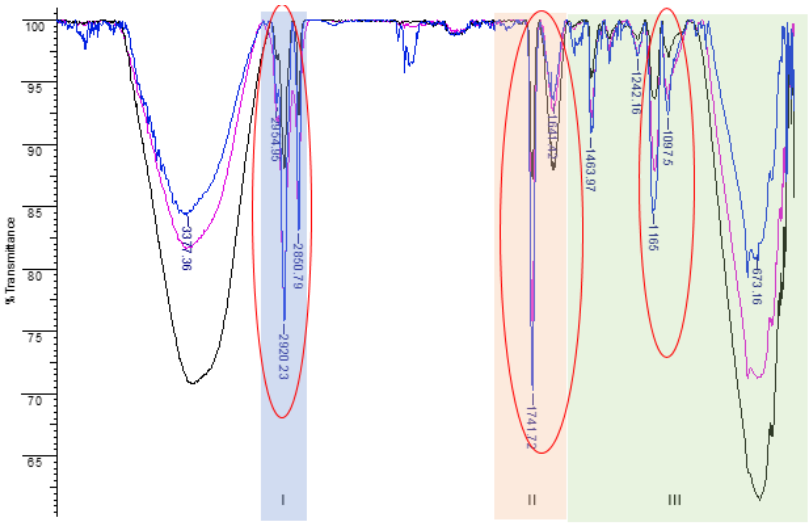


Figura 10. Comparação de espectro de infravermelho das amostras de leite de ovelha de 'Bordaleira Serra da Estrela' (azul); leite de 'Assaf' (rosa); leite de 'Lacaune' (preto). Azul - região I; Laranja - região II; Verde - região III.

Tabela 5. Comparação das amostras: leite de ovelha 'Bordaleira Serra da Estrela' *vs.* leite ovelha 'Lacaune' e 'Assaf', em função das zonas discriminantes do espectro: Região I; Região II; Região III[1]

Amostras	Região I	Região II	Região III	Observações
Leite de ovelha 'Assaf'	3377 cm-1 *stretching* N-H e O-H *stretching* 2954 cm^{-1}CH(CH3), *stretching*, p 2920 e 2850 cm^{-1} stretching *anti-simetric/simetric, m, m*	1741 cm^{-1} C=O, *stretching, g* 1641 cm-1 C=O, *stretching* (Amida I),p 1537 cm-1 C-NH, *bending* (Amida II), p	1463 cm^{-1} -CH_2 *scissoring, m* 1165 cm^{-1} C-O, *bending (ester), m* 1097 cm^{-1} P=O, *stretching e C-O elongation, m* 673 cm^{-1} C-H *bending* de compostos insaturados, *g*	A diferença entre os espectros dos leites é nas zonas I, II e III, que corresponde a diferenças ao nível das quantidades presentes de lípidos, proteínas, carboidratos e compostos insaturados
Leite de ovelha de 'Lacaune'	3377 cm-1 *stretching* N-H e O-H stretching 2954 cm^{-1} C-H(CH3),	1741 cm^{-1} C=O, *stretching ,g* 1641 cm-1 C=O,	1463cm^{-1} -CH_2 *scissoring, m* 1165 cm^{-1} C-O, *bending (ester), g*	

	stretching, p 2920 e 2850 cm^{-1} *stretching anti-simetric/simetric, g, g*	*stretching* (Amida I),p 1537 cm-1 C-NH, *bending* (Amida II), p	1097 cm^{-1} P=O, *stretching e C-O elongation, m* 673 cm^{-1} C-H *bending* de compostos insaturados, *g*	
Leite de ovelha 'Bordaleira Serra da Estrela'	3377 cm-1 *stretching* N-H e O-H *stretching* 2954 cm^{-1} C-H(CH3), *stretching*, p 2920 e 2850 cm^{-1} *stretching anti-simetric/simetric, m, m*	1741cm^{-1} C=O, *stretching, g* 1641 cm-1 C=O, *stretching* (Amida I),p 1537 cm-1 C-NH, *bending* (Amida II), p	1463 cm^{-1} -CH_2 *scissoring, m* 1165 cm^{-1} C-O, *bending (ester), m* 1097 cm^{-1} P=O, *stretching e C-O elongation, m* 673 cm^{-1} C-H *bending* de compostos insaturados, *g*	

[1]Intensidade de banda: p - pequena, m - média, g – grande

Concluindo, de um modo geral, existiram diferenças significativas na intensidade das bandas entre as 3 amostras de leite.

A determinação dos espetros de infravermelho por FTIR para os queijos, produzidos com leite de variadas origens (queijo de ovelha, queijo de mistura, queijo de vaca, queijo de cabra), foi efetuada com espetrómetro de infravermelho por transformada de Fourier (Shimadzu, Japão) acoplado de um acessório de reflexão total atenuada (ATR) (Shimadzu, Japão). Para cada análise a amostra foi irradiada com radiação de infravermelho de 4000 a 500 cm^{-1}, no modo de transmitância.

Além do queijo de ovelha da região da Serra da Estrela (queijo Serra da Estrela DOP) principal objeto do projeto, foram também considerados no presente estudo o queijo de mistura, queijo de vaca e queijo de cabra, para efeitos comparativos e discriminatórios. Pretendendo-se através da análise espectroscópica de FTIR avaliar a existência ou não de diferenças entre as diferentes qualidades de queijo da zona da Serra de o queijo Serra da Estrela DOP, como técnica analítica complementar de garantia de genuinidade e qualidade deste.

Este estudo foi iniciado com a análise do queijo da ovelha desta região (Queijos Tavares, S.A., região de Seia), cujo espectro de infravermelho é apresentado na **Figura 11**. O espectro de infravermelho do queijo de ovelha revelou um conjunto variado de bandas de várias intensidades que podem ser atribuídos a variados grupos funcionais. De forma a facilitar a interpretação do espectro, foram selecionadas 3 regiões discriminantes (I a III) (Karoui *et al.*, 2005): a região I de 3000 a 2800 cm^{-1}; a região II de 1700 a 1500 cm^{-1} e a região III de 1500 a 500 cm^{-1}.

Na zona anterior à região I é possível observar uma banda larga em torno de 3300 cm^{-1} que corresponde a vibração *streching* O-H indicando a presença de água. Uma vez que a presença de água no queijo é variável em função de condições de conservação e maturação,

PDR 2020 PROGRAMA DE DESENVOLVIMENTO RURAL 2014·2020
PORTUGAL 2020
UNIÃO EUROPEIA Fundo Europeu Agrícola de Desenvolvimento Rural A Europa Investe nas Zonas Rurais

esta banda não pode ser usada como fator de discriminação (Karoui *et al*. 2007), portanto não foi incluída nas regiões atrás consideradas.

A região I (3000 a 2800 cm^{-1}) onde é possível observar as bandas 2916 e 2848 cm^{-1} correspondentes a C-H do metileno modo *streching* anti-simetrico e simétrico, respetivamente e também banda mais fraca a 2964 cm^{-1}correspondente ao modo *streching* do C-H dos metilos terminais, relacionadas com a presença de ácidos gordos (Karoui *et al*., 2005; Karoui *et al*., Dufour *et al*., 2000). Estas bandas podem apresentar intensidades variáveis consoante o tipo de queijo.

A região II (1700 a 1500 cm^{-1}) mostra primeiramente a banda com intensidade elevada a 1741 cm^{-1}correspondente a vibração *stretching* de C=O indicando a presença de ácidos carboxílicos, nomeadamente ácidos gordos, aldeídos e ésteres. A presença das bandas 1643 e 1548 cm^{-1} é relacionada com o grupo funcional amida das proteínas (Karoui *et al*., 2005; Karoui et al., 2004; Mazerolles *et al*., 2001), sendo a 1643 cm^{-1} identificada com a vibração *stretching* de C=O, também designada de Amida I e a 1548 cm^{-1} com o modo *bending* de N-H, designada de Amida II. A elevada intensidade destas bandas é uma evidência da presença de proteínas, da sua estrutura secundária e estado de agregação (Mazerolles *et al*., 2001).

A região III (1500 a 500 cm^{-1}) corresponde à zona da impressão digital, nesta é possível observar numerosas pequenas bandas correspondentes às cadeias laterais de aminoácidos, nomeadamente entre 1153 e 900 cm^{-1} onde se localizam vibrações de *stretching* de C-O e C-C, e também diversas vibrações de modo bendind, 1462 cm^{-1}(H-C-O,*bending*),1406 cm^{-1}(C-C-H, *bending*), 1238 cm^{-1}(C-C-H,*bending*), 1172 cm^{-1}(C-O,bending(grupo ester)(Karoui *et al*., 2007). Adicionalmente ainda é possível observar as bandas 1118 e 1060 cm^{-1} correspondentes ao grupo P=O de compostos fosforados (Karoui *et al*., 2007) e também a 983 a banda correspondente ao modo C-H, *out-of-plane deformation*, indicando a presença de aminoácidos insaturados. Nesta região ainda é possível observar a banda larga e intensa a 650 cm^{-1} correspondente a C-H *bending* de compostos insaturados (incluindo alcenos) e aromáticos, apesar da sua intensidade não permitir a distinção espectroscópica ente diferentes tipo de queijo.

PDR 2020 PROGRAMA DE DESENVOLVIMENTO RURAL 2014·2020
PORTUGAL 2020
UNIÃO EUROPEIA Fundo Europeu Agrícola de Desenvolvimento Rural A Europa Investe nas Zonas Rurais

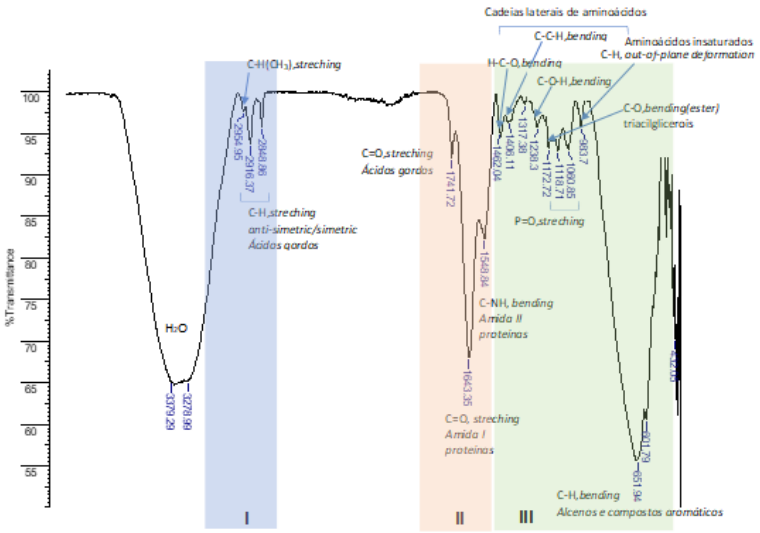


Figura 11. Espectro de infravermelho de amostra QOC1 (Queijo de ovelha curado). Azul-Região I; rosa Região II; verde- Região III.

Adicionalmente, foi efetuada uma análise por infravermelho de outros tipos de queijo, com o objetivo de simular possíveis situações de adulteração de queijo de ovelha, com leite de vaca e/ou de cabra e identificar possíveis diferenças entre estes queijos e o de queijo exclusivamente constituído por leite de ovelha (queijo de Serra da Estrela). Aqui vão ser apresentados de forma resumida a comparação entre os espectros obtidos desta análise.

Inicialmente, efetuou-se a comparação do queijo de ovelha com amostras de queijo de mistura produzido através de leite de ovelha, cabra e vaca (Continente, SONAE). Os resultados obtidos encontram-se resumidos na **Figura 12** e **Tabela 6**.

Na **Tabela 6** destacam-se apenas as zonas do espectro consideradas como discriminantes (região I a III). A análise do espectro de infravermelho e respetiva tabela mostram que a diferença entre os espectros dos 2 queijos se centra na região III e nas várias pequenas bandas correspondentes às cadeias laterais de aminoácidos, nomeadamente entre 1153 e 900 cm^{-1} onde se localizam vibrações de *stretching* de C-O e C-C, e também diversas vibrações de modo *bendind*, as bandas 1116 e 1058 cm^{-1} correspondentes ao grupo P=O de fosfolipídeos e também a 983 cm^{-1} a banda correspondente ao modo C-H, *out-of-plane deformation*, indicando a presença de aminoácidos insaturados. Constatou-se que, de um modo geral, para o leite de ovelha as bandas descritas foram bastante menos intensas do que no caso do queijo de mistura. Não se constatou o aparecimento de novas bandas significativas na amostra de queijo de mistura.

