



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS

DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA

**EFEITO DE TRÊS ECÓTIPOS DE *Cynara cardunculus* L.
NA PROTEÓLISE DO QUEIJO DE ÉVORA AO LONGO
DA MATURAÇÃO**

Ana Lúcia Serra Pires Garrido

Orientação | Professora Doutora Cristina Maria Conceição Pinheiro

| Doutora Lénia Isabel Alfaiate Rodrigues

Mestrado em Engenharia Zootécnica

Dissertação

Évora, 2017



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS

DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA

**EFEITO DE TRÊS ECÓTIPOS DE *Cynara cardunculus* L.
NA PROTEÓLISE DO QUEIJO DE ÉVORA, AO LONGO
DA MATURAÇÃO**

Ana Lúcia Serra Pires Garrido

Orientação | Professora Doutora Cristina Maria Conceição Pinheiro

| Doutora Lénia Isabel Alfaiate Rodrigues

Mestrado em Engenharia Zootécnica

Dissertação

Évora, 2017



Efeito de três ecótipos de *Cynara cardunculus* L. na proteólise do Queijo de Évora ao longo da maturação

Aos meus pais e à minha irmã, por todo o amor.

A vocês dedico todo este trabalho.

Agradecimentos

No momento em que dou por concluída esta dissertação para a obtenção de grau de Mestre, gostaria de demonstrar o meu agradecimento a todos os que tornaram possível o final de mais uma etapa do meu percurso acadêmico.

Em primeiro lugar, quero agradecer à minha orientadora, Professora Doutora Cristina Conceição Pinheiro, por todos os ensinamentos, apoio e disponibilidade para a concretização deste trabalho.

Agradeço à Doutora Lénia Rodrigues por ter aceite ser minha coorientadora e por, mesmo com uma grande “barriguinha”, ter andado a correr de um lado para o outro a atender a tantas “emergências” laboratoriais.

À Doutora Elsa Lamy, pelo acompanhamento incansável e constante orientação, enorme disponibilidade, dedicação e simpatia.

Gostaria de agradecer à Sofia pelo companheirismo em todos aqueles dias intermináveis de laboratório, e por todo o dinamismo e força de vontade que foram precisos para a realização deste trabalho.

Às minhas grandes amigas Rita, Alface, Raquel, à minha colega de quarto, Cátia, aos meus colegas e amigos do Mestrado em Engenharia Zootécnica e da licenciatura em Ciência e Tecnologia Animal, quero agradecer, não só por toda a ajuda e cumplicidade, mas pelas amizades e por tantos momentos bem passados que levo para a vida.

Um agradecimento especial à Ângela e à Sónia, as minhas *Vulpias geniculatas*, por todos os cafés libertadores de stress, e pelo espírito de equipa que fizeram com que esta dissertação sempre parecesse um trabalho de grupo. Sem vocês, nada disto era possível.

À Patrícia, que será para sempre a “melhor colega de quarto do mundo”, agradeço toda a motivação, boa disposição e o “relax” que me transmitiu. Que a distância e o tempo sejam apenas meros detalhes, que nunca vão mudar esta nossa amizade.

Ao Daniel quero agradecer toda esta grande aventura que trouxe para a minha vida e que só agora está a começar. Muito obrigada.

Quero agradecer também à minha família holandesa, em especial à Iris, que fizeram crescer em mim tantos valores, assim como todo este gosto zootécnico. Trago-vos sempre no coração.

Um agradecimento a toda a minha família, aos meus avós, tanto aos da terra como aos do céu, e ao meu Tio, por acreditarem sempre em mim. Agradeço, principalmente, aos meus pais, por todo o amor incondicional, que foi o motor que tornou tudo isto possível. Agradeço também à minha irmã, porque toda esta experiência nesta Universidade nunca teria feito sentido sem a sua presença. Um obrigado não chega.

Por fim, agradeço a Deus por mais uma bênção que me dá, porque é o “Senhor que constrói a casa”.

A todos o meu mais sincero obrigado.

Trabalho desenvolvido no âmbito do projeto ALT20-03-0145-FEDER-000038, designada por “ValBioTecCynara - Valorização económica do cardo (*Cynara cardunculus*): variabilidade natural e as suas aplicações biotecnológicas”, cofinanciado pelo Programa Operacional Regional do Alentejo (ALENTEJO 2020), com participação financeira FEDER.

Resumo

O extrato aquoso da flor de *Cynara cardunculus* L. tem sido muito utilizado no fabrico de queijos DOP, estimulando a investigação da ação das enzimas deste extrato nas transformações bioquímicas do queijo.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de três ecótipos de *Cynara cardunculus* L. (*Cynara 1*, *Cynara 2*, *Cynara 3*) e de um agente coagulante animal (Animal) na degradação das frações de caseína do Queijo de Évora, com 1, 7, 14, 21, 35, 49 e 63 dias de maturação.

Os resultados obtidos por ureia-PAGE evidenciam uma maior degradação proteica dos queijos fabricados com os agentes coagulantes vegetais relativamente ao agente coagulante animal. Até aos 35 dias de maturação a taxa de degradação das caseínas aumenta, permanecendo relativamente constante até ao final da maturação. Após 63 dias de maturação as α_s -caseínas (54,90%) foram mais degradadas do que as β -caseínas (37,27%) nos queijos fabricados com *Cynara cardunculus* L.

Palavras-chaves: Queijo de Évora, *Cynara cardunculus* L., proteólise, ureia-PAGE, caseínas

Proteolytic effect of three ecotypes of *Cynara Cardunculus* L. in “Queijo de Évora” during ripening

Abstract

Cynara cardunculus L. flower aqueous extracts have been employed for many centuries in the manufacture of PDO cheeses, leading to the investigation of the action of the enzymes of this extract on the biochemical transformations of cheese.

The aim of this work was to evaluate the effect of three ecotypes of *Cynara cardunculus* L. (*Cynara 1*, *Cynara 2*, *Cynara 3*) and an animal coagulant (Animal) in the casein fractions degradation of Évora cheese, during day 1, 7, 14, 21, 35, 49 and 63 of ripening.

Urea-PAGE electrophoretic results showed a higher protein degradation of cheeses made with vegetable coagulant than cheeses made with animal coagulant. Up to 35 days of ripening there was an increase of the casein degradation rate, remaining relatively constant until the end of maturation. After 63 days of ripening, α_s -caseins (54.90%) were more degraded than β -caseins (37.27%) in cheeses made with the *Cynara cardunculus* L. ecotypes.

Keywords: Queijo de Évora, *Cynara cardunculus* L., proteolysis, ureia-PAGE, caseins

Lista de Abreviaturas, unidades e convenções

% - Percentagem

°C – Graus celsius

µL – Microlitro

AGV – Ácidos Gordos Voláteis

APS- Persulfato de amónio

CA – Agente coagulante animal

CV – Agente coagulante vegetal

DOP – Denominação de Origem Protegida

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

kg – Quilograma

L – Litro

M – marcador de caseínas bovinas

mA - Miliamperes

mL – Mililitro

mM – Milimolar

NaCl – Cloreto de Sódio

NPN – azoto não proteico

PCA – Analise das componentes principais

SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecilsulfato de sódio

TEMED- Tetrametiletlenodiamino

TCA –Ácido tricloroacético

TN – azoto total

Tris - Tris(hidroximetil)aminometano

Ureia-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida com ureia

vs - versus

WSN – Azoto solúvel em água

Índice

Agradecimentos	v
Resumo.....	ix
Abstract	x
Lista de Abreviaturas, unidades e convenções	xi
Índice de tabelas	xiv
Índice de figuras	xv
1. Introdução.....	1
2. Revisão bibliográfica	3
2.1. O Queijo de Évora	3
2.2. O processo de fabrico do queijo	5
2.3. A Coagulação.....	8
2.3.1. Os agentes coagulantes.....	10
2.3.1.1. Os agentes coagulantes de origem animal.....	10
2.3.1.2. Os agentes coagulantes de origem microbiana.....	12
2.3.1.3. Os agentes coagulantes de origem vegetal	12
2.3.1.3.1. O género <i>Cynara</i>	14
2.3.1.3.2. Preparação do extrato aquoso para a coagulação.....	15
2.3.1.3.3. Caracterização das proteases do género <i>Cynara cardunculus</i> L.	16
2.4. A maturação	18
2.4.1. Proteólise	19
2.4.1.1. Métodos de estudo da proteólise no queijo	21
2.4.1.1.1. Técnicas eletroforéticas	22
2.4.1.2. Efeito da maturação na proteólise dos queijos.....	24
2.4.1.3. Efeito do agente coagulante na proteólise dos queijos	25
3. Materiais e Métodos	34
3.1. Locais e Laboratórios.....	34
3.2. Preparação do extrato aquoso de <i>Cynara cardunculus</i> L.....	34
3.3. Fabrico do queijo, preparação e recolha das amostras	35
3.4. Análise das caseínas do queijo através de técnicas de ureia-PAGE.....	38
3.4.1. Precipitação das caseínas do queijo.....	38
3.4.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida com ureia	39
3.5. Tratamento estatístico	40
4. Resultados.....	41

4.1.	Perfil das caseínas no Queijo de Ovelha	41
4.2.	Comparação do perfil eletroforético entre os agentes coagulantes ao longo do processo de maturação.....	44
4.2.1.	γ -caseínas	46
4.2.2.	β -caseína	50
4.2.3.	α_s -caseína	52
4.2.4.	Pré- α_s -caseínas.....	54
5.	Discussão	57
6.	Conclusão	63
7.	Trabalho futuro	66
8.	Referências Bibliográficas	67

Índice de tabelas

<i>Tabela 1</i> Principais características físico-químicas e organolépticas, bem como condições de maturação do queijo de Évora conforme previstas no Despacho 29/94 de 4 de fevereiro	4
<i>Tabela 2</i> Identificação dos três ecótipos de <i>Cynara cardunculus</i> L. escolhidos, com a respetiva descrição, localização e código de laboratório	34
<i>Tabela 3</i> Condições de temperatura e humidade relativa das câmaras de refrigeração necessárias para a maturação dos queijos	37
<i>Tabela 4</i> Correspondência entre as Bandas Identificadas (A-L) com as zonas eletroforéticas delimitadas por Marcos et al. (1979)	44
<i>Tabela 5</i> Percentagem de degradação (%) da β -caseína entre o primeiro dia de degradação (D1) e os restantes dias de degradação (D7, D14, D21, D35, D49 e D63), para os quatro tipos de queijos (Cynara 1, Cynara 2, Cynara 3 e Animal)	51
<i>Tabela 6</i> Percentagem de degradação (%) da α_s -caseína entre o primeiro dia de degradação (D1) e os restantes dias de degradação (D7, D14, D21, D35, D49 e D63), para os quatro tipos de queijos (Cynara 1, Cynara 2, Cynara 3 e Animal)	53

Índice de figuras

<i>Figura 1</i> Símbolo de Denominação de Origem Protegida (DOP)	3
<i>Figura 2</i> Área geográfica de produção, transformação e elaboração do Queijo de Évora.....	5
<i>Figura 3</i> Diagrama genérico do fabrico de queijo.....	6
<i>Figura 4</i> a) Representação do leite e dos seus constituintes; (b) Representação esquemática da micela da caseína, constituída pelas submicelas, que se encontram ligadas pelo fosfato de cálcio (Baseado em <i>Rebouillat & Ortega-Requena (2015)</i>).....	9
<i>Figura 5</i> Aspeto morfológico de cada uma das variantes de <i>Cynara cardunculus</i> L.: cardo silvestre (a), alcachofra (b) e cardo cultivado (c).....	14
<i>Figura 6</i> Pistilos da flor de cardo (“CARDOP,” n.d.)	15
<i>Figura 7</i> Esquema com as modificações químicas durante a maturação do queijo (adaptado de Baldini, 1998).....	18
<i>Figura 8</i> Preparação do extrato aquoso, desde a sua recolha (a) e conservação (b) à trituração dos pistilos demolidos (c) e a sua posterior filtração (d).	35
<i>Figura 9</i> Apresentação das metodologias de deteção do início (a) e do fim (b) da coagulação	36
<i>Figura 10</i> Procedimentos após a fim da coagulação, nomeadamente o corte da coalhada (a) e o posterior enchimento em multimoldes (b). Refrigeração dos queijos, durante 24 horas ainda nos multimoldes (c) e condições de refrigeração nos restantes dias de maturação (d).....	36
<i>Figura 11</i> Esquema representativo do fabrico, amostragem e análise laboratorial.....	38
<i>Figura 12</i> Perfil de caseínas por ureia-PAGE da fração insolúvel em água do queijo de ovelha, fabricado com agente coagulante vegetal (CV) e com agente coagulante animal (CA), com 1 dia de maturação; (M) marcador de caseínas de leite bovino (Sigma LifeScience); (Bandas) bandas identificadas	41
<i>Figura 13</i> Volumes relativos das bandas diferencialmente expressas, observadas nos perfis de caseínas (ureia-PAGE) (média \pm desvio-padrão da média), nos queijos fabricados com os 3 ecótipos do agente coagulante vegetal, tendo em conta toda a maturação (tempo médio)....	42
<i>Figura 14</i> Volumes relativos das bandas diferencialmente expressas, observadas nos perfis proteicos (ureia-PAGE) (média \pm desvio-padrão da média), nos queijos fabricados com agente coagulante vegetal ou animal, tendo em conta toda a maturação (tempo médio).....	43
<i>Figura 15</i> Perfil de caseínas obtido por ureia-PAGE dos queijos de ovelha fabricado com (a) <i>Cynara</i> 1; (b): <i>Cynara</i> 2; (c) <i>Cynara</i> 3; (d) agente coagulante animal, ao longo da maturação (Dia 1, Dia 7, Dia 14, Dia 21, Dia 35, Dia 49 e Dia 63)	45