PDR 2020 PROGRAMA DE DESENVOLVIMENTO RURAL 2014·2020
PORTUGAL 2020
UNIÃO EUROPEIA
Fundo Europeu Agrícola de Desenvolvimento Rural
A Europa Investe nas Zonas Rurais

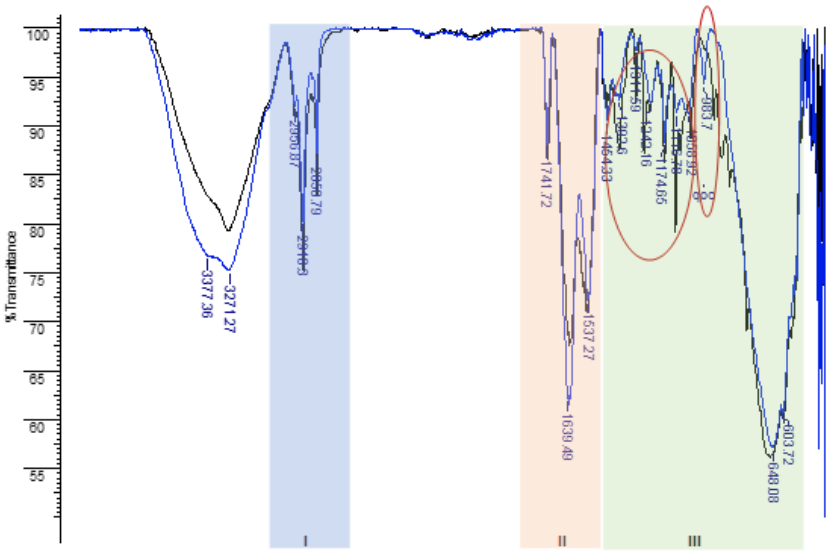


Figura 12. Comparação das amostras: queijo de ovelha curado (azul) *vs*. queijo de mistura (preto). Azul-Região I; rosa- Região II; verde- Região III.

Tabela 6. Comparação das amostras: queijo de ovelha curado *vs.* queijo de mistura, em função das zonas discriminantes do espectro: Região I; Região II; Região III[1]

Amostras	Região I	Região II	Região III	Observações
Queijo de ovelha curado	2956 cm^{-1} C-H(CH3),stretching,p 2910 e 2850 cm^{-1} *streching anti-simetric/simetric,m,m*	1741 cm^{-1} C=O,*stretching,m* 1639 cm-1 C=O, stretching(Amida I),g 1537 cm-1 C-NH, bending(Amida II),g	1454 cm^{-1} H-C-O,*bending,p* 1392 cm^{-1} C-C-H,*bending,p* 1242 cm^{-1} C-O-H,*bending,p* 1174 cm^{-1} C-O,*bending(ester),p* 1116 e 1058 cm^{-1} P=O,*streching,p* 983 cm^{-1} C-H, *out-of-plane deformation ,m*	A diferença entre os espectros dos queijos é na zona III, que corresponde a diferenças ao nível da presença de aminoácidos e aminoácidos insaturados e compostos fosfatados
Queijo de mistura	2956 cm^{-1} C-H(CH3),stretching,p 2910 e 2850 cm^{-1} *streching anti-simetric/simetric,m,m*	1741 cm^{-1} C=O,*streching,m* 1639 cm-1 C=O, stretching(Amida I),g 1537 cm-1 C-NH, bending(Amida II),g	1454 cm^{-1} H-C-O,*bending,m* 1392 cm^{-1} C-C-H,*bending,m* 1242 cm^{-1} C-O-H,*bending,m* 1174 cm^{-1} C-O,*bending(ester),p* 1116 e 1058 cm^{-1} P=O,*streching,m*	

[1]Intensidade de banda:p-pequena,m-média,g-grande

A comparação da análise do queijo de ovelha com amostras de queijo de vaca (Queijos Tavares, S.A., região Seia) é mostrada na **Figura 13** e **Tabela 7**, destacando-se apenas as zonas do espectro consideradas como discriminantes (região I a III). A análise dos resultados mostrou que a diferença entre os espectros dos 2 queijos se centra na região III. Na zona correspondente a 1153 e 900 cm^{-1} onde se localizam as várias pequenas bandas correspondentes às cadeias laterais de aminoácidos, como vibrações de *stretching* de C-O e C-C, e também diversas vibrações de modo *bendind*, as diferenças foram pouco significativas. Em relação às bandas 1116 e 1058 cm^{-1} correspondentes ao grupo P=O de fosfolipídeos e também a 983 cm^{-1} à banda correspondente ao modo C-H, *out-of-plane deformation*, indicam a

PDR 2020 PROGRAMA DE DESENVOLVIMENTO RURAL 2014·2020
PORTUGAL 2020
UNIÃO EUROPEIA Fundo Europeu Agrícola de Desenvolvimento Rural
A Europa Investe nas Zonas Rurais

presença de aminoácidos insaturados, tendo-se verificado uma menor intensidade no espectro do queijo de vaca. Concluindo, de um modo geral, não existiu diferença acentuada entre as 2 amostras de queijo, exceto no caso das bandas referenciadas, em que para o queijo de ovelha são mais intensas do que no caso do queijo de vaca. Não se constatou o aparecimento de novas bandas significativas na amostra de queijo de vaca.

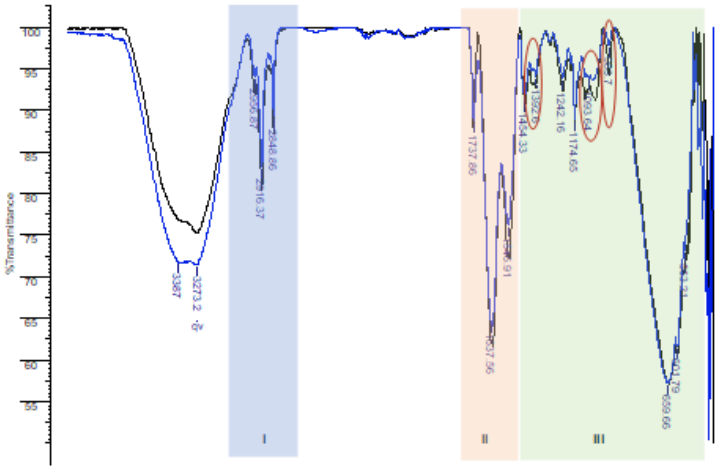


Figura 13. Comparação das amostras: queijo de vaca (azul) *vs*. queijo ovelha (preto). Azul-Região I; rosa- Região II; verde- Região III.

Tabela 7. Comparação das amostras: queijo de ovelha curado *vs* queijo de vaca, em função das zonas discriminantes do espectro: Região I; Região II; Região III[1]

Amostras	Região I	Região II	Região III	Observações
Queijo de ovelha curado	2956 cm^{-1} C-H(CH3),stretching,p 2910 e 2850 cm^{-1} *streching anti-simetric/simetric,m,m*	1741 cm^{-1} C=O,*stretching,m* 1639 cm-1 C=O, stretching(Amida I),g 1537 cm-1 C-NH, bending(Amida II),g	1454 cm^{-1} H-C-O,*bending,p* 1392 cm^{-1} C-C-H,*bending,p* 1242 cm^{-1} C-O-H,*bending,p* 1174 cm^{-1} C-O,*bending(ester),p* 1116 e 1058 cm^{-1} P=O,*streching,p* 983 cm^{-1} C-H, *out-of-plane deformation ,m*	A diferença entre os espectros dos queijos é na zona III, que corresponde a diferenças ao nível da presença de aminoácidos e aminoácidos insaturados e compostos fosfatados
Queijo de vaca	2956 cm^{-1} C-H(CH3),stretching,p 2916 e 2848 cm^{-1} *streching anti-simetric/simetric,m,m*	1737 cm^{-1} C=O,*streching,m* 1637 cm-1 C=O, stretching(Amida I),g 1546 cm-1 C-NH, bending(Amida II),g	1454 cm^{-1} H-C-O,*bending,m* 1392 cm^{-1} C-C-H,*bending,m* 1242 cm^{-1} C-O-H,*bending,m* 1174 cm^{-1} C-O,*bending(ester),p* 1093 e 1058 cm^{-1} P=O,*streching,m* 983 cm^{-1} C-H, *out-of-plane deformation ,p*	

[1]Intensidade de banda:p-pequena,m-média,g-grande

Foram comparados espectroscopicamente o queijo de ovelha com o queijo de cabra (Queijos Lagos, região de Seia). Os resultados obtidos (apenas as zonas do espectro consideradas como discriminantes - região I a III) são mostrados na **Figura 14** e na **Tabela 8**.

PDR 2020 PROGRAMA DE DESENVOLVIMENTO RURAL 2014·2020
PORTUGAL 2020
UNIÃO EUROPEIA Fundo Europeu Agrícola de Desenvolvimento Rural
A Europa Investe nas Zonas Rurais

Foram detetadas diferenças entre os espectros dos 2 queijos, centrando-se estas na região I e III. Para a região I as bandas de 2956 a 2850 cm^{-1}, correspondentes a modos C-H *streching*, atribuídas à presença de ácidos gordos, foram marcadamente mais intensas para o queijo de ovelha. Na região III a diferença foi fundamentalmente nas bandas 1174cm^{-1} C-O, *bending*(ester), 1116 e 1058 cm^{-1} P=O, *streching*, indicando a presença de aminoácidos insaturados e compostos fosforados, respetivamente, tendo sido mais intensas para o caso do queijo de ovelha. Concluiu-se que, de um modo geral, a diferença existente entre as 2 amostras de queijo foi, no caso das bandas referenciadas para o queijo de ovelha, mais intensa do que no caso do queijo de cabra. Não se constatou o aparecimento de novas bandas significativas na amostra de queijo de vaca.

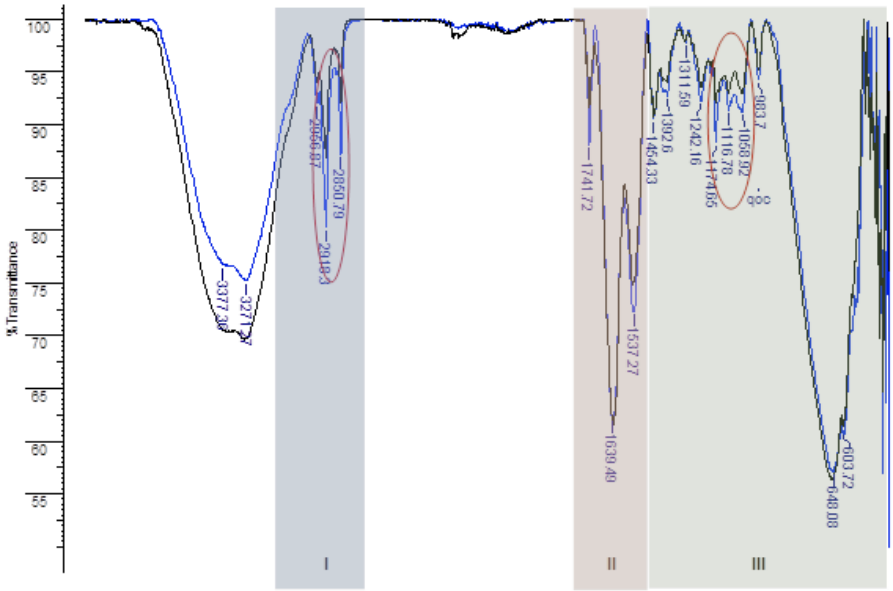


Figura 14. Comparação das amostras: queijo de ovelha curado (azul) *vs.* queijo cabra (preto).