<i>Figura 16</i> Volumes da Banda A à Banda G, diferencialmente expressos, observados nos perfis proteicos (ureia-PAGE) (média ± desvio padrão da média), em queijos produzidos com os 3 ecótipos de agente coagulante vegetal (Cynara 1, Cynara 2, Cynara 3) e com agente coagulante animal (Animal), para todas as fases de maturação (Dia 1, Dia 7, Dia 14, Dia 21, Dia 35, Dia 49 e Dia 63)	47
<i>Figura 17</i> Evolução da percentagem relativa das γ -caseínas ao longo dos dias de maturação (Dia 1, Dia 7, Dia 14, Dia 21, Dia 35, Dia 49 e Dia 63) para os quatro agentes coagulantes utilizados (Cynara 1, Cynara 2, Cynara 3 e Animal)	49
<i>Figura 18</i> Volumes da Banda H diferencialmente expressos, observados nos perfis proteicos (ureia-PAGE) (média ± desvio padrão da média), em queijos produzidos com os 3 ecótipos de agente coagulante vegetal (Cynara 1, Cynara 2, Cynara 3) e com agente coagulante animal (Animal), para todas as fases de maturação (Dia 1, Dia 7, Dia 14, Dia 21, Dia 35, Dia 49 e Dia 63)	50
<i>Figura 19</i> Evolução da percentagem relativa (média ± desvio-padrão da média) da β -caseína ao longo dos dias de maturação (Dia 1, Dia 7, Dia 14, Dia 21, Dia 35, Dia 49 e Dia 63) para os quatro agentes coagulantes utilizados (Cynara 1, Cynara 2, Cynara 3 e Animal).....	51
<i>Figura 20</i> Volumes da Banda I diferencialmente expressos, observados nos perfis proteicos (ureia-PAGE) (média ± desvio padrão da média), em queijos produzidos com os 3 ecótipos de agente coagulante vegetal (Cynara 1, Cynara 2, Cynara 3) e com agente coagulante animal (Animal), para todas as fases de maturação (Dia 1, Dia 7, Dia 14, Dia 21, Dia 35, Dia 49 e Dia 63)	52
<i>Figura 21</i> Evolução da percentagem relativa (média ± desvio-padrão da média) da α_s -caseína ao longo dos dias de maturação (Dia 1, Dia 7, Dia 14, Dia 21, Dia 35, Dia 49 e Dia 63) para os quatro agentes coagulantes utilizados (Cynara 1, Cynara 2, Cynara 3 e Animal).....	53
<i>Figura 22</i> Volumes das Bandas J à Banda L, diferencialmente expressos, observados nos perfis proteicos (ureia-PAGE) (média ± desvio padrão da média), em queijos produzidos com os 3 ecótipos de agente coagulante vegetal (Cynara 1, Cynara 2, Cynara 3) e com agente coagulante animal (Animal), para todas as fases de maturação (Dia 1, Dia 7, Dia 14, Dia 21, Dia 35, Dia 49 e Dia 63)	55
<i>Figura 23</i> Evolução da percentagem relativa (média ± desvio-padrão da média) das pré- α_s -caseínas ao longo dos dias de maturação (Dia 1, Dia 7, Dia 14, Dia 21, Dia 35, Dia 49 e Dia 63) para os quatro agentes coagulantes utilizados (Cynara 1, Cynara 2, Cynara 3 e Animal)	56
<i>Figura 24</i> Evolução da percentagem relativa de volume das quatro zonas de caseínas (γ -, β -, α_s - e pré- α_s -caseínas) ao longo dos dias de maturação (Dia 1, Dia 7, Dia 14, Dia 21, Dia 35, Dia 49 e Dia 63), para os quatro agentes coagulantes utilizados: Cynara 1; Cynara 2; Cynara 3; Animal.	58
<i>Figura 25</i> Diferenciação entre os queijos fabricados com os três ecótipos de Cynara cardunculus L. (Cynara 1, Cynara 2 e Cynara 3) com base no perfil das caseínas.....	61

1. Introdução

Em Portugal existe uma grande variedade de queijos de ovelha, com características físico-químicas e organolépticas muito específicas, resultado dos diversos processos de fabrico e de vários fatores diretos e indiretos que afetam e determinam a cadeia de produção de um queijo. O uso do agente coagulante, extraído da planta *Cynara cardunculus* L. é uma obrigação legal na grande maioria dos Queijos de Ovelha com Denominação de Origem Protegida (DOP), como acontece em vários países da bacia Mediterrânea (Pinheiro, 2002).

Dos diversos queijos produzidos no Alentejo, com grande tradição e muito afamados e apreciados, destaca-se o Queijo de Évora DOP, sobretudo pela particularidade das suas características físicas (tamanho pequeno). É um queijo curado, de pasta dura ou semidura, ligeiramente amarelado, sendo obtido a partir da coagulação do leite cru de ovelha com agente coagulante *Cynara Cardunculus* L., caracterizando-se por um sabor e aroma picantes e acidulado (“Caderno de Especificações do Queijo de Évora,” n.d.).

A planta do género *Cynara*, vulgarmente designada por cardo, é uma planta que possui estames de cor violácea-azulada, que após serem cortados dos capítulos e secos são utilizadas diretamente como coagulantes, ou podem ser preparados para extrair a substância coagulante (extrato aquoso) (Correia et al., 2016; Ramos, 2015; Sarmiento et al., 2009; Sousa & Malcata, 2002). Como as enzimas extraídas são enzimas naturais, os queijos ficam aptos para os consumidores vegetarianos e para a sua comercialização em mercados ecológicos, abrangendo uma maior gama de consumidores (Pino, Prados, Galán, McSweeney, & Fernández-salguero, 2009; Prados, Pino, & Fernández-salguero, 2007).

Vários estudos (Martins, Vasconcelos, & Sousas, 1996; Roa, López, & Mendiola, 1999; Roseiro, Barbosa, Ames, & Wilbey, 2003; Sousa & Malcata, 1997; Tejada & Fernández-Salguero, 2003) têm sido feitos no sentido de conhecer o comportamento enzimático deste extrato aquoso assim como a atividade e a especificidade das suas proteases e o seu efeito nalgumas variedades de queijos.

Todavia, considerando a diversidade de queijos, as formas de preparação do extrato, assim como a especificidade das suas enzimas e a própria biodiversidade da planta, surgem na bibliografia resultados por vezes contraditórios, particularmente no que diz respeito à atividade proteolítica desta planta e aos seus efeitos nas características de textura e organolépticas das muitas variedades de queijos. Da mesma forma, também têm sido realizados vários estudos comparativos da atividade proteolítica entre agentes coagulantes vegetais e animais

(Fernández-Salguero & Sanjuán, 1999; Sousa & Malcata, 1997; Tejada & Fernández-Salguero, 2003).

A proteólise é considerada, por alguns autores (McSweeney & Fox, 1997; Sousa, Ardö, & McSweeney, 2001), o processo bioquímico mais importante e complexo que ocorre durante a maturação dos queijos, e apresenta um padrão muito variável e praticamente único para cada tipo de queijo, o que vai afetar diretamente o desenvolvimento das características de sabor e textura dos queijos (Galán, Prados, Pino, Tejada, & Fernández-Salguero, 2008; Irigoyen, Izco, Ibáñez, & Torre, 2001, 2002; Prados et al., 2007).

São várias as técnicas eletroforéticas utilizadas para avaliar a proteólise nos queijos, ao longo da maturação, nomeadamente: (i) eletroforese em géis de poliacrilamida, principalmente utilizando ureia (ureia-PAGE) ou dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE) e a focagem isoelétrica (uni-dimensional ou associada à eletroforese bidimensional-2D) (ii) cromatografia Líquida de alta eficiência (HPLC) (iii) métodos imunológicos ou (iv) mais recentemente, um outro tipo de eletroforese, nomeadamente eletroforese capilar (Jin & Park, 1996; Ordiales et al., 2012, Petrella et al., 2015; Veloso, Teixeira, & Ferreira, 2002).

Considerando a ampla variedade de queijos com diferentes características, particularmente na extensão e profundidade da proteólise e tempos de maturação, alguns desses métodos são mais adequados e exequíveis, nomeadamente o método de ureia-PAGE é o que tem apresentado uma maior aplicabilidade no estudo da proteólise de queijos de ovelha (Veloso, 2001).

Tendo em conta a crescente valorização da flor do género *Cynara cardunculus* L., no fabrico do queijo tradicional de ovelha, e o interesse no seu cultivo em países Mediterrâneos, surge esta necessidade de investigar o efeito do seu agente coagulante na proteólise durante a maturação dos queijos.

Deste modo, este trabalho pretende analisar a influência de três diferentes ecótipos de *C. cardunculus* (tendo um agente coagulante animal como controlo), na degradação das frações das caseínas do Queijo de Évora, ao longo do processo de maturação, utilizando a metodologia de eletroforese em gel de poliacrilamida com ureia (ureia-PAGE).

2. Revisão bibliográfica

2.1. O Queijo de Évora

O Queijo de Évora é um produto com Denominação de Origem Protegida (Figura 1) desde 1994, que é reconhecido e registado pelo Regulamento (CE) nº 1107/96, de 12/06. A área geográfica delimitada da sua produção consta do Despacho nº 29/94, de 04/02.

No âmbito da Denominação de Origem devem ser garantidas a origem das matérias-primas dos produtos em questão, cuja qualidade ou características se devam essencial ou exclusivamente a um meio geográfico específico, incluindo fatores naturais e humanos e cuja produção, transformação e elaboração ocorram na área geográfica delimitada.



Figura 1 Símbolo de Denominação de Origem Protegida (DOP)

Este queijo é preparado com leite cru, proveniente de ovelha, não tendo no caderno de especificações mencionado a raça de ovelha específica. Contudo, tradicionalmente, a região de Évora é produtora de ovinos, maioritariamente da raça Merino, com o objetivo da exploração de carne, leite e lã (Pinheiro, 2002). O leite desta raça e de outras raças de ovelha, tem sido destinado, na sua totalidade à produção artesanal de queijo, tratando-se de uma tecnologia com grande tradição para a região (Silva, 1994).

O Queijo de Évora é obtido por esgotamento da coalhada após a coagulação de leite cru estreme de ovelha, por ação de uma infusão de cardo (*Cynara Cardunculus* L.), que lhe confere um sabor e aroma característico, ligeiramente picante e acidulado, sendo mais acentuado no queijo de pasta dura (“Caderno de Especificações do Queijo de Évora,” n.d., “Despacho 29/94 de 4 de fevereiro,” n.d.).

Uma lista completa das principais características físico-químicas e organolépticas, bem como das condições de maturação deste queijo, conforme se encontra no Caderno de Especificações, é apresentada na Tabela 1.

Tabela 1 Principais características físico-químicas e organoléticas, bem como condições de maturação do queijo de Évora conforme previstas no Despacho 29/94 de 4 de fevereiro

Características físico-químicas e organoléticas				
Forma	Cilíndrico baixo (prato)			
	Abaulamento lateral e ligeiro na face superior			
	Sem bordos definidos			
Dimensões e Peso		Diâmetro (cm)	Altura (cm)	Peso (g)
	Queijos pequenos (<i>Pasta Dura</i>)	6 a 8	2 a 4	60 a 90
	Merendeiras (<i>Pasta Dura e semidura</i>)	12 a 14	2 a 4	120 a 200
		13 a 15	1,5 a 3	200 a 300
Crosta	<i>Aspetto:</i>	Inteira, bem formada, lisa ou ligeiramente rugosa		
	<i>Cor:</i>	Amarela, escurecendo em contacto com o ar		
	<i>Consistência:</i>	Dura e semidura		
Consistência da Pasta		Teor de humidade (%) ¹	Teor de gordura (%) ²	
	<i>Dura</i>	49-56	45-60	
	<i>Semidura</i>	54-63		
Características da Pasta	<i>Textura:</i>	Fechada e bem ligada		
	<i>Aspetto:</i>	Untuosa e com alguns olhos pequenos		
	<i>Cor:</i>	Amarelada uniforme		
	<i>Cheiro e sabor:</i>	Cheiro e sabor característicos, ligeiramente picante e acidulado, sendo mais acentuado nos queijos de pasta dura		
	<i>Condições ambientais</i>	Temperatura (°C):	8-15	
Condições de Maturação		Humidade (%):	80-95	
	<i>Tempo mínimo de maturação</i>	Queijos de pasta semidura:	30 dias	
		Queijos de pasta dura:	90 dias	

¹ Referido ao queijo isento de matéria gorda; ² Referido ao extrato seco

Tanto a preparação, como a maturação deste queijo têm que se restringir a uma área geográfica definida (Figura 2), que abrange os concelhos de Alandroal, Arraiolos, Avis, Borba, Estremoz, Évora, Fronteira, Montemor-o-Novo, Mourão, Portel, Redondo, Reguengos de Monsaraz, Sousel, Vendas Novas, Viana do Alentejo e Vila Viçosa, no distrito de Évora.



Figura 2 Área geográfica de produção, transformação e elaboração do Queijo de Évora

2.2. O processo de fabrico do queijo

A produção de queijo é uma das atividades mais antigas da humanidade, e apesar de não se saber bem a sua origem, sabe-se que remonta a antiguidade, uma vez que aparece em sociedades muito diversas e em contextos e habitats muito diferentes.

A maioria dos investigadores considera que o queijo foi inicialmente produzido no Médio Oriente. Diz-se que um árabe, para se alimentar numa travessia do deserto, encheu os alforjes, da sua montada com leite, sendo que após uma longa caminhada, verificou que o leite se tinha separado, originando um líquido e uma massa branca sólida e uniforme. Os alforjes eram feitos do estômago de animal jovem, contendo uma enzima coagulante, que associada ao calor e movimento, resultou no fenómeno da coagulação (Alzugaray & Alzugaray, 1991).