Tabela 8. Comparação das amostras: queijo de ovelha curado *vs* queijo de cabra, em função das zonas discriminantes do espectro: Região I; Região II; Região III[1]

Amostras	Região I	Região II	Região III	Observações
Queijo de ovelha curado	2956 cm^{-1} C-H(CH3),stretching,p 2910 e 2850 cm^{-1} C-H *streching anti-simetric/simetric,m,m*	1741 cm^{-1} C=O,*stretching,m* 1639 cm-1 C=O, stretching(Amida I),g 1537 cm-1 C-NH, bending(Amida II),g	1454 cm^{-1} H-C-O,*bending,p* 1392 cm^{-1} C-C-H,*bending,p* 1242 cm^{-1} C-O-H,*bending,p* 1174 cm^{-1} C-O,*bending(ester),p* 1116 e 1058 cm^{-1} P=O,*streching,p* 983 cm^{-1} C-H, *out-of-plane deformation ,m,m*	A diferença entre os espectros dos queijos é na zona I e III. Corresponde a diferenças ao nível de presença de ácidos gordos, aminoácidos insaturados e compostos fosfatados
Queijo de cabra	2956 cm^{-1} C-H(CH3),stretching,p 2918 e 2850 cm^{-1} *streching anti-simetric/simetric,p,p*	1741 cm^{-1} C=O,*streching,m* 1639 cm-1 C=O, stretching(Amida I),g 1537 cm-1 C-NH, bending(Amida II),g	1454 cm^{-1} H-C-O,*bending,m* 1392 cm^{-1} C-C-H,*bending,m* 1242 cm^{-1} C-O-H,*bending,m* 1174 cm^{-1} C-O,*bending(ester),mp*	

			1093 e 1058 cm^{-1} P=O,*streching,p,p* 983 cm^{-1} C-H, *out-of-plane deformation ,p*	

[1]Intensidade de banda: mp-muito pequena,p-pequena,m-média,g-grande

Posteriormente, procedeu-se à recolha de amostras de queijo Serra da Estrela de certificação DOP que vão servir de referência e à sua consequente análise por espectroscopia FTIR-MIR, para inferir da autenticidade do queijo Serra da Estrela DOP.

Para os queijos Serra da Estrela de certificação DOP foram consideradas as amostras de queijo da empresa Vale de Estrela, queijaria artesanal Paulo Rogério, queijaria dos Lobos e empresa Maratona de Delícias de Alvoco das Várzeas, para efeitos comparativos e discriminatórios de outras amostras de queijo a analisar no futuro. Pretendeu-se, através da análise espectroscópica de FTIR, avaliar a existência ou não de diferenças entre as diferentes qualidades de queijo da zona da Serra de Estrela de certificação DOP, como técnica analítica complementar de garantia de genuinidade e qualidade deste.

Este estudo foi iniciado com a análise do queijo de ovelha Serra da Estrela de certificação DOP (empresa Vale de Estrela), cujo espectro de infravermelho é apresentado na **Figura 15**. O espectro de infravermelho do queijo de ovelha Serra da Estrela de certificação DOP (empresa Vale de Estrela), revelou um conjunto variado de bandas de várias intensidades que podem ser atribuídos a variados grupos funcionais. De forma a facilitar a interpretação do espectro, foram selecionadas 3 regiões discriminantes (I a III) (Karoui *et al*., 2005): a região I de 3000 a 2800 cm^{-1}; a região II de 1700 a 1500 cm^{-1} e a região III de 1500 a 500 cm^{-1}.

Na zona anterior à região I é possível observar uma banda larga em torno de 3300 cm^{-1} que corresponde a vibração *streching* O-H indicando a presença de água; uma vez que a presença de água no queijo é variável em função de condições de conservação e maturação esta banda não pode ser usada como fator de discriminação (Karoui *et al*., 2007) portanto não foi incluída nas regiões atrás consideradas.

A região I (3000 a 2800 cm^{-1}) onde é possível observar as bandas 2920 e 2850 cm^{-1} correspondentes a C-H do metileno modo *streching* anti-simetrico e simétrico, respetivamente e também banda mais fraca a 2956 cm^{-1}correspondente ao modo *streching* do C-H dos metilos terminais, estão relacionadas com a presença de ácidos gordos (Karoui *et al*., 2005; Karoui *et al*., 2004).

A região II (1700 a 1500 cm^{-1}) mostra primeiramente a banda com intensidade elevada a 1743 cm^{-1} correspondente a vibração *stretching* de C=O indicando a presença de ácidos

carboxílicos, nomeadamente ácidos gordos, aldeídos e ésteres. A presença das bandas 1643 e 1548 cm^{-1} está relacionada com o grupo funcional amida das proteínas (Karoui *et al*., 2005; Karoui *et al*., 2004; Mazerolles *et al*., 2001; Karoui *et al*., 2005), sendo a 1643 cm^{-1} identificada com a vibração *stretching* de C=O, também designada de Amida I e a 1548 cm^{-1} com o modo *bending* de N-H, designada de Amida II. A elevada intensidade destas bandas é uma evidência da presença de proteínas, da sua estrutura secundária e estado de agregação (Mazerolles *et al*. 2001).

A região III (1500 a 500 cm^{-1}) corresponde à zona da impressão digital, nesta é possível observar numerosas pequenas bandas correspondentes às cadeias laterais de aminoácidos, nomeadamente entre 1153 e 900 cm^{-1} onde se localizam vibrações de *stretching* de C-O e C-C, e também diversas vibrações de modo *bending*, 1454 cm^{-1}(H-C-O,*bending*),1400 cm^{-1}(C-C-H, *bending*),1238 cm^{-1}(C-C-H,*bending*),),1120 cm^{-1}(C-O,bending(grupo ester)[2]. Adicionalmente ainda é possível observar as bandas 1120 e 1060 cm^{-1} correspondentes ao grupo P=O de compostos fosforados e também a 983 a banda correspondente ao modo C-H, *out-of-plane deformation*, indicando a presença de aminoácidos insaturados. Nesta região ainda é possível observar a banda larga e intensa a 648 cm^{-1} correspondente a C-H *bending* de compostos insaturados (incluindo alcenos) e aromáticos, apesar da sua intensidade não permitir a distinção espectroscópica entre diferentes tipo de queijo.

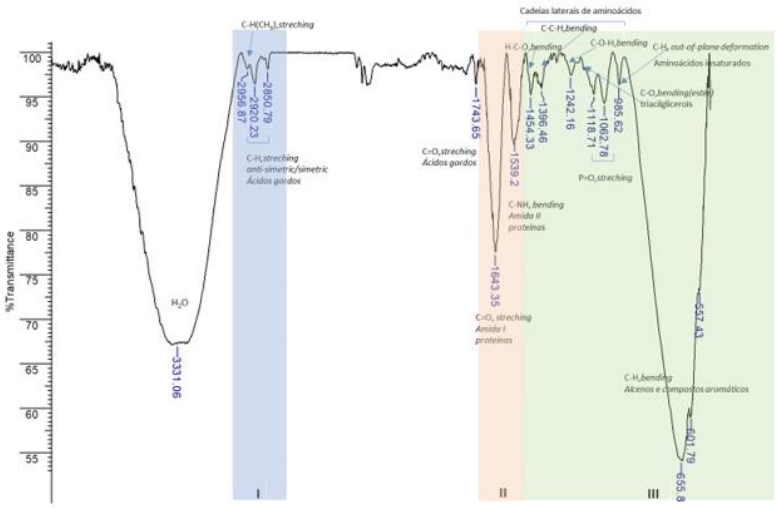


Figura 15. Espectro de infravermelho de amostra DOP1 (queijo de ovelha Serra da Estrela de certificação DOP (empresa Vale de Estrela). Azul-Região I; rosa- Região II; verde- Região III.

Adicionalmente, foi efetuado a análise por infravermelho de outras amostras de queijo Serra de Estrela de certificação DOP, como a da queijaria artesanal Paulo Rogério, queijaria dos Lobos e empresa Maratona de Delícias de Alvoco das Várzeas. O objetivo era obter informação

PDR 2020 PROGRAMA DE DESENVOLVIMENTO RURAL 2014·2020
PORTUGAL 2020
UNIÃO EUROPEIA
Fundo Europeu Agrícola de Desenvolvimento Rural
A Europa Investe nas Zonas Rurais

de 4 tipos de queijo de Serra de Estrela de certificação DOP, para obter informação de constituição e possíveis diferenças entre estes queijos. Aqui vai ser apresentada, de forma resumida, a informação espectroscópica destes em comparação com a amostra de queijo de ovelha Serra da Estrela de certificação DOP da empresa Vale de Estrela e a comparação espectroscópica entre as quatro amostras de certificação DOP.

Inicialmente foi efetuada a comparação do queijo de ovelha Serra da Estrela de certificação DOP da empresa Vale de Estrela com amostras de queijo da queijaria artesanal Paulo Rogério. Os resultados obtidos encontram-se resumidos na **Figura 16** e na **Tabela 9**.

na **Figura 16** e na **Tabela 9** destacam-se apenas as zonas do espectro consideradas como discriminantes (região I a III). A análise do espectro de infravermelho e respetiva tabela mostra que a diferença entre os espectros dos 2 queijos se centra na região III. Nesta zona III estas amostras distinguem-se nas bandas correspondentes às cadeias laterais de aminoácidos, nomeadamente entre 1170 e 1118 cm^{-1} onde se localizam vibrações C-O,*bending*(grupo ester),associado a triacilgliceróis. Constatou-se que de um modo geral, os espectros dos 2 queijos são semelhantes, à exceção da pequena nova banda na zona de 1170 cm^{-1} descrita para o caso queijo da queijaria artesanal Paulo Rogério.

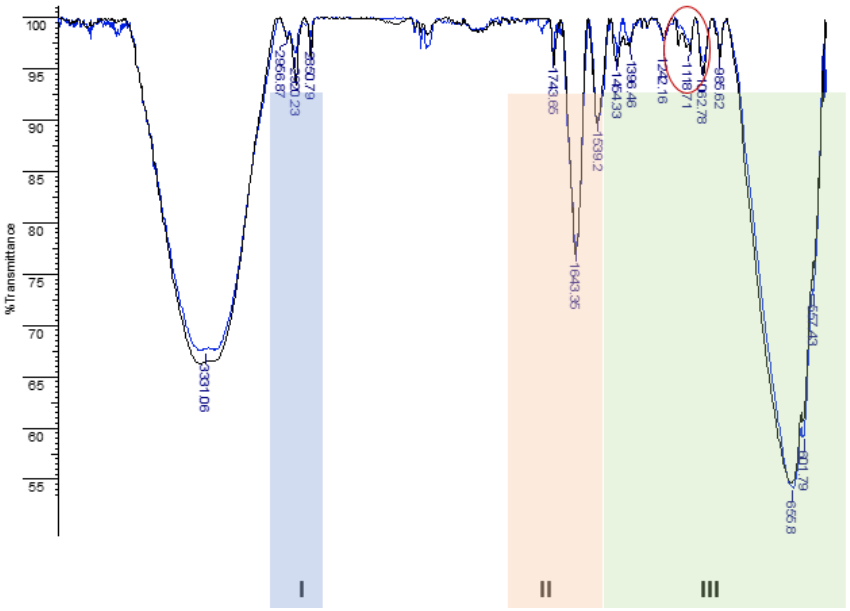


Figura 16. Comparação das amostras: queijo de ovelha Serra da Estrela de certificação DOP da empresa Vale de Estrela (azul) *vs.* queijo da queijaria artesanal Paulo Rogério (preto). Azul-Região I; rosa- Região II; verde- Região III.

PDR 2020 PROGRAMA DE DESENVOLVIMENTO RURAL 2014·2020
PORTUGAL 2020
UNIÃO EUROPEIA Fundo Europeu Agrícola de Desenvolvimento Rural
A Europa Investe nas Zonas Rurais

Tabela 9. Comparação das amostras: queijo de ovelha Serra da Estrela de certificação DOP da empresa Vale de Estrela *vs*. queijo da queijaria artesanal Paulo Rogério, em função das zonas discriminantes do espectro: Região I; Região II; Região III[1] (Woodcock *et al*., 2008)

Amostras	Região I	Região II	Região III	Observações
Queijo certificação DOP de Serra da Estrela da empresa Vale de Estrela	2965 cm^{-1} C-H(CH3),stretching,p 2920 e 2850 cm^{-1} *streching anti-simetric/simetric,m,m,p*	1743cm^{-1} C=O,*stretching,m* 1643 cm-1 C=O, stretching(Amida I),g 1539 cm-1 C-NH, bending(Amida II),g	1454 cm^{-1} H-C-O,*bending,p* 1396 cm^{-1} C-C-H,*bending,p* 1242cm^{-1} C-O-H,*bending,p* 1118 e 1062 cm^{-1} P=O,*streching,p* 985cm^{-1} C-H, *out-of-plane deformation ,m*	A diferença entre os espectros dos queijos é na zona III, que corresponde a diferenças ao nível da presença de aminoácidos
Queijo certificação DOP da queijaria artesanal Paulo Rogério	2965 cm^{-1} C-H(CH3),stretching,p 2920 e 2850 cm^{-1} *streching anti-simetric/simetric,m,m*	1743 cm^{-1} C=O,*streching,m* 1643 cm-1 C=O, stretching(Amida I),g 1539cm-1 C-NH, bending(Amida II),g	1454 cm^{-1} H-C-O,*bending,p* 1396cm^{-1} C-C-H,*bending,p* 1242 cm^{-1} C-O-H,*bending,p* 1170cm^{-1} C-O,*bending(ester),p* 1118 e 1062 cm^{-1} P=O,*streching,p* 985 cm^{-1} C-H, *out-of-plane deformation ,m*	

[1]Intensidade de banda:p-pequena,m-média,g-grande

Foi analisada a amostra de queijo da queijaria dos Lobos e esta comparada com queijo de ovelha Serra da Estrela de certificação DOP da empresa Vale de Estrela. A comparação destas amostras é ilustrada na **Figura 17** e na **Tabela 10**.

Os resultados obtidos da comparação do espectro de infravermelho (**Figura 17**) e respetiva tabela (**Tabela 10**) mostram que a diferença entre os espectros dos 2 queijos se centra na região I. Para a região I a banda de 2964 cm^{-1} correspondente ao modo C-H(CH3), *stretching*, atribuída à presença de ácidos gordos, foi marcadamente mais larga para o queijo da queijaria dos Lobos, mostrando uma constituição um pouco diferente em termos do tipo de ácidos gordos. De um modo geral, as amostras foram idênticas, sendo a pequena diferença existente entre as 2 amostras de queijo as bandas referenciadas para os grupos terminais dos ácidos gordos. Não se constatou o aparecimento de novas bandas significativas na amostra do queijo da queijaria dos Lobos.

PDR 2020 PROGRAMA DE DESENVOLVIMENTO RURAL 2014·2020
PORTUGAL 2020
UNIÃO EUROPEIA Fundo Europeu Agrícola de Desenvolvimento Rural
A Europa Investe nas Zonas Rurais

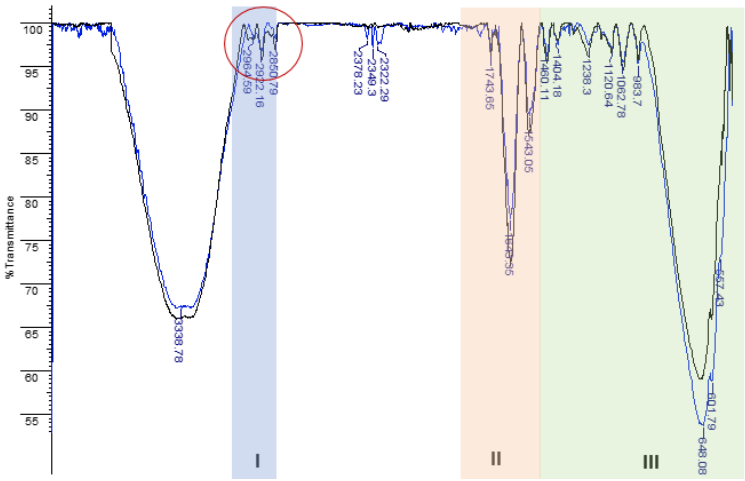


Figura 17. Comparação das amostras: queijo de ovelha Serra da Estrela de certificação DOP da empresa Vale de Estrela (azul) *vs.* queijo queijaria dos Lobos (preto). Azul-Região I; rosa- Região II; verde- Região III.

Tabela 10. Comparação das amostras: queijo de ovelha Serra da Estrela de certificação DOP da empresa Vale de Estrela *vs.* queijo da queijaria dos Lobos, em função das zonas discriminantes do espectro: Região I; Região II; Região III[1] (Woodcock *et al.*, 2008)

Amostras	Região I	Região II	Região III	Observações
Queijo certificação DOP de Serra da Estrela da empresa Vale de Estrela	2964cm^{-1} C-H(CH3),stretching,p 2922 e 2850 cm^{-1} *streching anti-simetric/simetric,m,m,p*	1743cm^{-1} C=O,*stretching,m* 1643 cm-1 C=O, stretching(Amida I),g 1543 cm-1 C-NH, bending(Amida II),g	1460 cm^{-1} H-C-O,*bending,p* 1404cm^{-1} C-C-H,*bending,p* 1238cm^{-1} C-O-H,*bending,p* 1120 e 1062 cm^{-1} P=O,*streching,p* 983cm^{-1} C-H, *out-of-plane deformation ,m*	A diferença entre os espectros dos queijos é na zona I, que corresponde a diferenças ao nível da presença de ácidos gordos
Queijo certificação DOP da queijaria dos Lobos	2964cm^{-1} C-H(CH3),stretching,larga,p 2922 e 2850 cm^{-1} *streching anti-simetric/simetric,m,m*	1743 cm^{-1} C=O,*streching,m* 1643 cm-1 C=O, stretching(Amida I),g 1543cm-1 C-NH, bending(Amida II),g	1460 cm^{-1} H-C-O,*bending,p* 1404cm^{-1} C-C-H,*bending,p* 1238 cm^{-1} C-O-H,*bending,p* 1120 e 1062 cm^{-1} P=O,*streching,p* 983 cm^{-1} C-H, *out-of-plane deformation ,m*	

[1]Intensidade de banda:p-pequena,m-média,g-grande

Para finalizar foi ainda estudado espectroscopicamente o queijo de certificação DOP da empresa Maratona de Delícias de Alvoco das Várzeas e o queijo de ovelha Serra da Estrela de certificação DOP da empresa Vale de Estrela. A comparação destas amostras está ilustrada na **Figura 18** e na **Tabela 11**. Os resultados obtidos mostram que a diferença entre os espectros dos 2 queijos se centra na região III. Na região III a diferença é fundamentalmente nas bandas 1174 cm^{-1} C-O,*bending*(ester), 1120 e cm-1 P=O, *streching*, indicando diferenças nas cadeias de aminoácidos, triacilglicerois e compostos fosforados, respetivamente. Em suma, as amostras são semelhantes, e a única diferença significativa encontra-se para o queijo da empresa Maratona de Delícias de Alvoco das Várzeas no aparecimento da nova banda 1174 cm^{-1},

PDR 2020 PROGRAMA DE DESENVOLVIMENTO RURAL 2014·2020
PORTUGAL 2020
UNIÃO EUROPEIA Fundo Europeu Agrícola de Desenvolvimento Rural
A Europa Investe nas Zonas Rurais

enquanto que para o queijo certificação DOP de Serra da Estrela da empresa Vale de Estrela a banda 1120 e cm^{-1} é muito mais intensa.

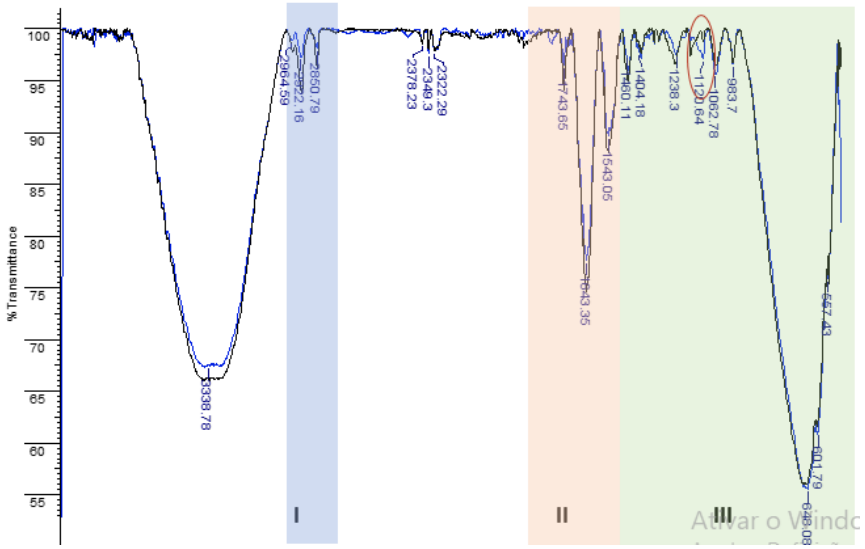


Figura 18. Comparação das amostras: queijo de ovelha Serra da Estrela de certificação DOP da empresa Vale de Estrela (azul) *vs* queijo da empresa Maratona de Delícias de Alvoco das Várzeas (preto). Azul-Região I; rosa- Região II; verde- Região III.

Tabela 11. Comparação das amostras: queijo de ovelha Serra da Estrela de certificação DOP da empresa Vale de Estrela *vs*. queijo da empresa Maratona de Delícias de Alvoco das Várzeas, em função das zonas discriminantes do espectro: Região I; Região II; Região III[1] (Woodcock *et al*., 2008)

Amostras	Região I	Região II	Região III	Observações
Queijo certificação DOP de Serra da Estrela da empresa Vale de Estrela	2964cm^{-1} C-H(CH3),stretching,p 2922 e 2850 cm^{-1} *streching anti-simetric/simetric,m,m,p*	1743cm^{-1} C=O,*stretching,m* 1643 cm-1 C=O, stretching(Amida I),g 1543 cm-1 C-NH, bending(Amida II),g	1460 cm^{-1} H-C-O,*bending,p* 1404cm^{-1} C-C-H,*bending,p* 1238cm^{-1} C-O-H,*bending,p* 1120 e 1062 cm^{-1} P=O,*streching,p* 983cm^{-1} C-H, *out-of-plane deformation ,m*	A diferença entre os espectros dos queijos é na zona III Correspondendo a diferenças a nível de presença de presença de aminoácidos e triacilglicerois
Queijo certificação DOP empresa Maratona de Delícias de Alvoco das Várzeas	2964cm^{-1} C-H(CH3),stretching,larga,p 2922 e 2850 cm^{-1} *streching anti-simetric/simetric,m,m*	1743 cm^{-1} C=O,*streching,m* 1643 cm-1 C=O, stretching(Amida I),g 1543cm-1 C-NH, bending(Amida II),g	1460 cm^{-1} H-C-O,*bending,p* 1404cm^{-1} C-C-H,*bending,p* 1238 cm^{-1} C-O-H,*bending,p* 1170cm^{-1} C-O,*bending(ester),p* 1120 e 1062 cm^{-1} P=O,*streching,p* 983 cm^{-1} C-H, *out-of-plane deformation ,m*	

[1]Intensidade de banda:p-pequena,m-média,g-grande

Para completar esta abordagem é mostrada a comparação espectroscópica entre as quatro amostras de certificação DOP na **Figura 19**. Esta comparação permitiu concluir que, de um modo geral, as amostras são semelhantes, distinguindo-se pequenas diferenças na região I e III. Na região I a banda de 2964 cm^{-1} correspondente a modo C-H(CH3), *stretching*, atribuída à presença de ácidos gordos, foi marcadamente mais larga para uma das amostras. Para a

PROGRAMA DE DESENVOLVIMENTO RURAL 2014·2020
PORTUGAL 2020
UNIÃO EUROPEIA
Fundo Europeu Agrícola de Desenvolvimento Rural
A Europa Investe nas Zonas Rurais

região III, observaram-se pequenas diferenças de intensidade entre as amostras e o aparecimento da nova banda pequena a 1174 cm^{-1} para algumas amostras, indicando diferenças nas cadeias de aminoácidos, triacilglicerois e compostos fosforados.