O fabrico de queijo encontra-se localizado essencialmente na Europa, América do Norte e do Sul, Austrália e Nova Zelândia, sendo em menor dimensão no Norte de Africa e no Médio Oriente. É, na sua essência, um processo para conservar os componentes do leite, um produto alimentar facilmente perecível, por períodos mais ou menos longos, e de forma mais ou menos alterada face às características iniciais (McSweeney & Fox, 1997).

Quanto ao fabrico de queijo em Portugal, pensa-se que remonte aos tempos das invasões romanas (cerca de 200 a.C.) sendo as técnicas de fabrico melhoradas pelos invasores Árabes, que deixaram, pelo menos, testemunhos etimológicos, como *alavão* e *almece*. O primeiro, deriva da palavra árabe “allabban” que significa “que dá muito leite”. O segundo, deriva da palavra “almeiz” que curiosamente só é utilizada no Alentejo e nos Açores, demonstrando a migração da população Alentejana para aquele arquipélago (Pinheiro, 2002). Com o passar dos anos, face aos diferentes hábitos das populações que se dedicavam à pastorícia, e outros fatores, o processo de fabrico e os produtos resultantes foi sendo específico de cada região, originando provavelmente a génese das regiões de produção delimitadas (Camacho, 1989 citado por Rosa *et al.*, 2005). Foram surgindo assim queijos com características próprias, dependentes de vários fatores, nomeadamente da espécie e raça dos animais da qual provém o leite, do agente coagulante utilizado, do processo de produção e das condições de maturação do queijo (Rosa, Lidon, & Oliveira, 2005).

O fabrico do queijo é considerado um processo complexo, uma vez que envolve muitas etapas e várias modificações bioquímicas (Fox *et al.*, 2000; Fernandes *et al.*, 2001; Ventura, 2003; Walstra *et al.*, 2006 citados em Moreira, 2011), que se encontram todas dependentes umas das outras, o que significa que é necessário controlar minuciosamente cada etapa. Os passos essenciais do fabrico do queijo, podem resumir-se no diagrama apresentado na Figura 3.

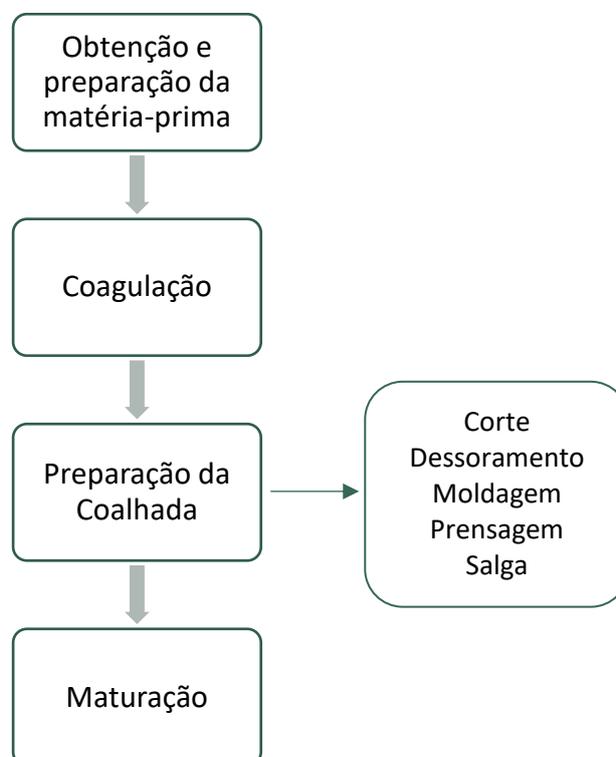


Figura 3 Diagrama genérico do fabrico de queijo.

O processo inicia-se pela seleção e preparação do leite o qual chega cru à queijaria. Este pode sofrer algum tratamento térmico ou não. Por acidificação ou adição de um agente coagulante, o leite é transformado num gel, denominado coágulo ou coalhada. Nesta fase vários fatores, denominados fatores tecnológicos, tais como a composição química do leite, características microbiológicas, o pH, a temperatura e tempo de coagulação são determinantes nas características da matriz primária do queijo. Durante a preparação da coalhada, esta pode sofrer várias ações, como por exemplo, o aquecimento e a salmoura. Posteriormente segue-se o corte da coalhada, permitindo obter uma maior superfície livre, o que vai facilitar a saída do soro. O dessoramento diz respeito então a esta remoção do soro, de forma rápida e suave, o que vai ser muito importante na qualidade e poder de conservação do queijo. De seguida, procede-se à moldagem, em que a massa da coalhada é colocada em moldes, também denominados cinchos, e é espremida lentamente. A prensagem serve sobretudo para melhorar a consistência, a textura e a forma do queijo, eliminando o excesso do soro.

A salga pode ser efetuada no leite, na coalhada e no queijo após o fabrico. Esta, para além de funcionar como condimento, remove a humidade do queijo através do efeito osmótico. O sal adicionado contribui para o sabor, durabilidade e consistência do queijo, assim como, para a sua maturação (Moreira, 2011).

Após os tratamentos finais (prensagem, salga, embalagem, etc...) o queijo fresco pode ser consumido ou é mantido durante algum tempo a determinadas condições de temperatura e humidade, iniciando-se a fase de maturação.

O processo de maturação é efetuado em câmaras, com controlo da humidade e temperatura. Dependendo das características de cada variedade de queijo e do objetivo do queijeiro, o queijo pode passar por várias câmaras com diferentes combinações de temperatura e humidade até atingir as características únicas que se pretende que o queijo apresente.

Pode dizer-se que o fabrico do queijo é um conjunto das várias técnicas utilizadas durante a transformação do leite em queijo, que vai caracterizar todo processo e que, por sua vez, se vai apresentar determinante nas características organolépticas do produto final, tão importantes na sua aceitação ou rejeição por parte dos consumidores (Guiné, Correia, & Correia, 2015).

Portanto, os dois grandes fenómenos que presidem ao fabrico do queijo são: a *coagulação* e *maturação*, pelo que são os processos que vão ser referidos ao longo deste trabalho.

2.3. A Coagulação

A coagulação é um processo essencial no fabrico de queijo, sendo mesmo o fenómeno central. Consiste num fenómeno pelo qual a caseína se separa dos restantes constituintes do leite, por ação de proteases, o que corresponde à formação de um coágulo sólido, a coalhada, que encerra os restantes componentes do leite em proporções diferenciadas consoante o seu estado no leite e os procedimentos e condições de fabrico adotadas, e por outro lado, dá origem a um líquido, o soro, que por sua vez também contém, em suspensão algumas substâncias sólidas (Fernandes, 2013; Sá e Barbosa, 1990 citado por Machado, 1997).

Podem distinguir-se três mecanismos de coagulação, que dão origem a queijos diferentes (Cavalcante, 2004 citado por Fernandes, 2013; Pinheiro, 2002):

1) A coagulação pela adição de uma protéase ácida ao leite, a valores de pH 6,4-6,6, que pode ser conseguida por um grande número de enzimas proteolíticas de diversas origens (Fox, 1993 citado por Machado, 1997). É o mecanismo que constitui a base do processo de fabrico dos queijos com uma coagulação pela ação do agente coagulante, cuja produção representa a maioria da produção mundial de queijos;

2) A coagulação por acidificação lenta do leite, a valores de pH de 4,6-5,0, através da conversão da lactose a ácido láctico por adição de ácidos, substâncias acidogéneas e culturas de arranque. Este mecanismo constitui a base da tecnologia aplicada, por exemplo, ao queijo *Cottage*;

3) A coagulação pela combinação da acidificação e aquecimento, mecanismo utilizado, por exemplo no fabrico do queijo *Ricotta*.

Torna-se importante, para uma melhor compreensão de todo este processo, conhecer a composição do leite, uma vez que a ação coagulante se deve, essencialmente, a fatores de ordem físico-química e pode ser explicada pelo modo como os seus constituintes, em especial as proteínas, os hidratos de carbono e os lípidos se comportam perante os fatores externos.

As proteínas do leite são compostos orgânicos, de estrutura complexa e alta massa molecular, sintetizadas pelo encadeamento de aminoácidos, através de ligações peptídicas, e podem ser divididas em quatro grupos, de acordo com as suas propriedades físico-químicas e estruturais (Melo, 2016; Veiros, 2005; Veloso, Teixeira, & Ferreira, 2002): a) as caseínas, que se caracterizam por uma escassa solubilidade a pH 4,6 pH ao qual precipitam; b) proteínas do soro, que são solúveis, sendo a α -lactoalbumina, a β -lactoglobulina, a albumina do soro sanguíneo, imunoglobulinas e péptidos de baixo peso molecular as principais encontradas no leite; c)

proteínas das membranas dos glóbulos de gordura, que contribuem numa percentagem muito pequena para o conteúdo total de proteínas; d) enzimas e fatores de crescimento.

As caseínas são as proteínas mais importantes do leite e as mais estudadas, e constituem a fração micelar, que é composta por quatro tipos diferentes de caseínas: α_{S1} -, α_{S2} -, β - e κ -caseínas. Estas agrupam-se formando submicelas, que por sua vez se agrupam com fosfato de cálcio, levando à formação de micelas, constituindo uma estrutura muito estável. As submicelas assemelham-se a esferas dando também à micela uma forma esférica imperfeita (Figura 4). Esta fração proteica desempenha ainda um efeito protetor, contra a ação do calor, em relação às outras proteínas, evitando a sua precipitação (Veiros, 2005; Veloso et al., 2002).

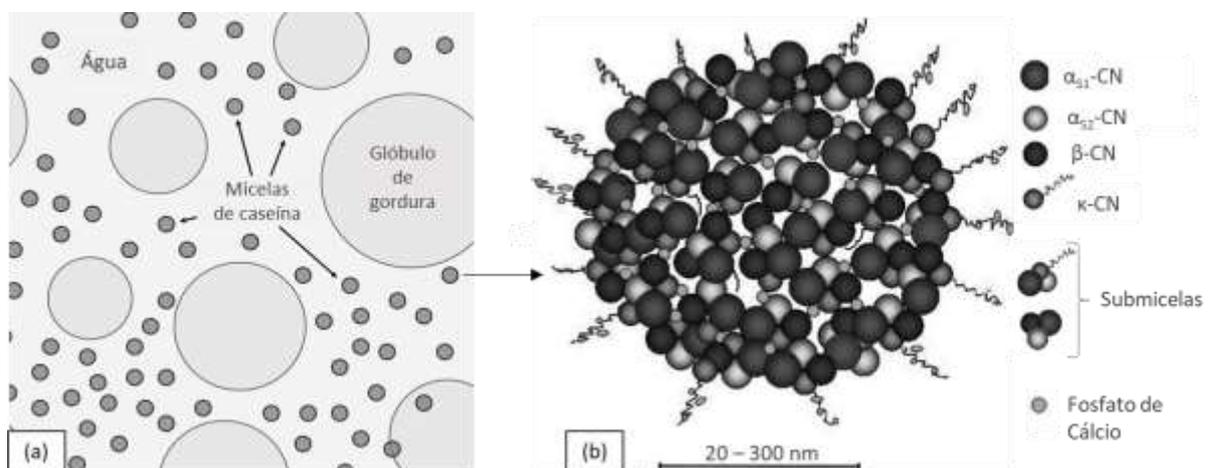


Figura 4 (a) Representação do leite e dos seus constituintes; (b) Representação da micela da caseína, constituída pelas submicelas, que se encontram ligadas pelo fosfato de cálcio (Baseado em Rebouillat & Ortega-Requena (2015))

A κ -caseína, possui uma cadeia peptídica, cuja estrutura primária apresenta duas regiões com características diferentes, assumindo um papel importantes na estabilidade da micela. Dispõe-se à superfície das micelas com o segmento terminal amínico, mais higróforo, interagindo com a parte central da submicela e o segmento do C-terminal mais hidrófilo, interagindo com o meio aquoso circundante. As submicelas com menor quantidade de κ -caseína ocupam posições mais internas na micela enquanto que as com maior quantidade de κ -caseína se situam na periferia (Pires *et al.*, 1994).

O fenómeno de coagulação do leite pode ser dividido em duas fases: uma primeira fase, enzimática, que resulta do ataque da κ -caseína e conseqüente hidrólise, e uma segunda fase, não enzimática, com o início do processo de agregação das micelas que foram desagregadas. Na presença de um agente coagulante, as enzimas agem sobre a fração da κ -caseína, sendo esta quebrada na ligação Phe₁₀₅-Met₁₀₆, produzindo a *para*- κ -caseína (fração hidrófoba) e um macropéptido (fração hidrófila). Quando cerca de 85% da κ -caseína está hidrolisada, inicia-se

a segunda fase que inclui a agregação dos fragmentos da *para*-κ-caseína com outros componentes da caseína, por pontes químicas formadas pelos íons de cálcio, que resulta na formação de um coágulo (Dalglish, 1993; Koning, 1978; Winwood, 1989 citados por Pinheiro, 2002; Satyendra & Bhavdish, 1994). O soro é então removido desta estrutura, em parte por um processo de contração espontânea (sinérese) e por pressão exterior. No final desta fase o queijo apresenta já uma concentração de proteína entre quatro a cinco vezes superior à do leite (Pires *et al.*, 1994).

2.3.1. Os agentes coagulantes

Nem todas as enzimas proteolíticas são enzimas capazes de coagular o leite. Os coagulantes são geralmente da classe das proteases ácidas (Irigoyen *et al.*, 2001; Veloso, 2001), que têm uma elevada atividade específica na κ-caseína (Dalglish, 1992 citado em Veloso, 2001), como já foi mencionado anteriormente.

Os agentes proteolíticos envolvidos no processo de coagulação do leite podem ser provenientes de diversas fontes (Irigoyen *et al.*, 2001; Veloso, 2001):

- i) Proteases nativas do leite (ex.: plasmina);
- ii) Coalho, proveniente do estômago de mamíferos jovens, não desmamados; proteases aspárticas de origem vegetal (ex.: provenientes das flores de *Cynara cardunculus* e *Cynara humilis*), ou ainda por proteases ácidas (ex.: provenientes de *Rhizomucor miehei*, *R. pusilus* ou *Cryphonectria parasítica*);
- iii) Proteases e peptidases de microrganismos constituintes de culturas lácteas de arranque (ex.: *Lactococcus thermophilicus*, *Streptococcus* e *Lactobacillus*) ou microrganismos secundários associados ao desenvolvimento de características específicas (ex.: leveduras e fungos) (Vioque *et al.*, 2000).

2.3.1.1. Os agentes coagulantes de origem animal

O termo *rennet* (coalho) refere-se geralmente a um extrato enzimático obtido do 4^o compartimento do estômago do vitelo (abomaso) com 10 a 30 dias de idade durante o período de alimentação láctea, podendo este período prolongar-se mediante várias precauções (Sá e Barbosa, 1990 citado por Machado, 1997; Fernandes, 2013), que é utilizado para coagular o leite para a produção de queijo (Satyendra & Bhavdish, 1994). Todavia é frequentemente utilizado o termo *rennet* (coalho) para qualquer enzima que exiba atividade coagulante no leite. Para

uniformizar a nomenclatura o comité da FAO (citado por Satyendra e Bhavdish, 1994) propôs o termo *rennet* precedido do termo que denomina a origem da enzima, como exemplo, *calf rennet*, *animal rennet*, *microbial rennet* e *plant rennet*.

De outras espécies animais, o abomaso do borrego, cabrito, suíno e galináceos é utilizado desde os tempos antigos no fabrico de queijo (Vioque *et al.*, 2000), e são a seguir à espécie bovina os mais utilizados na indústria queijeira (Irigoyen, Izco, Ibáñez, & Torre, 2002; Veríssimo, Esteves, Faro, & Pires, 1995).

A proporção das enzimas nas diferentes espécies é variável, possuindo o abomaso de borregos de 6-12 meses 100% de pepsina ovina, e o de cabrito 75% de quimosina e 25% de pepsina. Os coalhos de borrego e de cabrito são muito usados na produção de alguns queijos em Itália contendo para além das proteases, uma lipase (esterase) pré-gástricas (PGE) e lipases gástricas (Satyendra & Bhavdish, 1994).

À medida que o vitelo cresce, a quimosina é substituída pela pepsina, mas a secreção de quimosina na vaca adulta não pára completamente. Estas duas enzimas diferem ligeiramente no poder coagulante e proteolítico, pelo que o efeito na formação do coágulo e durante a maturação do queijo, depende da proporção destas duas enzimas, em função da idade do bovino. Irigoyen *et al.* (2001) concluiu que o uso de agentes coagulantes com diferentes proporções destas duas enzimas, originaram diferentes ações proteolíticas no queijo espanhol *Roncal*.

Comparativamente, a proporção da atividade de coagulação do leite pelo coalho do vitelo varia de 55 a 95% e de 5 a 45% com o coalho de bovino adulto (Guinee & Wilkinson, 1992). Assim as proporções de quimosina e pepsina, presentes no estômago de jovens ruminantes, variam de acordo com a idade do animal e tipo de alimentação. Por exemplo, quando o coalho é proveniente de estômagos de bezerras jovens, possui um alto teor de quimosina, sendo a sua composição, normalmente 80-90% de quimosina e 10-20% pepsina (Antunes *et al.*, 2004 citado por Fernandes, 2013; Sousa, Ardö, & McSweeney, 2001). A proporção, normalmente presente, nos coagulantes comerciais é de cerca de 70% de quimosina e 30% de pepsina. Ou seja, a teor de quimosina decresce com o crescimento do animal, acompanhado por um aumento do teor de pepsina (Fernandes, 2013; Sousa *et al.*, 2001).

A produção de agente coagulante animal mostra-se insuficiente para fazer face às necessidades do mercado do queijo (Irigoyen, Izco, Ibáñez, *et al.*, 2002), para além da sua utilização poder estar limitada por motivos religiosos (ex.: Judaísmo e Islamismo), por motivos de alimentação (o caso do vegetarianismo), ou até mesmo por factos como a incidência da BSE

(bovine spongiform encephalopathy) que reduziu tanto a oferta como a procura deste agente coagulante (Roseiro et al., 2003).

Devido a estes fatores, mostra-se a importância do aparecimento de agentes coagulantes substitutos, como é o caso dos agentes coagulantes microbiano e vegetal.

2.3.1.2. Os agentes coagulantes de origem microbiana

O uso de coagulantes de origem bacteriana e fúngica, tem sido difundido nos últimos anos, devido a fatores como o aumento da produção leiteira, o aumento da produção mundial de queijos e a conseqüentemente escassez da disponibilidade de coalho bovino, bem como as constantes críticas aos preparados comerciais de enzimas coagulantes, que levaram à investigação de novos tipos de agentes coagulantes (Fernandes, 2013).

Tem-se investigado a capacidade proteolítica e coagulante de várias culturas de bactérias e fungos, variando a sua atividade de acordo com o pH e com o sistema enzimático. Por exemplo, microrganismos geneticamente modificados têm sido investigados para a produção de coagulantes comerciais (Fernandes, 2013).

Vários microrganismos são conhecidos por produzirem enzimas coagulantes, nomeadamente os de *M. miehe* e de *M. pusillus*, que tem obtido resultados satisfatórios na produção de queijos, do tipo Cheddar, Gouda, Edam, entre outros (Fernandes, 2013).

Os agentes coagulantes de origem microbiana, assim como os de origem animal, possuem uma vantagem que consiste no facto de produzirem queijos mais uniformes, para além da sua utilização se traduzir numa produção mais barata e mais fácil, uma vez que são evitadas todas as etapas de recolha, secagem e preparação anteriores ao fabrico (Roseiro *et al.*, 2003). No entanto, na sua maioria são muito proteolíticos e não têm uma atividade específica, o que resulta num processo de maturação muito rápido, pelo que a qualidade organolética dos queijos é, no geral, inferior (Machado, 1997; Pinheiro 2002).

2.3.1.3. Os agentes coagulantes de origem vegetal

Vários extratos de plantas, que tem a capacidade de coagular leite, também possuem atividade proteolítica. São várias as enzimas de origem vegetal (proteases), sendo recolhidas das raízes, das folhas, frutos, sementes e flores de diversas plantas (ex: *Ficus sp.*, *Carica papaya*), no entanto muitas possuem uma relação entre o tempo de coagulação e a atividade proteolítica

tão baixa, que vai inviabilizar o seu uso, devido a uma excessiva proteólise (Fernandes, 2013; Roseiro *et al.*, 2003; Satyendra & Bhavdish, 1994).

Várias proteases de origem vegetal têm sido investigadas quanto à sua capacidade coagulante do leite, no entanto, apenas uma pequena quantidade destas enzimas foram isoladas e parcialmente caracterizadas, pelo que uma das características únicas que distingue estas proteases é um segmento extra de cerca de 100 aminoácidos residuais que não apresentam qualquer tipo de semelhança com as proteases de origem animal ou microbiológica (Faro, Verissimo, Lin, Tang, & Pires, 1995).

Apesar da utilização dos agentes coagulantes de origem vegetal durante vários séculos, um maior interesse sobre estes surgiu nos anos sessenta, quando um aumento do consumo de queijo levou à falta de agente coagulante animal. No entanto, algumas investigações revelaram que os coagulantes vegetais apresentam algumas desvantagens que limitam seu uso (Guinee & Wilkinson, 1992; Roseiro *et al.*, 2003).

Em 1972, num trabalho que se considera uma referência obrigatória nesta área, Sá e Barbosa (citados por Pires *et al.*, 1994) estudaram as propriedades de queijos produzidos com extratos da flor do cardo e diferentes tipos de leite. Neste trabalho os autores mostraram que os extratos de cardo tinham, na sua generalidade, uma atividade proteolítica mais elevada do que se refere a leite de vaca, o que determinava um rendimento mais baixo, além disso, notaram o aparecimento de sabores amargos. Apesar destes inconvenientes, os autores concluíram que os extratos de cardo produzem excelentes queijos de ovelha e podem ser satisfatoriamente utilizados como substitutos dos outros agentes coagulantes.

Embora a maioria dos coagulantes de origem vegetal tenha apresentado uma proporção baixa quanto à capacidade coagulante do leite e à atividade proteolítica, o que resulta em péptidos amargos em queijos curados ou num poder de coagulação excessivamente baixo, o que leva, conseqüentemente, a um rendimento de fabrico baixo. Estas dificuldades apresentadas por este tipo de coagulantes resultam, principalmente, pela composição muito característica do extrato da planta, que contém um cocktail complexo de enzimas cuja atividade é muito difícil de controlar (Sousa *et al.*, 2001). A exceção quanto às outras proteases de plantas é a protease das flores secas da *Cynara cardunculus* L. (Sousa *et al.*, 2001), que vai ser referida de seguida.

2.3.1.3.1. O género *Cynara*

Cynara cardunculus L., vulgarmente conhecido por cardo, pertence à família *Asteraceace*, onde se incluem as variantes de cardo silvestre, a alcachofra e o cardo cultivado (Figura 5). É uma variedade espinhosa do cardo, que se assemelha à alcachofra e que, durante o Verão, produz grandes cabeças e uma flor roxa. Esta variedade de cardo cresce abundantemente em solos secos, pedregosos e não cultivados, na região sul e Nordeste de Portugal, que também tem sido identificada em diversas regiões da bacia Mediterrânica, Ilhas Canárias, Ilha da Madeira e no Nordeste Africano (Correia et al., 2016; O'Mahony, Sousa, & Mcsweeney, 2003; Sousa & Malcata, 2002).



Figura 5 Aspeto morfológico de cada uma das variantes de *Cynara cardunculus* L.: cardo silvestre (a), alcachofra (b) e cardo cultivado (c)

A sua dispersão está relacionada com a sua adaptabilidade a uma grande variedade de condições edafo-climáticas. Com efeito é uma planta que é capaz de crescer de forma espontânea em condições de habitat extremas, isto é, em temperaturas elevadas e stress hídrico, que pode ser em zonas marginais de campos de cultura, em solos secos, rochosos e não cultivados (Sousa & Malcata, 2002)

A expansão de *Cynara cardunculus* L. remete para as zonas onde o extrato desta planta tem sido utilizada com sucesso no fabrico de queijos tradicionais de ovelha, ou seja, maioritariamente em países Mediterrânicos, mais precisamente no Oeste Africano e no sul Europeu, sendo que Portugal e Espanha albergam a maior e mais variada produção (Roseiro et al., 2003). Em Portugal podemos referir: o Queijo Serra da Estrela, o Queijo de Serpa, o Queijo de Nisa, o Queijo de Azeitão e o Queijo de Évora, quanto a Espanha temos os queijos *Los Pedroches*, *La Serena*, *Torta del Casar*, *Manchego*, *Casar de Cáceres*, por exemplo (Galán et al., 2008; Ramos, 2015; Roseiro et al., 2003; Sousa et al., 2001).

2.3.1.3.2. Preparação do extrato aquoso para a coagulação

Na prática, ainda não existem condições *standart* para o processo de cultivo, corte e secagem desta planta, mas existem várias maneiras de preparação do extrato aquoso a partir dos pistilos da flor de *Cynara cardunculus* L., pelo que se costuma dizer que cada produtor tem o seu método, mas todos preparam o extrato aquoso no dia antes do fabrico (Roseiro *et al.*, 2003).

Normalmente, depois de colhida a planta madura, a flor é habitualmente seca em espaço aberto, à sombra, sendo posteriormente guardada em local seco, podendo também ser comprada em mercados locais em quantidades suficientes para o efeito (Roseiro *et al.*, 2003; Sousa & Malcata, 2002). Consequentemente, a atividade do extrato da planta é extremamente variável, uma vez que depende da variedade da planta, do estado de maturação, da parte da planta utilizada, do tempo de secagem e da quantidade final de humidade (Sousa & Malcata, 2002).

Tradicionalmente, os pistilos secos da flor de cardo (Figura 6) são utilizados no ano seguinte à sua colheita, durante a estação de fabrico de queijo (outubro a maio) para a preparação de extratos aquosos, com atividade enzimática, sendo posteriormente usados com o objetivo da coagulação do leite de ovelha (Sousa & Malcata, 2002).

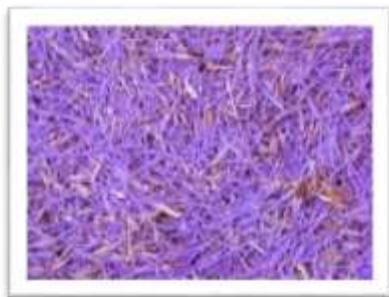


Figura 6 Pistilos da flor de cardo ("CARDOP," n.d.)

As proteases são facilmente extraídas, através da utilização de água e de uma ligeira maceração (Pino *et al.*, 2009), pelo que um dos métodos mais habituais de extração, e apresentado em diversas publicações, baseia-se na imersão de uma determinada quantidade dos pistilos num recipiente com água da torneira, à temperatura ambiente, durante várias horas. Posteriormente são moídas e filtradas através de panos de algodão. O líquido acastanhado obtido é o que vai ser adicionado ao leite para a indução da coagulação (Roseiro *et al.*, 2003; Sousa & Malcata, 2002). Normalmente este extrato aquoso é feito com flores de muitas variedades de *C. cardunculus* em diferentes estados de maturação, sendo alguns vezes

misturados com outras partes da planta. Isto pode afetar as condições de coagulação, essencialmente como consequência das condições em que a flor é seca (Sousa & Malcata, 2002).