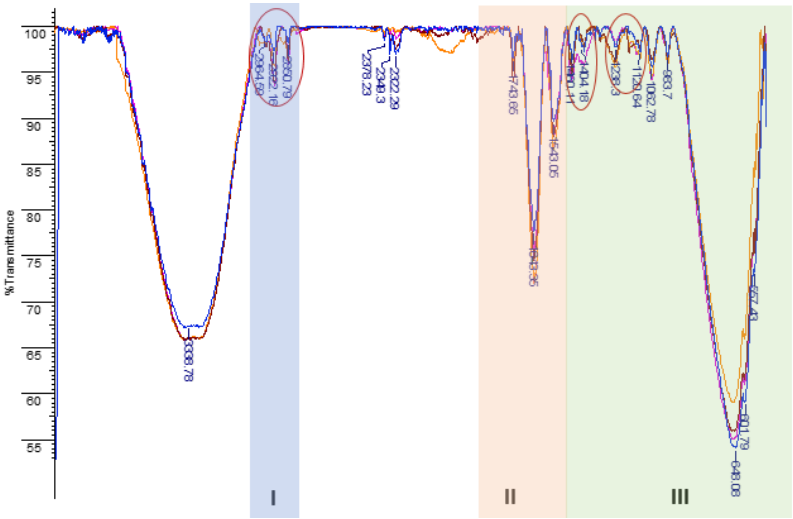


Figura 19. Comparação das amostras: Queijo Serra da Estrela DOP (azul); Queijo de ovelha curado (queijaria artesanal Paulo Rogério) (rosa); Queijo de ovelha curado (queijaria dos Lobos) (amarelo); Queijo de ovelha curado (empresa Maratona Delícias, Alvoco das Várzeas) (vermelho). Azul-Região I; rosa- Região II; verde- Região III.

Para além dos queijos de ovelha da região da Serra da Estrela de certificação DOP, principal objeto do projeto, foi também verificado quais as diferenças fundamentais entre queijos de ovelha da região da Serra da Estrela de certificação DOP e os queijos de mistura, queijo de vaca, queijo de cabra e queijo de ovelha da Serra da Estrela sem certificação DOP, analisados num período anterior ao presente entregável, de forma a registar as zonas discriminantes e identificadoras de genuinidade.

Neste contexto, é aqui apresentada a comparação da amostra de queijo de ovelha Serra da Estrela de certificação DOP da empresa Vale de Estrela com queijo de mistura produzido através de leite de ovelha, cabra e vaca (Continente, SONAE). Os resultados obtidos (apenas as zonas do espectro consideradas como discriminantes, região I a III) encontram-se resumidos na **Figura 20** e **Tabela 12**. Os resultados mostraram que a diferença entre os espectros dos 2 queijos se centra na região I e III. Para a zona I observou-se como principal diferença a maior intensidade para o queijo de mistura correspondente às bandas de 2920 e 2850 cm^{-1} correspondentes a C-H do metileno modo *streching* anti-simetrico e simétrico, respetivamente e também para a banda a 2956 cm^{-1}correspondente ao modo *streching* do C-H dos metilos terminais, relacionadas com a presença de ácidos gordos. No caso da zona III, a diferença centra-se em várias bandas, nomeadamente na intensa a 1174 cm-1 C-O,*bending* (ester),

PROGRAMA DE DESENVOLVIMENTO RURAL 2014·2020
PORTUGAL 2020
UNIÃO EUROPEIA
Fundo Europeu Agrícola de Desenvolvimento Rural
A Europa Investe nas Zonas Rurais

atribuída à presença de triacilglicerois que no queijo de mistura está presente e no queijo ovelha Serra da Estrela de certificação DOP está ausente. As bandas de 1120 cm^{-1} (C-O,*bending*(grupo ester) e 1060 cm^{-1} correspondentes ao grupo P=O de compostos fosforados, no queijo de mistura apresentam-se mais intensas do que no queijo ovelha Serra da Estrela de certificação DOP. Relativamente à banda 985 cm^{-1} sucede o oposto, correspondente ao modo C-H, *out-of-plane deformation*, indicando a presença de aminoácidos insaturados, sendo praticamente inexistente no queijo de mistura e mais intensa no queijo ovelha Serra da Estrela de certificação DOP. Constatou-se que, de um modo geral, para queijo ovelha Serra da Estrela de certificação DOP as bandas descritas são bastante menos intensas do que no caso do queijo de mistura. Verificou-se o aparecimento de nova banda a 1174 cm^{-1} na amostra de queijo de mistura e a banda a 985 cm^{-1} aparece apenas no queijo de ovelha Serra da Estrela de certificação DOP.

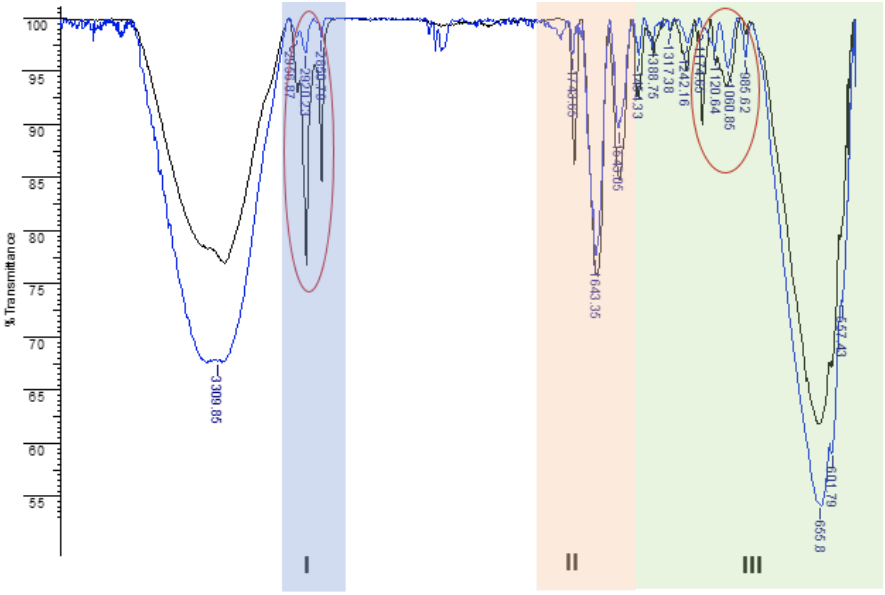


Figura 20. Comparação das amostras: queijo de ovelha Serra da Estrela de certificação DOP da empresa Vale de Estrela (azul) *vs.* queijo de mistura produzido através de leite de ovelha, cabra e vaca (Continente, SONAE) (preto). Azul-Região I; rosa- Região II; verde- Região III.

Tabela 12 - Comparação das amostras: queijo de ovelha Serra da Estrela de certificação DOP da empresa Vale de Estrela *vs.* queijo de mistura (Continente, SONAE), em função das zonas discriminantes do espectro: Região I; Região II; Região III[1] (Woodcock *et al*., 2008)

Amostras	Região I	Região II	Região III	Observações
Queijo certificação DOP de Serra da Estrela da empresa Vale de Estrela	2956 cm^{-1} C-H(CH3),stretching,p 2920 e 2850 cm^{-1} *streching anti-simetric/simetric,m,m*	1743 cm^{-1} C=O,*stretching,m* 1643 cm-1 C=O, stretching(Amida I),g 1543cm-1 C-NH, bending(Amida II),g	1454 cm^{-1} H-C-O,*bending,p* 1388 cm^{-1} C-C-H,*bending,p* 1242 cm^{-1} C-O-H,*bending,p* 1120 e 1060 cm^{-1} P=O,*streching,p* 985 cm^{-1} C-H, *out-of-plane deformation ,m*	A diferença entre os espectros dos queijos é na zona I e III, que correspondem

Queijo de mistura (Continente, SONAE)	2956 cm^{-1} C-H(CH3),stretching,p 2920 e 2850 cm^{-1} *streching anti-simetric/simetric,g,g*	1743 cm^{-1} C=O,*streching,m* 1643 cm-1 C=O, stretching(Amida I),g 1543 cm-1 C-NH, bending(Amida II),g	1454 cm^{-1} H-C-O,*bending,m* 1388 cm^{-1} C-C-H,*bending,m* 1242 cm^{-1} C-O-H,*bending,m* 1174 cm^{-1} C-O,*bending(ester),p* 1120 e 1060 cm^{-1} P=O,*streching,m*	a diferenças ao nível da presença de ácidos gordos, aminoácidos e compostos fosforados

[1]Intensidade de banda:p-pequena,m-média,g-grande

A comparação da amostra de queijo de ovelha Serra da Estrela de certificação DOP da empresa Vale de Estrela com queijo de vaca (Queijos Tavares, S.A., região Seia) foi efetuada. Os resultados obtidos encontram-se resumidos na **Figura 21** e na **Tabela 13**. A diferença existente entre os espectros dos 2 queijos centrou-se na região I e III, sendo que, de um modo geral, foi semelhante ao que sucedeu na comparação com o queijo de mistura, referido anteriormente. Para a zona I observou-se como principal diferença a maior intensidade para o queijo de vaca correspondente às bandas de 2920 e 2850 cm^{-1}, relacionadas com a presença de ácidos gordos. No caso da zona III, a diferença centrou-se em várias bandas, nomeadamente na intensa a 1174 cm^{-1}, atribuída a presença de triacilglicerois que no queijo de vaca está presente (à semelhança com o queijo de mistura) e no queijo ovelha Serra da Estrela de certificação DOP está ausente. A bandas de 1060 cm^{-1} correspondentes ao grupo P=O de compostos fosforados, no queijo de vaca apresenta-se menos intensa do que no queijo ovelha Serra da Estrela de certificação DOP. Relativamente à banda 985 cm^{-1} sucede o oposto, indicando a presença de aminoácidos insaturados, sendo praticamente inexistente no queijo de vaca e mais intensa no queijo ovelha Serra da Estrela de certificação DOP.

De um modo geral, para queijo ovelha Serra da Estrela de certificação DOP, as bandas descritas foram bastante menos intensas do que no caso do queijo de vaca. Verificou-se o aparecimento de nova banda a 1174 cm^{-1} na amostra de queijo de vaca e a banda a 985 cm^{-1} aparece apenas no queijo de ovelha Serra da Estrela de certificação DOP.

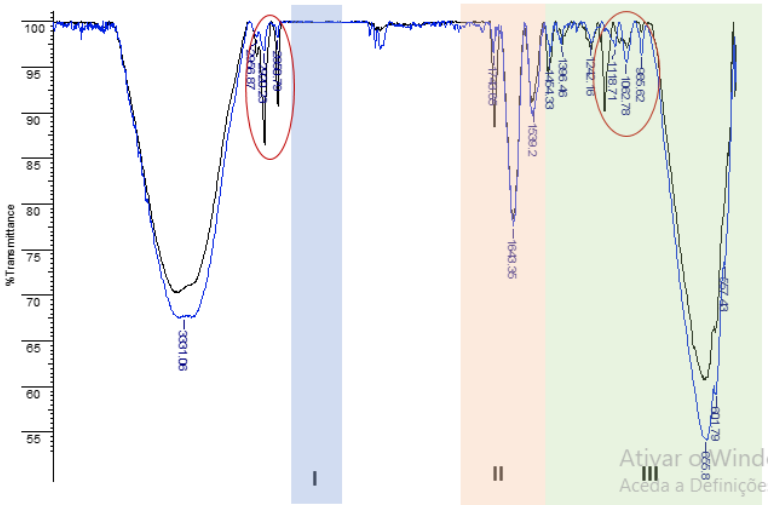


Figura 21. Comparação das amostras: queijo de ovelha Serra da Estrela de certificação DOP da empresa Vale de Estrela (azul) *vs.* queijo de vaca (Queijos Tavares, S.A., região Seia) (preto). Azul-Região I; rosa- Região II; verde-Região III.