Como consequência desta heterogeneidade do cardo utilizado, ou seja, da sua utilização sem um padrão aparente, vai existir uma influência negativa nos parâmetros de qualidade do queijo, que envolvem um baixo rendimento, a falta de homogeneidade sensorial entre os lotes, conduzindo a perdas económicas (Ordiales *et al.*, 2012; Sousa & Malcata, 2002).

A ter esta problemática em conta, regista-se a necessidade do controlo de qualidade deste extrato aquoso, que é utilizado como coagulante, sendo esta essencial para que haja uma uniformização do fabrico de queijo (Ordiales *et al.*, 2012).

2.3.1.3.3. Caracterização das proteases do género *Cynara cardunculus* L.

As enzimas extraídas das flores do género *Cynara cardunculus* L. são proteases ácidas, que pertencem ao grupo das proteases aspárticas, com o nome de ciprosinas, cardosinas e cinarases (Fernández-Salguero & Sanjuán, 1999; Prados *et al.*, 2007), e que têm sido isoladas, purificadas e caracterizadas quanto à sua atividade (Tejada, Gómez, & Fernández-Salguero, 2007). Estas estão entre as poucas enzimas vegetais que são usadas no fabrico de queijos, nos países Mediterrâneos. São caracterizadas por uma elevada capacidade coagulante, que vai levar à quebra da ligação Phe₁₀₅-Met₁₀₆ das κ -caseínas ovinas (Galán *et al.*, 2008; Pino *et al.*, 2009; Prados *et al.*, 2007; Sousa *et al.*, 2001).

Christen e Virasoso (1935) foram os primeiros a estudar as propriedades das enzimas proteolíticas do cardo, concluindo que a atividade coagulante existe apenas nos estames das flores. Assim, inicialmente atribuía-se a atividade coagulante do cardo unicamente à presença de 3 enzimas proteolíticas, sintetizadas pelos estigmas das flores, nomeadamente, as cinarases 1,2 e 3, que foram isoladas e purificadas e caracterizadas quanto à sua atividade (Heimgartner *et al.*, 1990).

Duas novas proteases aspárticas ácidas, a cardosina A e B, foram isoladas, acreditando-se possuir diferenças genéticas das enzimas mencionadas previamente, quanto à sua especificidade e atividade. As cardosinas A e B são, respectivamente, semelhantes à quimosina e à pepsina (Delgado, Rodríguez-Pinilla, González-Crespo, Ramírez, & Roa, 2010; Sousa *et al.*, 2001; Vioque *et al.*, 2000). Adicionalmente, Veríssimo *et al.* (1996) citados em Roseiro *et al.* (2003) concluíram que a Cardosina B apresenta uma especificidade mais vasta do que cardosina A.

Hoje em dia, ao contrário que se pensava, existem cardosinas de A a H (Sarmiento *et al.*, 2009). Estas proteases aspárticas, têm sido identificadas nos extratos de cardo obtidos segundo a metodologia tradicional. A atividade coagulante do extrato de cardo, tal como o que acontece com outros coagulantes, é influenciada por fatores tecnológicos bem conhecidos e identificados no fabrico de queijo, como a temperatura (fator exógeno), pH, a composição do leite, entre outros, pelo que nível ótimo de utilização é, em regra, ajustado de acordo com as principais variáveis que caracterizam o processo tecnológico (Sá e Barbosa, 1972 citado por Pires *et al.*, 1994).

Vários estudos recentes (Correia *et al.*, 2016; Guiné *et al.*, 2015; Ordiales *et al.*, 2013) apresentam resultados quanto ao efeito de vários ecótipos de *Cynara cardunculus* L. nas características físico-químicas e sensoriais dos queijos.

Em 2013, Ordiales *et al.* analisou a influência de 3 diferentes ecótipos de *Cynara cardunculus*, nas características de fabrico do queijo *Torta del Casar*. Estes ecótipos foram selecionados pela sua atividade coagulante e proteolítica sobre as caseínas, sendo que apresentou uma atividade coagulante mais elevada, depois de 24 horas de maceração, o que permitiu uma massa mais cremosa, viscosa e, de um ponto de vista geral, uma maior aceitabilidade do queijo. O agente coagulante com uma maior atividade proteolítica influenciou negativamente alguns parâmetros, tais como a acidez, o picante e a cremosidade. Assim, foi possível concluir que o cardo mais apropriado para o fabrico de queijo é o que possui uma atividade coagulante mais elevada, e com uma atividade proteolítica moderada, especialmente quanto à β -caseína.

Recentemente, Guiné *et al.* (2015) avaliaram as propriedades físico-químicas e sensoriais do queijo Serra da Estrela, feito com seis ecótipos do extrato da flor de cardo. Os resultados obtidos vêm confirmar os já acima referidos, que o tipo de agente coagulante utilizado, particularmente o ecótipo da flor de cardo, têm grande influencias nas propriedades do queijo, uma vez que foi determinada uma grande variabilidade na sua composição química. A análise sensorial permitiu identificar, com clareza, algumas diferenças, nomeadamente quanto à cremosidade, espessura da casca e uniformidade.

Um estudo muito parecido foi desenvolvido por Correia *et al.*, (2016), em que os queijos analisados também foram produzidos com o extrato de diferentes flores de cardo, mostrando os resultados que o ecótipo escolhido tem uma influência considerável no tempo de coagulação e nos parâmetros de cor. O ecótipo utilizado que conferiu um menor tempo de coagulação também foi o ecótipo que apresentou uma maior concentração total de cardosinas. Isto vem

confirmar o papel das cardosinas na redução do tempo de coagulação. Os queijos produzidos com os diferentes cardos foram significativamente diferentes relativamente às propriedades da casca e da pasta, bem como para as características sensoriais globais.

Não obstante os estudos já efetuados e o conhecimento já disponível sobre as propriedades das enzimas provenientes da flor de cardo, o conteúdo enzimático dos extratos e o efeito da variabilidade da flor/perfil enzimático não está completamente esclarecido e a utilização dos extratos de cardo continua a processar-se de forma tradicional, sem qualquer tipo de certificação ou de avaliação das soluções coagulantes (Martins, Vasconcelos, & Sousas, 1996).

2.4. A maturação

Esta é a fase de acabamento do queijo, onde as transformações da coalhada são intensas e em que as características finais do queijo se desenvolvem (Fox, 1993 citado por Machado, 1997). O queijo, e a sua maturação, trata-se de um sistema dinâmico que possui uma grande complexidade a nível químico, microbiológico e enzimático (Mallatou, Pappa, & Boumba, 2004). Estes processos são essencialmente a proteólise, a degradação de gordura (lipólise) e dos hidratos de carbono (glicólise), que conferem à coalhada características novas (Sousa & Malcata, 1997).

Os processos que ocorrem ao longo da maturação conduzem a uma degradação dos compostos em produtos primários e posteriormente em secundários, como representado na Figura 7. Durante a proteólise, as proteases quebram as ligações peptídicas e os fragmentos de proteínas, ocorrendo uma diminuição da atividade da água (a_w) com formação de grupos amina e carboxilo, e dá-se um aumento dos valores de pH que gera a libertação de compostos sápidos aquando da mastigação (Sousa *et al.*, 2001).

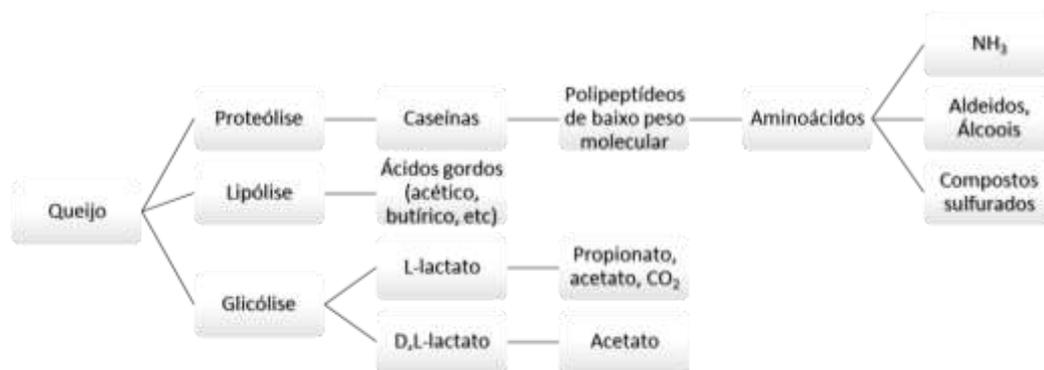


Figura 7 Esquema com as modificações químicas durante a maturação do queijo (adaptado de Baldini, 1998)

Durante este processo, desenvolvem-se as características da pasta, assim como o sabor e o aroma do queijo. Os fenómenos implicados nesta evolução são de grande complexidade devido, especialmente, à natureza do substrato, à variedade dos agentes responsáveis pelas transformações, à diversidade das modificações sofridas pelos constituintes e aos numerosos produtos químicos formados (Choisy *et al.*, 1987 citado por Machado, 1997).

O estudo da maturação engloba os três processos, a proteólise, a lipólise e a glicólise, já referidos, mas a ter em conta o interesse deste estudo será dada especial atenção ao primeiro processo, nomeadamente, a proteólise e os fatores que a influenciam, o agente coagulante e o tempo de maturação.

2.4.1. Proteólise

A proteólise é considerada o processo bioquímico mais importante que ocorre durante a maturação dos queijos (Fox, 1989 citado por Veiros, 2005; Irigoyen *et al.*, 2002; Moreira, 2011; Sousa *et al.*, 2001), e desempenha um papel fulcral no desenvolvimento da textura, assim como no desenvolvimento das características organoléticas do queijo, pelo que tem sido, nos últimos anos, uma ativa área de estudo, sendo considerada uma base para a classificação de queijos (Delgado *et al.*, 2010; Sousa *et al.*, 2001). No entanto esta classificação apresenta uma dificuldade devido ao facto do queijo ser um sistema dinâmico, como já foi referido, pelo que os resultados obtidos dependem maioritariamente da fase de maturação do queijo. Também se deve ter em conta que a taxa de degradação das proteínas, que está associada com a acessibilidade das enzimas aos substratos do queijo, o qual depende da estrutura e configuração da matriz do queijo (Sousa *et al.*, 2001; Veiros, 2005).

É comum considerar a proteólise como proteólise primária e proteólise secundária. A proteólise primária das caseínas é catalisada, principalmente pelas proteases contidas no agente coagulante, por exemplo, a quimosina e a pepsina, ou a cardosina A e B, e numa menor extensão pelos plasmídeos, constituintes do leite. A proteólise pode ser também posteriormente catalisada por enzimas de *starters* ou *non-starters* e por culturas secundárias que se desenvolvem durante o processo de maturação, que resulta nos produtos da proteólise secundária, que incluem os péptidos e aminoácido solúveis na fase aquosa do queijo (Delgado *et al.*, 2010; Veloso, 2001).

Mais especificamente, este processo é traduzido pela hidrólise da ligação Phe₁₀₅-Met₁₀₆ da k-caseína, que leva à formação da *para*-k-caseína e do glicomacropéptido, havendo uma

destabilização micelar, o que provoca a libertação da parte mais hidrofílica da κ -caseína (Pires *et al.*, 1994; Veiros, 2005; Veloso, 2001). A maior parte do glicomacropéptido é eliminado no soro, contudo, a *para*- κ -caseína permanece nas micelas da caseína, ficando, por isso, incorporada no queijo (Veiros, 2005).

O agente coagulante residual assim como plasmídeos, presente na coalhada, vão atuar na α e na β -caseína, o que origina uma fração insolúvel e a uma fração solúvel em água, que são péptidos de elevado peso molecular e de médio peso molecular, respetivamente (Delgado *et al.*, 2010; Sousa *et al.*, 2001; Veloso, 2001). Estes são posteriormente degradados em pequenos péptidos e em aminoácidos, por proteases provenientes de culturas lácteas de arranque ou das culturas secundárias (quando são adicionadas), que conseqüentemente vão contribuir para a formação do *flavour* (Delgado *et al.*, 2010; Pino *et al.*, 2009; Sousa *et al.*, 2001). Assim, os produtos finais da proteólise são estes aminoácidos e os pequenos péptidos (Sousa *et al.*, 2001).

A contribuição da proteólise nas características finais do queijo verifica-se nos seguintes níveis (Baldini, 1998; Delgado *et al.*, 2010; Moreira, 2011):

- i) Na matriz textual do queijo, devido à formação de péptidos que derivam da quebra de caseínas;
- ii) A produção de aminoácidos e péptidos, que vão funcionar como precursores para a formação de outros compostos;
- iii) A libertação de componentes do sabor, que de outra forma eram retidos na matriz proteica;
- iv) A libertação de amoníaco, que conduz a alterações do pH.

Assim, podemos concluir que a proteólise vai determinar as propriedades de textura, como a dureza, a coesão a adesividade e outras propriedades do queijo (Pinheiro, Machado, Bettencourt, & Matos, 2007), devido ao sistema de quebra de caseínas (Delgado *et al.*, 2010), e pode ser influenciada por fatores externos, como é o caso do agente coagulante, o que vai ter conseqüências na degradação proteica e, conseqüentemente, nas características organoléticas e texturais dos queijos (Pires *et al.*, 1994).

Por estes motivos, tem havido um grande interesse na caracterização do padrão e extensão da proteólise, para que esta sirva como índice de maturação, de qualidade e para a caracterização e contribuição de cada agente neste processo bioquímico (Fuquay *et al.*, 2011).

Em 2001, Sousa *et al.*, publicaram uma revisão sobre os avanços feitos no estudo da proteólise durante a maturação do queijo, tornando-se um trabalho de referência neste tema.

Este trabalho junta aspetos específicos da proteólise durante o processo de maturação dos queijos, nomeadamente: os agentes proteolíticos do queijo e algumas especificidades dos mesmos; comparação da proteólise dentro e entre variedades de queijos; identificação de péptidos no queijo; e o contributo da proteólise nas características olfato-gustativas do queijo.

2.4.1.1. Métodos de estudo da proteólise no queijo

São vários os métodos que têm sido usados na tentativa de avaliar a proteólise sofrida pelo queijo, durante a maturação, e podem ser divididos em:

- i) Métodos não específicos: baseiam-se na determinação do azoto total (TN) pelo método de Kjeldahl e na quantificação do azoto solúvel, medindo: i) o azoto solúvel em água a pH 4,6 (WSN); ii) o azoto não proteico, através de avaliação do azoto solúvel em ácido tricloroacético (TCA) a 12% (TCA) e iii) o azoto amídico (AN). Estas técnicas permitem obter uma informação quantitativa condensada sobre a proteólise, fornecendo informações globais sobre a extensão da mesma e sobre a atividade proteolítica dos vários agentes (Park & Jin, 1998; Tejada, Abellán, Cayuela, Martínez-Cacha, & Fernández-Salguero, 2008).
- ii) Métodos específicos: baseiam-se em técnicas electroforéticas ou cromatográfica, que permitem identificar e caracterizar, individualmente, os péptidos e os aminoácidos formados (Sousa & Malcata, 1997).

Assim, geralmente, recorrem-se aos métodos específicos, recorrendo a técnicas que permitem a separação e deteção das caseínas que se formam, de forma a caracterizar o processo de degradação da caseína, durante a maturação.

As técnicas a que se pode recorrer com este propósito são: técnicas cromatográficas, que se baseiam num processo de separação por migração diferencial; e técnicas eletroforéticas, baseando-se na migração de moléculas carregadas, em solução, sob a ação de um campo elétrico (Veiros, 2005; Veloso, 2001).

Mais especificamente, recentemente, os métodos desenvolvidos para análise das frações das caseínas são (Veloso *et al.*, 2002):

- i) Métodos imunológicos;
- ii) Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) por trocas iónicas, por interações hidrofóbicas por filtração do gel e por metodologias inversas, que tem resultado no

desenvolvimento de análises rápidas, com uma boa separação e com uma alta resolução;

- iii) Eletroforese, usando os géis de poliacrilamida com ureia (urea-PAGE) ou com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e com focagem isoeétrica, e mais recentemente a eletroforese capilar (CE) usadas principalmente para a monitorização da proteólise primária (Delgado *et al.*, 2010; Veloso, 2001).

Esta última técnica será a utilizada neste estudo, pelo que se dará uma especial importância.

2.4.1.1.1. Técnicas eletroforéticas

As técnicas eletroforéticas baseiam-se na migração de moléculas carregadas, em solução, sob ação de um campo elétrico. Todas as proteínas são constituídas por grupos com carga positiva e negativa, possuindo uma carga global não nula, exceto no seu ponto isoeletrico. Quando uma proteína é submetida a um campo elétrico, migra de acordo com a sua carga global e o seu peso molecular, em direção ao ânodo ou ao cátodo (Guillou *et al.*, 1986 citado por Veiros, 2005). A velocidade da migração das proteínas neste suporte depende da força do campo aplicado, da carga, do tamanho e da forma das moléculas, da força iónica, da viscosidade e da temperatura do meio (Rocha *et al.*, 2005)

A principal vantagem da separação de proteínas/péptidos pelo método de eletroforese em gel é que estas podem ser extraídas dos géis, digeridas e identificadas por espectrometria de massa, ou seja, permite a separação, quantificação e identificação e, nalguns casos, a quantificação simultânea das diferentes proteínas (Veloso, 2001).

A eletroforese tem sido muito utilizada no estudo da proteólise primária dos queijos, uma vez que apenas as proteínas e péptidos de maiores dimensões podem ser visualizados através dos métodos de coloração utilizados. Assim, é uma técnica limitada ao estudo da hidrólise das caseínas e dos seus principais produtos proteolíticos. Torna-se uma ferramenta muito importante no acompanhamento da proteólise das caseínas, nas etapas iniciais da maturação dos queijos, servindo para comparação do perfil de caseínas entre queijos (Marcos *et al.*, 1979 citado em Baldini, 1998).

A eletroforese na presença de dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) é uma técnica que permite a separação das proteínas em função da sua massa molecular, pois o SDS é um detergente que se liga fortemente às proteínas, na proporção da sua quantidade de aminoácios

e que confere a mesma carga a todas. Assim, separa estas moléculas apenas baseando-se na sua massa molecular (Strange *et al.*, 1992 citado por Veiros, 2005).

A eletroforese em géis de poliacrilamida na presença de ureia (ureia-PAGE) tem uma resolução semelhante à anterior, no entanto não é adicionado o detergente que confere a mesma carga às proteínas. Assim, a separação molecular ocorre não apenas tendo em conta a massa molecular, mas também quanto à carga nativa destas moléculas, que lhes confere uma maior ou menor mobilidade eletroforética. Por este motivo esta técnica permite uma melhor resolução das proteínas com massas moleculares muito próximas, como é o caso das caseínas, as quais a técnica de SDS não permite diferenciar com tanta clareza (Shalabi & Fox, 1987)

Vários autores têm usado a técnica de ureia-PAGE para o estudo da maturação dos queijos, nomeadamente quanto a eventuais alterações durante as fases do processo, ou quanto ao efeito de diferentes tipos de agente coagulante utilizado no processo (Roa *et al.*, 1999).

Shalabi & Fox (1987), citados por Baldini (1998), concluíram que a técnica de SDS-PAGE é inferior à de ureia-PAGE para a análise de queijos, uma vez que apresenta uma melhor resolução para peptídeos pequenos produzidos a partir das caseínas, não recomendando o seu uso. A mobilidade eletroforética na técnica de SDS-PAGE é inversamente proporcional ao logaritmo do peso molecular do péptido. Assim, como quase todas as caseínas possuem pesos moleculares semelhantes, elas não se apresentam bem separadas neste método (Veiros, 2005).

Os resultados que Veloso (2001) obteve realçam que a eletroforese em gel de poliacrilamida com ureia é uma técnica que pode ser aplicada com sucesso ao estudo da α -caseína e da β -caseína, que permite avaliar o tempo de maturação dos queijos, ou seja, a degradação da α -caseína, durante a maturação do queijo, que origina vários fragmentos com uma maior velocidade de migração que esta caseína. Apesar de apenas os péptidos de maior peso molecular poderem ser visualizados com esta técnica, este tipo de eletroforese tem sido largamente utilizado no estudo da proteólise do queijo ao longo da maturação.

A técnica de eletroforese bidimensional consiste em duas eletroforeses: a primeira, uma focagem isoelétrica, seguida de outra na presença de SDS. Desta forma, é possível realizar a separação de proteínas com base em duas propriedades diferentes ponto isoelétrico e peso molecular. É utilizada para se conseguir uma melhor separação de misturas proteicas extremamente complexas.

Esta técnica, apesar de ser muito útil como ferramenta de pesquisa, não se aplica às análises de rotina, uma vez que é uma técnica um pouco mais limitada no que consta à

combinação de baixos custos, tempo de análise reduzido e pequeno volume da amostra utilizado (Baldini, 1998).

Por último, outro tipo de eletroforese consideravelmente utilizado para avaliar a proteólise no queijo é a eletroforese capilar (CE). Esta técnica é conhecida pelo seu grande potencial para a separação de moléculas pequenas e diversas como é o caso dos aminoácidos, assim como pela capacidade da realização de separações em capilares com diâmetro interno reduzido, combinado com a aplicação de altas voltagens, resultando num aumento de eficiência e de resolução e diminuição dos tempos de análise. Esta versatilidade da Eletroforese Capilar torna-a uma técnica promissora para diversas áreas, em especial da biologia molecular (Spudeit, Dolzan, & Micke, 2012).

2.4.1.2. Efeito da maturação na proteólise dos queijos

Muitos estudos têm sido realizados ao longo dos anos, em muitas variedades de queijo, mostrando as diferenças na proteólise ao longo do processo de maturação.

A começar por Marcos *et al.* (1979), citado por Sousa *et al.* (2001) e por Delgado *et al.* (2010), comparou a proteólise entre variedades de queijo fabricados com leite pasteurizado (*Parmesan, Emmental, Gruyere e Roquefort*), através de uma análise por eletroforese, concluindo, de uma maneira geral que, em todos os queijos analisados, a α_s -caseína sofre uma maior degradação do que a β -caseína.

Macedo e Malcata (1996) estudaram a hidrólise das α_s - e das β -caseínas no queijo Serra da Estrela, durante o processo de maturação, através da eletroforese em géis de poliacrilamida. Estes autores concluíram que aos 35 dias ambas as caseínas sofrem uma forte degradação, sendo esta de 82 e 76%, respetivamente (Fernández-Salguero & Sanjuán, 1999).

Os resultados apresentados por Delgado *et al.* (2010), no queijo *Torta del Casar* mostram uma degradação lenta das α_{s1} -caseínas nos primeiros 30 dias de maturação, e pelo contrário, elevados níveis de degradação foram observados entre os 30 e os 60 dias, no entanto não apresentando diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os 60 e os 90 dias de maturação. Pelo contrário, a β -caseína apresentou uma degradação mais rápida nos primeiros 30 dias de maturação, sendo que nos dias seguintes a degradação foi mínima, e relativamente constante até ao fim do tempo de maturação. Globalmente, no fim do processo de maturação, aos 90 dias, a degradação da α_{s1} -caseína foi superior à da β -caseína, que apresentou um menor nível de

proteólise, atingindo 38% do nível inicial. Estes resultados foram muito semelhantes aos apresentados por Roa *et al.* (1999) no queijo “La Serena”.

Também Irigoyen *et al.* (2000) e Roserio *et al.* (2003) apresentam resultados semelhantes no queijo *Roncal* e no queijo de *Serpa*, respetivamente. Estes autores observaram uma proteólise mais rápida da α_{s1} -caseína do que da β -caseína, aos 90 dias de maturação, no qual a α_{s1} -caseína ficou completamente degradada no fim da maturação.

O queijo de *Serpa* também foi estudado por Alvarenga *et al.* (2008) que monitorizam as suas características reológicas e químicas, durante o processo de maturação, concluindo que as características de pasta mole deste queijo podem ser explicadas pelas alterações na matriz proteica, tais como a quebra das suas ligações, que ocorrem durante a proteólise, e da dissociação das sub-micelas, causada pela diminuição do pH. Estes processos ocorrem maioritariamente durante as primeiras 2 a 3 semanas de maturação deste queijo.

Vasconcelos *et al.* (1992) estudaram e caracterizaram o queijo de *Azeitão*, estabelecendo as bases para que este fosse considerado um queijo DOP. A proteólise neste queijo é caracterizada por uma degradação gradual da fração de azoto solúvel.

Grappin *et al.* (1999) compararam a proteólise entre queijos Suíços, em que os resultados demonstraram que o queijo *Emmental* apresenta uma maior proporção de degradação das caseínas, seguido pelo queijo *Comté* e pelo *Beauford*, apesar de um valor mais elevado de γ -caseínas e de α_{s1} -caseínas ter sido encontrado no queijo *Emmental*.

2.4.1.3. Efeito do agente coagulante na proteólise dos queijos

Vários estudos têm sido efetuados com o objetivo de avaliar a influência do agente coagulante no processo de fabrico dos queijos ao longo da maturação, essencialmente em queijos de ovelha, por investigadores Espanhóis e Portugueses, (Galán, Cabezas, & Fernández-salguero, 2012; Galán *et al.*, 2008; Prados *et al.*, 2007; Sousa & Malcata, 2002), nomeadamente no que se refere ao uso de diferentes tipos e quantidades de agente coagulante. O extrato aquoso, obtido a partir da planta *Cynara cardunculus* L., desempenha um papel fundamental no desenvolvimento de especificidades tecnológicas, tais como as características de textura em queijos de ovelha (Delgado *et al.*, 2010; Galán *et al.*, 2012).

As enzimas residuais, do agente coagulante utilizado, que ficam no queijo depois do processo de coagulação revelam uma ação proteolítica nas caseínas, sendo responsáveis pela

evolução da proteólise durante o processo de maturação dos queijos (Roa et al., 1999). De uma forma geral, o tipo e a quantidade de agente coagulante utilizado vai afetar a extensão e a profundidade da proteólise, mas em qualquer das situações espera-se um aumento das frações solúveis ao longo da maturação, assim como uma alteração da concentração da α_s - e da β -caseína, que, conseqüentemente, vão influenciar as concentrações das γ - e das pré- α_s -caseínas. Estas concentrações vão ter conseqüências na textura e nas características olfato-gustativas do queijo.

Embora o enfoque do estado da arte, relativamente à ação do agente coagulante, se centre de acordo com o objetivo da dissertação, nomeadamente a ação nas frações de caseína, certos parâmetros, como a humidade e as frações azotadas solúveis, são muitas vezes utilizados para discriminar o fator agente coagulante. Considerando a importância determinante da proteólise nas características do produto, é comum avaliar o seu grau através do coeficiente de maturação (WSN/TN), no qual avaliamos globalmente a proporção da fração azotada solúvel (WSN) em relação ao azoto total (TN). A fração insolúvel em água é constituída pelas caseínas intactas ou pouco degradadas, ficando em solução péptidos de peso molecular elevado, péptidos de pequena dimensão e aminoácidos. A fração azotada solúvel representa a maior parte das frações não visíveis em eletroforese.