Tabela 13. Comparação das amostras: queijo de ovelha Serra da Estrela de certificação DOP da empresa Vale de Estrela *vs.* queijo de vaca (Queijos Tavares, S.A., região Seia), em função das zonas discriminantes do espectro: Região I; Região II; Região III[1] (Woodcock *et al*., 2008)

Amostras	Região I	Região II	Região III	Observações
Queijo certificação DOP de Serra da Estrela da empresa Vale de Estrela	2956 cm^{-1} C-H(CH3),stretching,p 2910 e 2850 cm^{-1} *streching anti-simetric/simetric,m,m*	1743 cm^{-1} C=O,*stretching,m* 1643 cm-1 C=O, stretching(Amida I),g 1539 cm-1 C-NH, bending(Amida II),g	1454 cm^{-1} H-C-O,*bending,p* 1396 cm^{-1} C-C-H,*bending,p* 1242 cm^{-1} C-O-H,*bending,p* 1118 e 1062 cm^{-1} P=O,*streching,p* 985 cm^{-1} C-H, *out-of-plane deformation ,m*	A diferença entre os espectros dos queijos é na zona I e III, que corresponde a diferenças ao nível da presença de ácidos gordos, aminoácidos e compostos fosforados
Queijo de vaca (Queijos Tavares, S.A., região Seia)	2956 cm^{-1} C-H(CH3),stretching,p 2920 e 2850 cm^{-1} *streching anti-simetric/simetric,g,g*	1743 cm^{-1} C=O,*streching,m* 1643 cm-1 C=O, stretching(Amida I),g 1539 cm-1 C-NH, bending(Amida II),g	1454 cm^{-1} H-C-O,*bending,m* 1396 cm^{-1} C-C-H,*bending,m* 1242 cm^{-1} C-O-H,*bending,m* 1174 cm^{-1} C-O,*bending(ester),p* 1118 e 1062 cm^{-1}P=O,*streching,m* 985 cm^{-1} C-H, *out-of-plane deformation ,p*	

[1]Intensidade de banda:p-pequena,m-média,g-grande

A comparação da análise do queijo de ovelha Serra da Estrela de certificação DOP da empresa Vale de Estrela com amostras de queijo de cabra (Queijos Lagos, região de Seia) foi ainda estudada espectroscopicamente. Os resultados obtidos são apresentados na **Figura 22** e na **Tabela 13**. Os resultados obtidos mostram que a diferença entre os espectros dos 2 queijos se centra na região I e III. Para a região I as bandas de 2956 a 2850 cm^{-1} correspondentes a

PROGRAMA DE DESENVOLVIMENTO RURAL 2014·2020
PORTUGAL 2020
UNIÃO EUROPEIA
Fundo Europeu Agrícola de Desenvolvimento Rural
A Europa Investe nas Zonas Rurais

modos C-H *streching*, atribuída a presença de ácidos gordos, são marcadamente mais intensas para o queijo de ovelha Serra da Estrela de certificação DOP. Na região III a diferença é fundamentalmente na banda 1174 cm^{-1} C-O,*bending*(ester), indicando presença de triacilglicerois, estando apenas presente para o caso do queijo de cabra. Em suma, de um modo geral, a diferença existente entre as 2 amostras de queijo, é que para queijo ovelha Serra da Estrela de certificação DOP as bandas descritas são bastante menos intensas do que no caso do queijo de cabra. Verificou-se o aparecimento de nova banda a 1174 cm^{-1} na amostra de queijo de cabra.

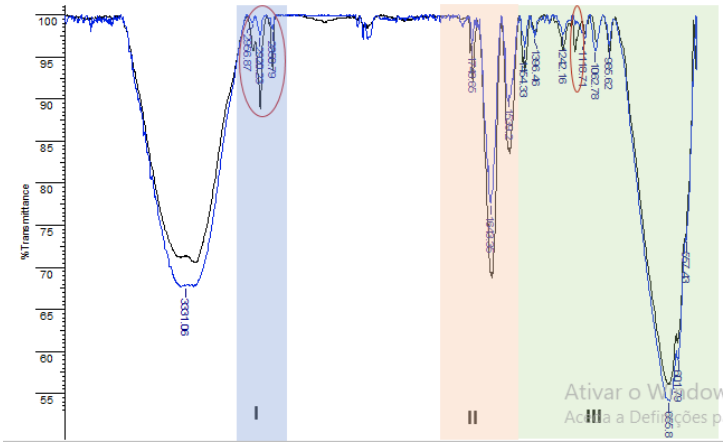


Figura 22. Comparação das amostras: ovelha Serra da Estrela de certificação DOP (azul) *vs*. queijo cabra (preto).

Tabela 14. Comparação das amostras: ovelha Serra da Estrela de certificação DOP *vs.* queijo de cabra, em função das zonas discriminantes do espectro: Região I; Região II; Região III[1] (Woodcock *et al*., 2008)

Amostras	Região I	Região II	Região III	Observações
Queijo certificação DOP de Serra da Estrela da empresa Vale de Estrela	2956 cm^{-1} C-H(CH3),stretching,p 2920 e 2850 cm^{-1} C-H *streching anti-simetric/simetric,m,m*	1743 cm^{-1} C=O,*stretching,m* 1643cm-1 C=O, stretching(Amida I),g 1539 cm-1 C-NH, bending(Amida II),g	1454 cm^{-1} H-C-O,*bending,p* 1396 cm^{-1} C-C-H,*bending,p* 1242 cm^{-1} C-O-H,*bending,p* 1118 e 1062 cm^{-1} P=O,*streching,p* 985 cm^{-1} C-H, *out-of-plane deformation ,m,m*	A diferença entre os espectros dos queijos é na zona I e III, que corresponde a diferenças ao nível da presença de ácidos gordos, aminoácidos insaturados e compostos fosfatados
Queijo de cabra (Queijos Lagos, região de Seia)	2956 cm^{-1} C-H(CH3),stretching,p 2920 e 2850 cm^{-1} *streching anti-simetric/simetric,p,p*	1743 cm^{-1} C=O,*streching,m* 1643 cm-1 C=O, stretching(Amida I),g 1539 cm-1 C-NH, bending(Amida II),g	1454 cm^{-1} H-C-O,*bending,m* 1396cm^{-1} C-C-H,*bending,m* 1242 cm^{-1} C-O-H,*bending,m* 1174 cm^{-1} C-O,*bending(ester),p* 1118 e 1062 cm^{-1} P=O,*streching,p,p* 985 cm^{-1} C-H, *out-of-plane deformation ,p*	

[1]Intensidade de banda: mp-muito pequena,p-pequena,m-média,g-grande

Para finalizar, foi comparado queijo de ovelha Serra da Estrela de certificação DOP da empresa Vale de Estrela com amostras de queijo de ovelha desta região (Queijos Tavares, S.A., região de Seia) mas sem certificação DOP. Os resultados obtidos são apresentados na **Figura 23** e na **Tabela 15**. Os resultados mostram que a diferença entre os espectros dos 2 queijos se centra na região III. Nesta região a diferença é fundamentalmente na banda 1174 cm^{-1} C-O,*bending*(ester), indicando diferenças em triacilglicerois. De um modo geral as amostras são semelhantes, e a única diferença significativa encontra-se para o queijo de ovelha desta região (Queijos Tavares, S.A., região de Seia) no aparecimento da nova banda 1174 cm^{-1}, embora pouco intensa, enquanto que para o queijo certificação DOP de Serra da Estrela da empresa Vale de Estrela esta banda não existe.

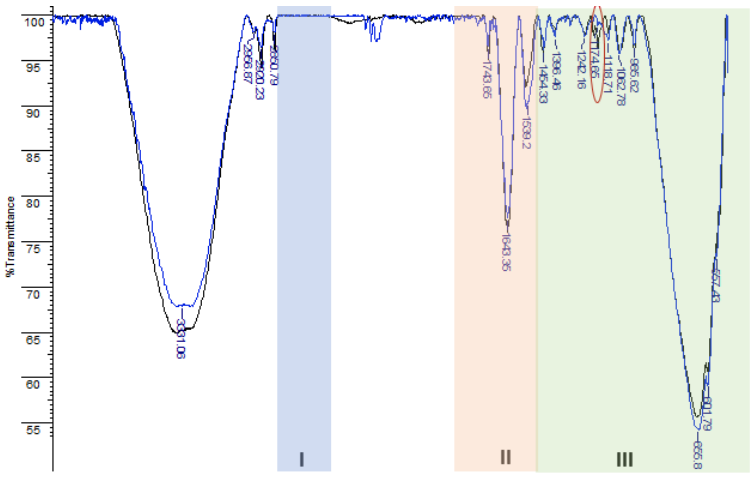


Figura 23. Comparação das amostras: ovelha Serra da Estrela de certificação DOP (azul) *vs.* queijo de ovelha desta região (Queijos Tavares, S.A., região de Seia) (preto).

Tabela 15. Comparação das amostras: queijo de ovelha Serra da Estrela de certificação DOP da empresa Vale de Estrela *vs.* queijo de ovelha desta região (Queijos Tavares, S.A., região de Seia) sem certificação DOP, em função das zonas discriminantes do espectro: Região I; Região II; Região III[1] (Woodcock *et al.*, 2008)

Amostras	Região I	Região II	Região III	Observações
Queijo certificação DOP de Serra da Estrela da empresa Vale de Estrela	2956cm^{-1} C-H(CH3),stretching,p 2920 e 2850 cm^{-1} *streching anti-simetric/simetric,m,m,p*	1743cm^{-1} C=O,*stretching,m* 1643 cm-1 C=O, stretching(Amida I),g 1539 cm-1 C-NH, bending(Amida II),g	1454 cm^{-1} H-C-O,*bending,p* 1396cm^{-1} C-C-H,*bending,p* 1242cm^{-1} C-O-H,*bending,p* 1118 e 1062 cm^{-1} P=O,*streching,p* 985cm^{-1} C-H, *out-of-plane deformation ,m*	A diferença entre os espectros dos queijos é na zona III, que corresponde a diferenças ao nível da presença de triacilglicerois
Queijo de ovelha desta região (Queijos Tavares, S.A., região de Seia) sem certificação DOP	2956cm^{-1} C-H(CH3),stretching,larga,p 2920 e 2850 cm^{-1} *streching anti-simetric/simetric,m,m*	1743 cm^{-1} C=O,*streching,m* 1643 cm-1 C=O, stretching(Amida I),g 1539cm-1 C-NH, bending(Amida II),g	1454 cm^{-1} H-C-O,*bending,p* 1396cm^{-1} C-C-H,*bending,p* 1242 cm^{-1} C-O-H,*bending,p* 1174cm^{-1} C-O,*bending(ester),p* 1118 e 1062 cm^{-1} P=O,*streching,p* 985 cm^{-1} C-H, *out-of-plane deformation ,m*	

[1]Intensidade de banda:p-pequena,m-média,g-grande

Após a realização dos ensaios de FTIR e das análises complementares (métodos físico-químicos) ou durante a execução dos mesmos inseriram-se os dados na plataforma *web* criada (**Figura 24** e **Figura 25**), dando origem à **Tabela 16**.

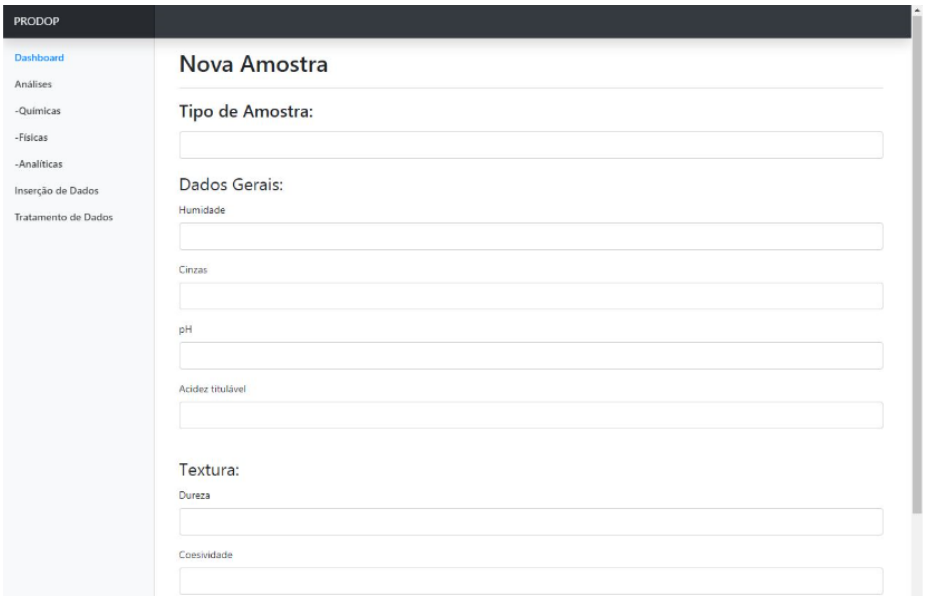
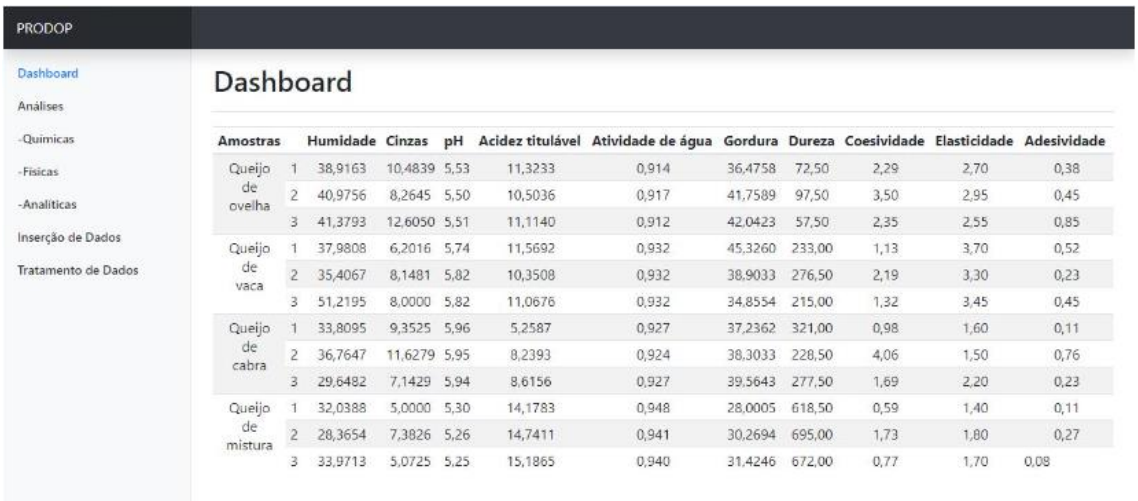


Figura 24. Inserção de nova amostra na plataforma web.



Amostras		Humidade	Cinzas	pH	Acidez titulável	Atividade de água	Gordura	Dureza	Coesividade	Elasticidade	Adesividade
Queijo de ovelha	1	38,9163	10,4839	5,53	11,3233	0,914	36,4758	72,50	2,29	2,70	0,38
	2	40,9756	8,2645	5,50	10,5036	0,917	41,7589	97,50	3,50	2,95	0,45
	3	41,3793	12,6050	5,51	11,1140	0,912	42,0423	57,50	2,35	2,55	0,85
Queijo de vaca	1	37,9808	6,2016	5,74	11,5692	0,932	45,3260	233,00	1,13	3,70	0,52
	2	35,4067	8,1481	5,82	10,3508	0,932	38,9033	276,50	2,19	3,30	0,23
	3	51,2195	8,0000	5,82	11,0676	0,932	34,8554	215,00	1,32	3,45	0,45
Queijo de cabra	1	33,8095	9,3525	5,96	5,2587	0,927	37,2362	321,00	0,98	1,60	0,11
	2	36,7647	11,6279	5,95	8,2393	0,924	38,3033	228,50	4,06	1,50	0,76
	3	29,6482	7,1429	5,94	8,6156	0,927	39,5643	277,50	1,69	2,20	0,23
Queijo de mistura	1	32,0388	5,0000	5,30	14,1783	0,948	28,0005	618,50	0,59	1,40	0,11
	2	28,3654	7,3826	5,26	14,7411	0,941	30,2694	695,00	1,73	1,80	0,27
	3	33,9713	5,0725	5,25	15,1865	0,940	31,4246	672,00	0,77	1,70	0,08

Figura 25. Inserção de dados na plataforma web.

PDR 2020 PROGRAMA DE DESENVOLVIMENTO RURAL 2014·2020
PORTUGAL 2020
UNIÃO EUROPEIA
Fundo Europeu Agrícola de Desenvolvimento Rural
A Europa Investe nas Zonas Rurais

Tabela 16. Validação da plataforma web

Amostra	Humidade	Cinzas	pH	Acidez titulavel	A_w	Gordura	Textura			
							Dureza	Coesividade	Elasticidade	Adesividade
Queijo de ovelha	40,42	10,45	5,51	10,98	0,91	39,69	72,50	2,29	2,70	0,38
Queijo de vaca	41,54	7,45	5,79	11,00	0,93	40,09	233,00	1,13	3,70	0,52
Queijo de cabra	33,41	9,37	5,95	7,37	0,93	38,37	275,67	2,24	1,77	0,37
Queijo de mistura	31,46	5,82	5,27	14,70	0,94	29,90	661,83	1,03	1,63	0,15

Importa referir que a plataforma *web* desenvolvida permite adicionar as amostras que forem pretendidas, adicionar outras análises a qualquer momento, assim como possibilita o tratamento de dados inseridos.

Ensaios complementares (químicos)

Análises de amostras de leite

Procedimentos experimentais

- *pH*

Transferiram-se 50 ml de leite para um copo de precipitação e efetuou-se a medição deste parâmetro por recurso a um medidor de pH.

- *Acidez titulável*

Transferiram-se 25 ml de leite para um copo de precipitação, definiu-se o ponto de viragem e titulou-se com a solução NaOH 0,1M, recorrendo ao titulador automático, titroline 6000 da S.I. Analytics (Alemanha). A determinação da % de acidez do leite é realizada pela equação 1.

$$\%\,Acidez = \frac{V \times f \times 90 \times 0{,}1}{10 \times m}$$

Equação 1

Onde,

V= Volume gasto de NaOH 0,1 N; *f*= Fator de correção da solução de hidróxido de sódio a 0,1 M (volume teórico/volume real); 0,1= molaridade da solução de NaOH; 90= equivalente grama de ácido lático (ácido predominante); *m*= massa de amostra em gramas.

PDR 2020 PROGRAMA DE DESENVOLVIMENTO RURAL 2014·2020 | PORTUGAL 2020 | UNIÃO EUROPEIA Fundo Europeu Agrícola de Desenvolvimento Rural A Europa Investe nas Zonas Rurais

- *Gordura*

A determinação de gordura é feita com base no método AOAC 933.05. No procedimento de determinação de gordura deve-se utilizar a água destilada como controlo, pesando 5 g da mesma. Pesou-se num tubo de falcon 5 g de leite e adicionaram-se 0,75 ml de hidróxido de amónia e homogeneizou-se. Tendo preparadas todas as soluções adicionaram-se 5 ml de álcool etílico, 12,5 ml de éter etílico e 12,5 ml de éter de petróleo; centrifugou-se a 600 rpm durante 60 s; separou-se a fase superior da inferior, colocando-a nos falcons pesados em banho maria para ir evaporando. Adicionou-se novamente a cada solução 2,5 ml de álcool etílico, 7,5 de éter etílico e 7,5 ml de éter de petróleo; centrifugou-se a 600 rpm durante 60 s; separou-se a fase superior da inferior, colocando-a nos falcons pesados em banho maria para ir evaporando. Voltou-se a adicionar a cada solução 7,5 ml de éter etílico e 7,5 ml de éter de petróleo; centrifugou-se a 600 rpm durante 60 s; separou-se a fase superior da inferior, colocando-a nos falcons pesados em banho maria para ir evaporando. Manteve-se os tubos de falcon a 105 °C até peso constante. O cálculo da percentagem de gordura presente leite pode ser feita mediante a equação 2.

$$\%\ Gordura = \frac{(Tubo\ de\ falcon\ com\ gordura - Tubo\ de\ falcon\ vazio) - peso\ médio\ da\ água}{Peso\ inicial\ da\ amostra} \times 100$$

Equação 2

- ***Resultados***

As análises complementares ao método genético foram realizadas a várias amostras de leite de ovelha (raças distintas), de vaca e de cabra, no sentido de averiguar que diferenças existem entre eles e perceber se através das suas características é possível distinguir um queijo fraudulento por mistura de leite de mais que uma origem de um genuíno. Para tal, realizou-se a determinação de pH, acidez titulável, gordura e FTIR

Inicialmente efetuaram-se análises químicas a 5 amostras de leite, em que 3 pertenciam a 3 indivíduos de raça 'Bordaleira Serra da Estrela', outra a leite de cabra e outra a leite de vaca.

- *pH*

A análise do pH foi efetuada a amostras de cinco leites, utilizando um aparelho medidor de pH e os resultados estão apresentados na **Tabela 17**. Analisando apenas os valores obtidos de pH para os leites de ovelha 'Bordaleira Serra da Estrela' (LB1, LB2 e LB3) verifica-se uma

PDR 2020 PROGRAMA DE DESENVOLVIMENTO RURAL 2014·2020
PORTUGAL 2020
UNIÃO EUROPEIA Fundo Europeu Agrícola de Desenvolvimento Rural A Europa Investe nas Zonas Rurais

ligeira diferença entre as médias do pH dos três leites. Contudo, é de relembrar mais uma vez que estes leites provêm de três ovelhas diferentes e a composição do leite pode variar de animal para animal.

Tabela 17. Resultados do ensaio para determinação do pH em leite de ovelha de raça 'Bordaleira Serra da Estrela' (LB1, LB2 e LB3), leite de cabra (LC) e leite de vaca (LV)

Amostra		pH	Média do pH	Desvio padrão
LB1	**1**	6,90	6,87	0,02
	2	6,84		
	3	6,86		
LB2	**1**	6,98	6,98	0,01
	2	6,99		
	3	6,96		
LB3	**1**	7,06	7,05	0,01
	2	7,04		
	3	7,06		
LC	**1**	6,99	7,01	0,01
	2	7,02		
	3	7,02		
LV	**1**	6,67	6,67	0,01
	2	6,69		
	3	6,66		

Quanto ao valor do pH do leite de cabra (LC) é muito semelhante ao pH obtido para os leites de ovelha, tornando difícil a diferenciação destes leites a partir do seu pH. Já no que diz respeito ao leite de vaca (LV), o valor médio de pH obtido permite a distinção dos leites de ovelha e cabra. Uma vez que há suspeita de misturas de leite de vaca no leite de ovelha, prossupõe-se que se tal acontecesse o pH do leite misturado iria ser menor do que o pH do leite de ovelha e maior do que o pH do leite de vaca.

Assim, o pH revelou-se um bom parâmetro na distinção entre leite de ovelha da raça 'Bordaleira Serra da Estrela' e leite de vaca. Seria também interessante a análise de leite de vaca de produtores da zona num contexto de análises futuras.

- *Acidez titulável*

A análise da acidez titulável foi efetuada aos cinco leites e os resultados estão apresentados na **Tabela 18**. Pela análise da tabela observa-se uma pequena disparidade entre os valores da média de percentagem de acidez titulável, designadamente, os valores da

PDR 2020 PROGRAMA DE DESENVOLVIMENTO RURAL 2014·2020
PORTUGAL 2020
UNIÃO EUROPEIA Fundo Europeu Agrícola de Desenvolvimento Rural A Europa Investe nas Zonas Rurais

amostra LB1 e LB3 estão em concordância, mas o valor da amostra LB2 está em discordância com os referidos anteriormente. Esta discordância deve-se ao facto de, durante a titulação no titulador automático, este ter dado um sinal de erro, apesar de fornecer os dados essenciais à análise. A análise deveria ter sido repetida, no entanto, a quantidade de leite para amostra era reduzida e, por isso, a titulação não foi repetida. Posteriormente esta análise deverá ser repetida para rever este erro.