A adição de TCA, até uma concentração final de 12% (TCA-12%), a esta fração solúvel precipita novos péptidos, deixando em solução aminoácidos e péptidos de peso molecular pequeno (TCA-WSN). Uma vez que o agente coagulante é normalmente reconhecido como tendo capacidade para produzir grandes péptidos solúveis a pH 4,6, a partir da caseína, mas tem capacidade limitada para fazer a quebra da caseína para além dos polipeptídeos (Desmazeaud e Gripon, 1977 citado por Pinheiro, 2002), a fração de azoto solúvel em TCA-12% vai avaliar a ação das bactérias de arranque, das bactérias lácticas ou de outras enzimas é a responsável pela produção de pequenos péptidos e aminoácidos livres, sendo assim usado como índice de maturação (Furtado e Partridge, 1988 citado por Sousa e Malcata, 1998).

Assim, começando pelo queijo *La Serena*, resultados citados por Nuñez *et al.* (1991), mostraram que os teores de humidade (usados como indicadores da proteólise) registados no interior do queijo e na sua superfície foram mais baixos no queijo feito com agente coagulante vegetal, quando comparado com o queijo feito com agente coagulante animal, mas contrariamente os valores de pH foram mais elevados. O valor mais baixo de pH nos queijos feitos com agente coagulante animal pode ser devido a estes queijos reterem mais soro, logo existe mais lactose que é útil para a fermentação microbiana e, conseqüentemente, o declínio

do pH é maior nestes queijos tanto no interior como à superfície. À superfície dos queijos, o nível mais baixo de humidade e o teor mais elevado de sal (NaCl), nos queijos de agente coagulante vegetal, favorecem uma maior taxa de decréscimo dos microrganismos ao longo da fase de maturação, pois o valor do pH mantém-se relativamente elevado (entre 5,9 e 6,1). Acentua-se este decréscimo nas últimas fases de maturação, onde se pensa que o fator humidade e sal têm mais influência. Todavia não se verificou uma diferença significativa no teor de NaCl no interior, ou à superfície, do queijo nos dois tipos de queijo.

Ensaaios com vários tipos de agentes coagulantes foram também realizados com outros queijos, que não de ovelha, verificando-se resultados interessantes. Assim, Johnston *et al.* (1994) explicou as diferenças no nível de proteólise entre queijos *Cheddar* fabricados com coalho de vitelo ou com coagulante de origem microbiana (*rennilase 46L*) em duas épocas de fabrico (no início da época de fabrico - setembro e meio da época de fabrico - novembro), através dos valores de humidade e pH dos queijos. O teor de azoto solúvel em TCA-12%, expresso em percentagem do azoto total (TCA/TN), foi semelhante para todos os queijos e aumentou ligeiramente ao longo do período de maturação. Por sua vez o WSN a pH 4,6, expresso em percentagem do azoto total (WSN/TN), aumentou acentuadamente em todos os queijos, menos nos queijos que tinham menor teor de humidade e que tinham um valor mais elevado de pH.

Embora segundo Visser (1977), citado por Pinheiro (2002), os componentes de WSN nos queijos sejam maioritariamente produzidos pelas bactérias de arranque ou pela plasmina, estes autores concluíram que os valores elevados de WSN/TN são devidos apenas à ação do *Cynara cardunculus* L.

Também a concentração de NaCl é de grande importância na maturação do queijo devido à sua influencia na atividade proteolítica das enzimas, na especificidade do agente coagulante (Mulvihill e Fox, 1980 citado por Pinheiro, 2002) e no crescimento e atividade das bactérias lácticas (Fontecha *et al.*, 1994 citado por Pinheiro, 2002). O valor mais elevado de azoto solúvel, nos queijos com um teor de sal mais baixo, pode ser atribuído à atividade dos microrganismos sob um ambiente mais favorável (Schroeder *et al.*, 1988 citado por Freitas e Malcata, 1996). Também Lawrence *et al.* (1987), citado por Veiros (2005) mostra uma relação entre o teor de sal, o teor de humidade e o agente coagulante utilizado e a degradação das caseínas, afirmando que a β -caseína sofre muito pouca proteólise pela ação da quimosina, especialmente devido ao conteúdo em sal, uma vez que este afeta a conformação da proteína.

A agregação da β -caseína, induzida pelo sal, com a consequente inacessibilidade das ligações sensíveis à quimosina, aumenta quando a razão sal/humidade aumenta.

O efeito do extrato aquoso de *Cynara cardunculus* L. foi estudado no queijo de Évora (C. Pinheiro, Banks, & Brechany, 1998) avaliando-se a composição e os índices de proteólise dos queijos com 30 e 60 dias de cura, comparativamente com agente coagulante animal. Entre os agentes coagulantes não se verificaram diferenças significativas, à exceção das relações entre as frações azotadas solúveis e o azoto total (WSN/TN e TCA/TN). A superioridade verificada nos índices de proteólise dos queijos fabricados com agente coagulante animal pode estar associada ao maior teor em humidade, à menor relação sal/humidade e ao valor superior de pH verificados nestes queijos. Pinheiro *et al.*, (1998) afirma que se pode pensar que o baixo teor de humidade destes queijos e o elevado teor de sal exercem uma ação inibitória da atividade proteolítica da enzima de origem vegetal.

A superioridade nos índices de proteólise nos queijos fabricados com agente coagulante animal, foi igualmente constatada por Vieira de Sá e Barbosa (1970, 1972) nos queijos *Roquefort*, *Edam* e *Serra da Estrela*, nas últimas fases de cura. Do mesmo modo Sousa e Malcata (1997) no queijo *Serra da Estrela* concluíram que o agente coagulante animal provocou uma maior atividade proteolítica expressa pela relação TCA/TN. A superioridade deste índice foi também verificada por Freitas *et al.* (1996) no queijo *Picante* fabricado com agente coagulante animal.

Relativamente à avaliação da proteólise no Queijo de Évora, fabricado com agente coagulante vegetal e animal, Pinheiro (2002) concluiu que ocorreu maior variação entre perfis peptídicos de acordo com o agente coagulante, no entanto, estas variações não são muito evidentes entre os queijos de 30 e 60 dias. Os resultados indicam ainda que o perfil de aminoácidos dos queijos fabricados com agente coagulante animal ou vegetal diferem, mas o efeito é mais pronunciado nos queijos com menor tempo de maturação. Durante o processo de cura verificou-se um aumento da concentração dos aminoácidos, mais pronunciado nos queijos fabricados com agente coagulante vegetal. Esta variação está de acordo com a variação verificada no índice de proteólise TCA/TN e associada aos teores de humidade.

O efeito do extrato aquoso de *Cynara cardunculus* L. também foi estudado no queijo de Évora, mostrando-se mais evidente ao nível dos metabolitos secundários, tais como os aminoácidos, os ácidos gordos voláteis (AGV) e os produtos do catabolismo dos aminoácidos, que vão ter consequências nas características sensoriais dos queijos. Durante a maturação a concentração total de ácidos gordos aumentou, expressando uma progressiva lipólise dos 30 para os 60 dias de cura. De acordo com o perfil em ácidos gordos os queijos de 30 dias são

diferenciados dos de 60 dias de cura pela superioridade na concentração de ácidos decenóico, undecanóico, nonanóico e decanóico enquanto que os ácidos 2-metilpropanóico, 2-metilbutanóico, hexadecanóico, x-metiltetradecanóico, hexadecenóico e tetradecanóico contribuem para a separação do agente coagulante.

As variações da degradação das caseínas, assim como a variação das frações azotadas têm sido particularmente estudadas por alguns autores, em queijos de ovelha e cabra, como vão ser apresentados de seguida.

Nuñez *et al.*, (1991), apresentou no queijo *La Serena* uma hidrólise mais rápida da α_s e da β -caseína nos queijos fabricados com agente coagulante vegetal, resultados estes que estão de acordo com os obtidos, por Macedo *et al.* (1993), que comparou o agente coagulante vegetal com agentes coagulantes animal e microbianos. Para além disso também mostrou que as proteases de *Cynara cardunculus* L. produzem os mesmos fragmentos macro péptidos da κ -caseína que a quimosina do agente coagulante animal.

A mesma tendência foi observada por Freitas e Malcata (1996) no queijo *Picante da Beira Baixa* concluindo que os queijos, tanto com o uso de agente coagulante animal como com de vegetal, apresentam uma degradação mais extensiva da α_s -caseína. A β -caseína apresenta uma maior resistência à atividade enzimática do agente coagulante. Os autores afirmam que a degradação das α_s e β -caseínas foi maior nos queijos em que foi utilizado o agente coagulante animal, diferença essa mais significativa a partir dos 120 dias de maturação. Constataram ainda que as *pré- α_s* -caseínas produzidas pelo agente coagulante vegetal apresentam uma menor mobilidade eletroforética do que as produzidas pelo agente coagulante animal. A presença destes péptidos diminuiu do dia 30 ao dia 120 de maturação. Nos queijos em que se usou agente coagulante animal, observaram ainda uma maior formação de γ -caseínas.

A degradação das caseínas e o produto da sua hidrólise foi estudada, por Fernández-Salguero e Sanjuán (1999), no queijo *Los Pedroches*, pelo método ureia-PAGE. Os resultados demonstraram um decréscimo da proporção relativa das α_s -caseínas durante o tempo de maturação tanto nos queijos produzidos com agente coagulante animal como com agente coagulante vegetal, mostrando ser superior nos queijos fabricados com agente coagulante vegetal, sendo que o seu decréscimo também mais rápido ao longo do processo de maturação. Estas amostras apresentaram uma quantidade residual das α_s -caseínas inferior quando comparadas com as amostras produzidas com o agente coagulante animal, tendo em conta os valores médios obtidos dos três últimos dias de cura, no entanto estas diferenças não são estatisticamente significativas.

Verificou-se também que a proporção entre a α_s - e a β -caseína diminuiu de uma relação de quase igualdade para aproximadamente 0,5 no final do tempo de maturação. Quanto às bandas da β -caseína estas apresentaram uma ligeira diminuição da sua proporção durante a maturação dos queijos, no entanto, a quantidade residual apresentada apresentou ser superior nos queijos produzidos com agente coagulante animal. Ainda quanto ao resultado da degradação das α_s -caseínas, o valor destas caseínas aumenta com a maturação, existindo diferenças nos últimos dias de maturação entre as amostras fabricadas com agente coagulante vegetal do que nos queijos fabricados com agente coagulante animal. Os níveis de expressão das γ -caseínas, compostos resultantes da ação proteolítica dos agentes coagulante animal ou vegetal sobre β -caseínas, aumentou do início para o final do processo de maturação, não apresentando diferenças entre os dois tipos de agentes coagulantes (Fernández-Salguero & Sanjuán, 1999).

Em 2001, Veloso observou que os perfis de caseínas, obtidos por eletroforese, mostram que a banda das α_{s1} -caseínas é muito visível ao longo da maturação, apesar da sua degradação. A partir dos 15 dias, o autor observou o aparecimento de novas bandas com maior velocidade de migração que esta banda. Um comportamento diferente pode ser observado na banda nativa da β -caseína, que praticamente não sofre modificação, embora seja possível visualizar-se uma intensificação das bandas das γ -caseínas.

O Queijo de Serpa foi estudado por Roseiro *et al.* (2003), que compararam o efeito da substituição do agente coagulante vegetal pelo animal ou pelo microbiano. A fração solúvel a um pH 4,4, foi significativamente superior nos queijos fabricados com *Cynara cardunculus* L., enquanto o TCA/SN e PTA/SN foram significativamente superiores nos queijos feitos com agente coagulante animal ou microbiano. No entanto, aos 60 dias de maturação, não foram observadas diferenças significativas. A proteólise das α_s -caseínas mostrou ser mais rápida do que a das β -caseínas, o que mais uma vez vem de acordo com os resultados já apresentados previamente. Este queijo apresentou uma degradação total das α_s -caseínas no fim da maturação, apresentando a β -caseína uma proteólise inferior, mas demonstrou uma degradação mais rápida até aos 30 dias de maturação, a partir daqui os seus níveis permaneceram praticamente constantes. Os resultados obtidos por eletroforese capilar, para este queijo, mostraram um pico que permaneceu durante toda a maturação e que não foi detetado para outros tipos de queijos. Este pico pensa-se derivar da β -caseína e permite a identificação do tipo de agente coagulante utilizado no fabrico de queijos.

O estudo efetuado por O'Mahony *et al.* (2003) testou diferentes quantidades de agente coagulante (100% *C. cardundulus*; 50% *C. cardundulus*/ 50% quimosina; 25% *C. cardundulus*/ 75% quimosina; 100% quimosina), utilizando o método de ureia-PAGE para o estudo da degradação das caseínas no queijo *Cheddar*.

Os resultados obtidos foram ao encontro dos obtidos por Galán *et al.* (2008), uma vez que estes autores também testaram diferentes quantidades de agente coagulante vegetal (quantidade normal e o dobro), e observaram uma maior degradação das α_5 -caseínas em relação à β -caseína, em todos os tipos de queijos testados, apresentando um nível de degradação das α_5 -caseínas superior nos queijos em que o agente coagulante continha *C. cardunculus*. Estes autores também concluíram que após 2 dias do início da maturação foram encontradas diferenças significativas ($p < 0,05$) na hidrólise das caseínas do queijo (medidas em SN e azoto não proteico (NPN)) nos queijos em que se utilizou o dobro de agente coagulante em relação aos queijos em que foi utilizada a quantidade normal e nos queijos em que se utilizou agente coagulante animal. Foram encontradas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os valores de SN nos queijos fabricados com os dois tipos de agentes coagulantes. Os níveis elevados de SN que foram observados no início da maturação foram causados pela intensa atividade proteolítica das enzimas encontradas no agente coagulante vegetal. Observaram ainda que, quanto à intensidade do queijo, esta foi superior nos queijos fabricados com agente coagulante vegetal do que com agente coagulante animal, exceto aos 180 dias de maturação. De uma forma geral, os queijos fabricados com o dobro de agente coagulante vegetal apresentaram maiores valores de acidez e de picante do que os queijos fabricados com agente coagulante animal.