Contudo, comparando as médias de percentagem de acidez titulável dos leites de ovelha LB1 e LB3 com a média do leite de cabra (LC) é possível observar uma ligeira diferença, que poderá ajudar na diferenciação de leites. De notar que, para a análise do leite de cabra foram utilizadas apenas duas réplicas no lugar de três devido à pequena quantidade de amostra total para todas as análises.

Quanto ao leite de vaca, os valores de percentagem de acidez titulável entre réplicas encontram-se próximos, mostrando que o método é fiável. Quando comparada a média das percentagens de acidez titulável do leite de vaca com os leites de ovelhas LB1 e LB3, é possível notar-se uma diferença, assim através de uma análise estatística será possível verificar se essa diferença é significativa e se poderá ser indicativo para distinção dos leites de ovelha e cabra.

Tabela 18. Resultados do ensaio para determinação da acidez titulável em leite de ovelha de raça 'Bordaleira Serra da Estrela' (LB1, LB2 e LB3), leite de cabra (LC) e leite de vaca (LV)

Amostra		% Acidez titulável	Média da % de acidez titulável	Desvio padrão
LB1	**1**	18,3492	18,3814	0,9532
	2	17,2304		
	3	19,5645		
LB2	**1**	14,2476	33,6014	13,7129
	2	44,3469		
	3	42,2096		
LB3	**1**	19,0747	19,3048	0,1935
	2	19,2917		
	3	19,5481		
LC	**1**	16,4117	14,4303	1,9814
	2	12,4488		
	3	-		
LV	**1**	11,3030	12,5849	0,9194
	2	13,0374		
	3	13,4144		

PDR 2020 PROGRAMA DE DESENVOLVIMENTO RURAL 2014·2020
PORTUGAL 2020
UNIÃO EUROPEIA Fundo Europeu Agrícola de Desenvolvimento Rural A Europa Investe nas Zonas Rurais

- *Gordura*

O estudo da percentagem de gordura em leite foi efetuado em dois ensaios separados. No primeiro ensaio, foram analisados dois leites de ovelha de raça 'Bordaleira Serra da Estrela'. No segundo ensaio foi analisado apenas o leite de vaca. Os resultados destes ensaios estão apresentados nas **Tabela 19** e na **Tabela 20**.

Pela análise da **Tabela 19** é possível verificar uma variação entre as percentagens de gordura em leites de diferentes ovelhas (LB1, LB2 e LB3). Isto pode dever-se às variações que surgem de animal para animal e a sua alimentação, como referido anteriormente. Contudo, seria de esperar que as percentagens de gordura fossem um pouco mais elevadas, uma vez que o leite de ovelha é um leite com uma percentagem de gordura relativamente elevada e que o difere dos leites de cabra e vaca, tal como se pode verificar na **Tabela 19**.

No que concerne ao leite de vaca, com resultados expostos na **Tabela 20**, é possível observar uma pequena discrepância em réplicas da mesma amostra. Segundo a literatura analisada (**Tabela 21**), o valor médio de percentagem de gordura foi um pouco mais elevado do que o esperado, no entanto, mais análises poderão ser efetuadas para comprovar estes resultados.

Tabela 19. Resultados dos ensaios para determinação da gordura em leite de ovelha de raça 'Bordaleira Serra da Estrela' (LB1, LB2 e LB3) e leite de cabra (LC)

Ensaio 1				Ensaio 2			
Amostra	**% Gordura**	**Média % Gordura**	**Desvio-padrão**	**Amostra**	**% Gordura**	**Média % Gordura**	**Desvio padrão**
Água 1	0,1199	0,0645	0,0410	**Água 1**	0,1054	0,0716	0,0275
Água 2	0,0219			**Água 2**	0,0714		
Água 3	0,0518			**Água 3**	0,0380		
LB1 1	5,4583	5,2181	0,2224	**LB3 1**	3,0276	3,4997	0,3348
LB1 2	5,2737			**LB3 2**	3,7054		
LB1 3	4,9222			**LB3 3**	3,7663		
LB2 1	4,6751	3,3192	0,9588	**LC 1**	5,7174	4,1212	1,1289
LB2 2	2,6552			**LC 2**	3,3463		
LB2 3	2,6274			**LC 3**	3,2997		

PDR 2020 PROGRAMA DE DESENVOLVIMENTO RURAL 2014·2020
PORTUGAL 2020
UNIÃO EUROPEIA Fundo Europeu Agrícola de Desenvolvimento Rural A Europa Investe nas Zonas Rurais

Tabela 20. Resultados dos ensaios para determinação da gordura em leite de vaca (LV)

Ensaio 3			
Amostra	**% Gordura**	**Média % Gordura**	**Desvio-padrão**
Tágua 1	0,0520	0,1221	0,0693
Tágua 2	0,0978		
Tágua 3	0,2165		
LV1	4,4426	4,2916	0,2309
LV2	4,4668		
LV3	3,9653		

Tendo em conta os dados encontrados na literatura, **Tabela 21**, onde é referido que o leite de ovelha terá mais gordura do que os leites de vaca e cabra, os resultados obtidos, especialmente nas amostras LB2 e LB3, distanciam-se um pouco dos valores referidos, pois a percentagem de gordura calculada para estas amostra foi menor do que nos leites de vaca.

Tabela 21. Percentagem de gordura em leite das principais espécies pecuárias leiteiras (Pereira, 2005)

% de Gordura	
Leite de ovelha	7,6
Leite de vaca	3,6
Leite de cabra	3,7

Após as análises químicas feitas aos leites de ovelha da raça 'Bordaleira Serra da Estrela', de vaca e de cabra, estas revelaram-se como análises favoráveis para distinguir os leites. Quanto à percentagem de gordura do leite, foi determinado que o leite de vaca é o leite com maior percentagem de gordura, enquanto o leite de ovelha é o leite com menor percentagem de gordura. No entanto, a percentagem de gordura do leite de ovelha deveria ter sido superior comparativamente com os restantes leites e, por isso, o teste será repetido. O pH revelou-se um potencial parâmetro na distinção entre leites, especialmente entre leite de ovelha da raça 'Bordaleira Serra da Estrela' e leite de vaca. A acidez titulável também revelou ser um possível método de diferenciação dos leites de vaca e ovelha 'Bordaleira Serra da Estrela'.

Bibliografia

Anjos, O.; Santos, A; Estevinho, M.; Caldeira, I. (2016) FTIR-ATR spectroscopy applied to quality control of grape-derived spirits. Food Chemistry, 205C:28-35.

Blanco, M. and Villarroya, I. (2002) NIR Spectroscopy: A Rapid-Response Analytical Tool. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 21, 240-250. Doi: https://doi.org/10.1016/S0165-9936(02)00404-1

Cordella, C.; Moussa, I.; Martel, A.; Sbirrazzuoli, N.; Lizzani-Gouvinhas, I.; De Almeida, J.; Carvalho, T.; Machado, N.; Lachenmeier, D. (2007) Rapid quality control of spirit drinks and beer using multivariate data analysisi of Fourier transform infrared spectra. Food Chemistry, 101(2):825-832.

Downey, G. (1998) Food and food ingredient authentication by midinfrared spectroscopy and chemometrics. Trends in Analytical Chemistry, 17, 418–424.

Dufour, E., G. Mazerolles, M.F. Devaux, G. Duboz, M.H. Duployer, N. Mouhous Riou. (2000) Phase transition of triglycerides during semi-hard cheese ripening, *International Dairy Journal*, 10, 81-93.

Gérard Mazerolles, Marie-Françoise Devaux, Gabriel Duboz, Marie-Hélène Duployer, Nadine Mouhous Riou, Éric Dufour. (2001) Infrared and fluorescence spectroscopy for monitoring protein structure and interaction changes during cheese ripening, *Lait*, 81, 509–527

Iwamoto, M., & Kawano, S. Advantages and disadvantages of NIR applications for the food industry. In I. Murray & I. A. Cowe (Eds.), Making light work, Advances in near infrared spectroscopy (1992), 367–375. Germany, Weinhiem: Wiley-VCH

Kher, A., Udabage, P., McKinnon, I., McNaughton, D., & Augustin, M. A. (2007) FTIR 465 investigation of spray-dried milk protein concentrate powders. *Vibrational spectroscopy, 44*, 375-381.

Markoska, T., Huppertz, T., Grewal, M.K., Vasiljevic, T. (2019) FTIR analysis of physiochemical changes in raw skim milk upon concentration, LWT - *Food Science and Technology*, doi: https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.12.011.

Mendelsohn, R., Mao, G., Flach, C. R. (2010) Infrared reflection–absorption spectroscopy: Principles and applications to lipid–protein interaction in Langmuir 485 films. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 1798*, 788-800.

Nicolaou, N., Y. Xu, and R. Goodacre, (2010) Fourier transform infrared spectroscopy and multivariate analysis for the detection and quantification of different milk species, *J. Dairy Sci.* 93 :5651–5660.

Pranita Jaiswal, Shyam Narayan Jha, Anjan Borah, Anuj Gautam, Manpreet Kaur Grewal, Gaurav Jindal. (2015) Detection and quantification of soymilk in cow–buffalo milk using Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared spectroscopy (ATR–FTIR), *Food Chemistry,* 168 41–47

Picquet, D., Cattenoz, T., Pillonel, L., Bosset, J. O., & Corrieu, G. Discrimination of European Emmental cheese by midinfrared spectroscopy. Proceedings of IDF Symposium on Cheese: Ripening, Characterisation and Technology, Prague, Czech Republic, 21–25 March 2004.

Pillonel, L., Luginbuhl, W., Picque, D., Schaller, E., Tabacche, R., Bosset, J. 2003. Analytical methods for the determination of the geographic origin of Emmental cheese: Mid- and near infrared spectroscopy. European Food Research and Technology, 216(2), 174–178.

Reich, G. (2005) Near-infrared spectroscopy and imaging: Basic principles and pharmaceutical applications. Advanced Drug Delivery Reviews, 57:1109-1143.

Shurvell, H. (2001) Handbook od Vibrational Spectrocopy. (JohnWiley & Sons, Ed.). New York, NY, USA.

Romdhane Karoui, Éric Dufour, Laurent Pillonel, Emmanuelle Schaller, Daniel Picque, Thomas Cattenoz, Jacques-Olivier Bosset. (2005) The potential of combined infrared and fluorescence spectroscopies as a method of determination of the geographic origin of Emmental cheeses, *International Dairy Journal*, 15, 287–298.

Romdhane Karoui, Gérard Mazerolles, Jacques-Olivier Bosset, Josse de Baerdemaeker, Eric Dufour. (2007) Utilisation of mid-infrared spectroscopy for determination of the geographic origin of Gruye`re PDO and L'Etivaz PDO Swiss cheeses*, Food Chemistry,* 105,847–854.

Romdhane Karouiric, Dufour Laurent Pillonel, Daniel PicqueThomas Cattenoz, Jacques-Olivier Bosset. (2004) *Determining the geographic origin of Emmental cheeses produced during winter and summer using a technique based on the concatenation of MIR and fluorescence spectroscopic data*, *Eur Food Res Technol*, 219:184–189.

Romdhane Karoui, Jacques-Olivier Bosset, Gerard Mazerolles, Asylbek Kulmyrzaeva, Eric Dufoura (2005) Monitoring the geographic origin of both experimental FrenchJura hard

cheeses and Swiss Gruye`re and L'Etivaz PDO cheeses using mid-infrared and fluorescence spectroscopies: a preliminary investigation, *International Dairy Journal*, 15, 275–286.

Woodcock, T., Colette C. Fagan, Colm P. O'Donnell & Gerard Downey, Application of Near and Mid-Infrared Spectroscopy to Determine Cheese Quality and Authenticity, *Food Bioprocess Technol* (2008) 1:117–129.

Zhou, Q., Sun, S.-Q., Yu, L., Xu, C.-H., Noda, I., & Zhang, X.-R. Sequential changes of main components in different kinds of milk powders using two-dimensional 520 infrared correlation analysis. *Journal of Molecular Structure,* (2006) *799*, 77-84.