Nos queijos de cabra, *Murcia al Vino*, Tejada *et al.*, (2008) verificaram uma atividade proteolítica intensa durante o processo de maturação, particularmente durante os primeiros 30 dias. Foram usados dois tipos de coagulante, o vegetal e o animal, sendo que ambos afetaram significativamente a concentração de α_5 -caseína e de β -caseína, e conseqüentemente a concentração do produto da sua degradação, as γ -caseínas e as pré- α_5 -caseínas. De salientar que a estrutura primária das κ -caseínas, β -caseínas e α_{s1} -caseínas ovina e caprina, é muito parecida, pelo que se podem ter em conta as semelhanças na eletroforese. Verificou-se que aos 15 dias de maturação os níveis de α_5 -caseínas e de β -caseínas apresentados foram significativamente inferiores nos queijos produzidos com o coagulante de origem vegetal.

Nestes queijos, a degradação da α_5 -caseína, durante a maturação, foi mais intensa do que nos queijos produzidos com o coagulante de origem animal, no entanto a degradação da β -caseína foi muito semelhante nos dois casos. Em conseqüência os queijos fabricados com

coagulante vegetal apresentaram uma concentração de *pré- α_s* -caseína superior do que os queijos cujo fabrico foi feito com coagulante animal, no entanto a concentração de γ -caseína apresentada foi significativamente superior ($p < 0,05$) nos queijos fabricados com agente coagulante animal, provavelmente porque a ação das enzimas, presentes no agente coagulante vegetal, hidrolisa esta fração de caseínas ou porque inibe a ação das plasminas (Tejada et al., 2008). Assim, como conclusão os autores podem dizer que, nos queijos em que foi utilizado o agente coagulante vegetal, foi observada uma maior proteólise das caseínas, em especial da α -caseína, sendo que nestes queijos se observou um teor inferior de γ -caseínas.

Conclusões semelhantes foram tiradas por Pino *et al.*, (2009), que estudou a proteólise primária em queijos de cabra fabricados com agente coagulante animal e com agente coagulante vegetal em pó, pelo método eletroforético de ureia-PAGE. Os autores não observaram diferenças significativas na percentagem das β -caseínas do dia 2 em diante, permanecendo os seus níveis praticamente constantes durante os 120 dias de maturação. Já os níveis de α_s -caseínas desceram entre o dia 2 e o dia 15, para os dois tipos de coagulantes, ou seja, houve uma degradação desta fração. Esta descida foi ligeiramente mais marcada nos queijos fabricados com o coagulante vegetal. Um aumento na intensidade das bandas de γ -caseínas foi observado nos dois lotes de queijos, durante todo processo. Concluíram que existem diferenças entre os queijos produzidos com agente coagulante vegetal e os queijos produzidos com agente coagulante animal. Os queijos fabricados com agente coagulante vegetal exibem uma maior extensão na quebra das α_s -caseínas, no entanto, foi observado, nos queijos fabricados com o agente coagulante animal, um aumento da intensidade das bandas das γ -caseínas. Pelo que se pode concluir que neste caso, o uso do agente coagulante proveniente de *C. cardunculus*, conduz a uma atividade proteolítica superior, nos primeiros estágios da maturação (Pino *et al.*, 2009).

Mais tarde, em 2012, Gálan *et al.* testaram três tipos de agentes coagulantes (100% *Cynara cardunculus* L., agente coagulante animal ou uma mistura na proporção de 50:50). Na maioria dos parâmetros químicos e microbiológicos não foram observadas diferenças entre os agentes coagulantes utilizados, no entanto foi observada uma proteólise mais elevada nos queijos fabricados com agente coagulante vegetal e nos queijos fabricados com mistura, quando comparados com os queijos fabricados com agente coagulante animal. Ambos os tipos de queijos adquiriram as características sensoriais típicas mais rapidamente do que os queijos fabricados com agente coagulante animal.

A ter em conta a bibliografia consultada e os estudos já realizados, como apresentado anteriormente, este trabalho pretende analisar a influência de três diferentes ecótipos de *C. cardunculus*, e de um agente animal, como controlo, na degradação das frações das caseínas do Queijo de Évora, ao longo do processo de maturação, utilizando a metodologia de eletroforese em gel de poliacrilamida com ureia (ureia-PAGE).

3. Materiais e Métodos

3.1. Locais e Laboratórios

O ensaio de fabrico do queijo teve lugar numa queijaria da área geográfica delimitada de produção do queijo de Évora, nomeadamente a queijaria Cachopas, Canaviais, Évora (Queijaria Cachopas, 2017).

As amostras recolhidas foram analisadas no Laboratório de Lacticínios e Reologia Alimentar do Instituto Politécnico de Beja, Escola Superior Agrária e no Laboratório de Tecnologia e Qualidade dos Produtos Regionais do Instituto Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas (ICAAM)/ Universidade de Évora.

3.2. Preparação do extrato aquoso de *Cynara cardunculus* L.

Previamente à realização do ensaio definitivo, foi necessário testar diversas quantidades dos agentes coagulantes a utilizar, de forma a determinar a quantidade ser adequada, de acordo com os critérios da responsável pelo fabrico na Queijaria Cachopas.

Três ecótipos de *Cynara cardunculus* L. (Tabela 2) foram recolhidos nos campos assinalados (Anexo I), as flores foram secas e conservadas em sacos individuais no LTQPR, mantendo-se num lugar seco, à temperatura ambiente até à sua utilização. A escolha destes três ecótipos foi feita, no âmbito do projeto no qual este trabalho se insere, tendo como base resultados preliminares relativos à atividade coagulante e ao perfil de cardosinas apresentado.

Tabela 2 Identificação dos três ecótipos de *Cynara cardunculus* L. escolhidos, com a respetiva descrição, localização e código de laboratório

Referência da População	Descrição e Localização	Código de laboratório
9-HA	Herdade da Abóbada, Serpa	Cynara 1
12-HP	Herdade do Peral, Monte do Trigo	Cynara 2
13-HR	Herdade da Revilheira, Reguengos	Cynara 3

O extrato aquoso de *Cynara cardunculus* L. foi obtido a partir de 18g de flores de cada ecótipo. Estas foram primeiramente demolhadas, no dia anterior ao fabrico, posteriormente trituradas (*Bimby* TM31) e filtradas por dois panos de algodão, como se encontra representado na Figura 8. De modo a promover a coagulação do leite, o extrato foi adicionado ao leite.



Figura 8 Preparação do extrato aquoso, desde a sua recolha (a) e conservação (b) à trituração dos pistilos demolidos (c) e a sua posterior filtração (d).

3.3. Fabrico do queijo, preparação e recolha das amostras

Foram fabricados 1530 queijos, resultantes do ensaio de testagem dos três diferentes ecótipos de *Cynara cardunculus* e do agente coagulante animal, como agentes coagulantes do Queijo de Évora.

O ensaio iniciou-se dia 28 de março, com a laboração dos queijos, de acordo com o método de fabrico tradicional do Queijo de Évora, e praticado na Queijaria Cachopa. Os três ecótipos de *Cynara cardunculus* L. foram testados, utilizando-se um agente coagulante animal (*Enzilab* - 80% quimosina e 20% pepsina) como controlo, sendo que foram efetuados quatro tratamentos, com uma réplica por cada um.

Assim, no total, foram laboradas oito cubas, cada contendo 100 L de leite cru de ovelha filtrado e aquecido a uma temperatura de 31 °C, ao qual foram adicionados 1352 gramas de sal e o extrato aquoso de *Cynara cardunculus* L. (a seis cubas) e o agente coagulante animal (a duas cubas).

Foi registado o tempo de início da coagulação (início da gelificação) e registado o fim da coagulação (de acordo com o critério utilizado na queijaria) utilizando um recipiente de plástico preto, como se pode observar na Figura 9.

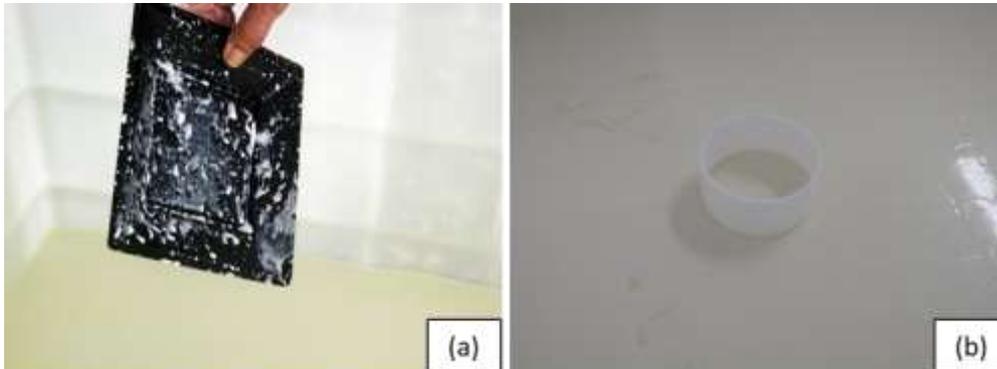


Figura 9 Apresentação das metodologias de deteção do início (a) e do fim (b) da coagulação

Após o fim da coagulação (Figura 10) o coagulo, ou coalhada, foi cortado com uma pá e a massa escorrida em panos, sendo o enchimento efetuado em multimoldes de 7 cm por 13 cm e adicionado à superfície sal (em muito pequena quantidade). Os queijos foram para uma câmara de refrigeração a 8°C, até perfazerem 24 horas.

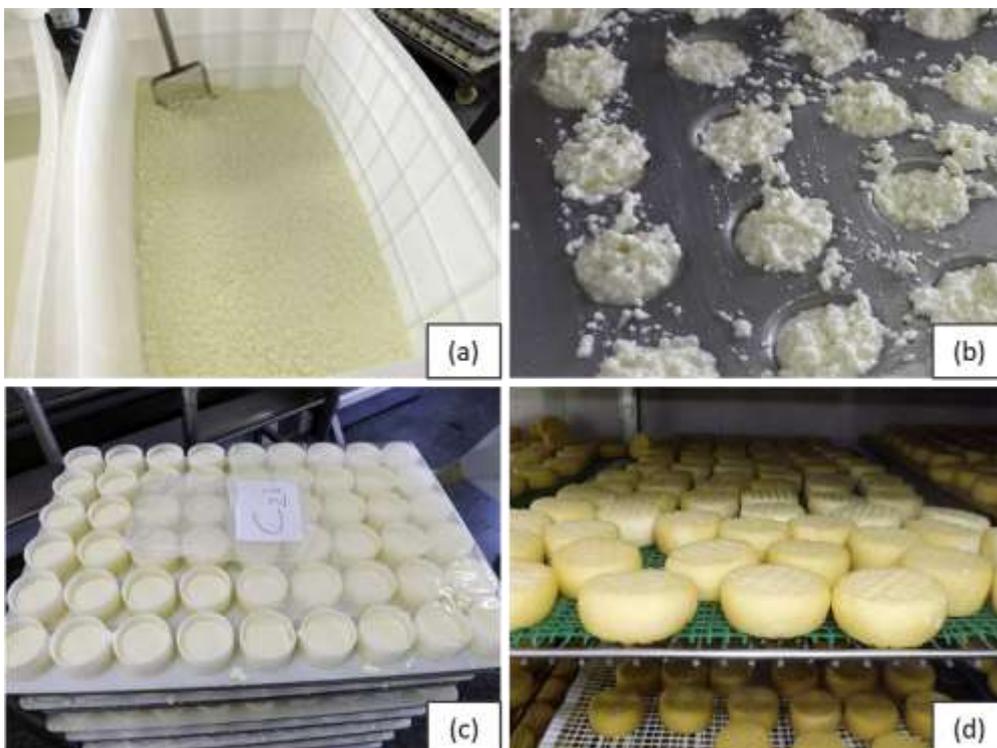


Figura 10 Procedimentos após a fim da coagulação, nomeadamente o corte da coalhada (a) e o posterior enchimento em multimoldes (b). Refrigeração dos queijos, durante 24 horas ainda nos multimoldes (c) e condições de refrigeração nos restantes dias de maturação (d).

Foram retirados os multimoldes e posteriormente passaram para outra câmara a 7°C e com humidade de 90 - 92%, até às 72 horas de maturação. Após os três dias de cura passaram para outra câmara, que está a 8 – 9 °C e a uma humidade relativa de 85%. Ficam nesta câmara cerca de três a quatro dias, até começarem a amarelar. Passam depois para outra câmara a 10°C e com 76% de humidade relativa, ficando nesta câmara até aos 14 dias de maturação. Aos 14 dias passaram então para a última câmara de refrigeração que apresenta uma temperatura superior de 14-14,5°C e uma humidade relativa mais baixa de cerca de 67%. Para uma melhor compreensão, o processo e as câmaras de refrigeração encontram-se descritos na Tabela 3.

Tabela 3 Condições de temperatura e humidade relativa das câmaras de refrigeração necessárias para a maturação dos queijos

Câmara de Refrigeração	1	2	3	4	5
Tempo de permanência na câmara (dias)	0 – 1	1 – 3	3 – 7	7 – 14	14 - 63
Temperatura (°C)	8	7	8-9	10	14 - 14,5
Humidade relativa (%)		90 - 92	85	76	67

Considerando o numero elevado de amostras, o tamanho dos queijos e as quantidades necessárias para a realização das análises totais (análises físicas, químicas e bioquímicas e sensoriais), por agente coagulante utilizado, amostraram-se aleatoriamente 10 queijos de cada dia (1, 2, 7, 14, 21, 28, 35, 49, 63, 91 dias de maturação), os quais foram divididos em dois sub-grupos (pools), cada um com 5 queijos.

O processo de fabrico, a amostragem descrita e a análise laboratorial por cada dia de maturação, encontra-se representado na Figura 11.

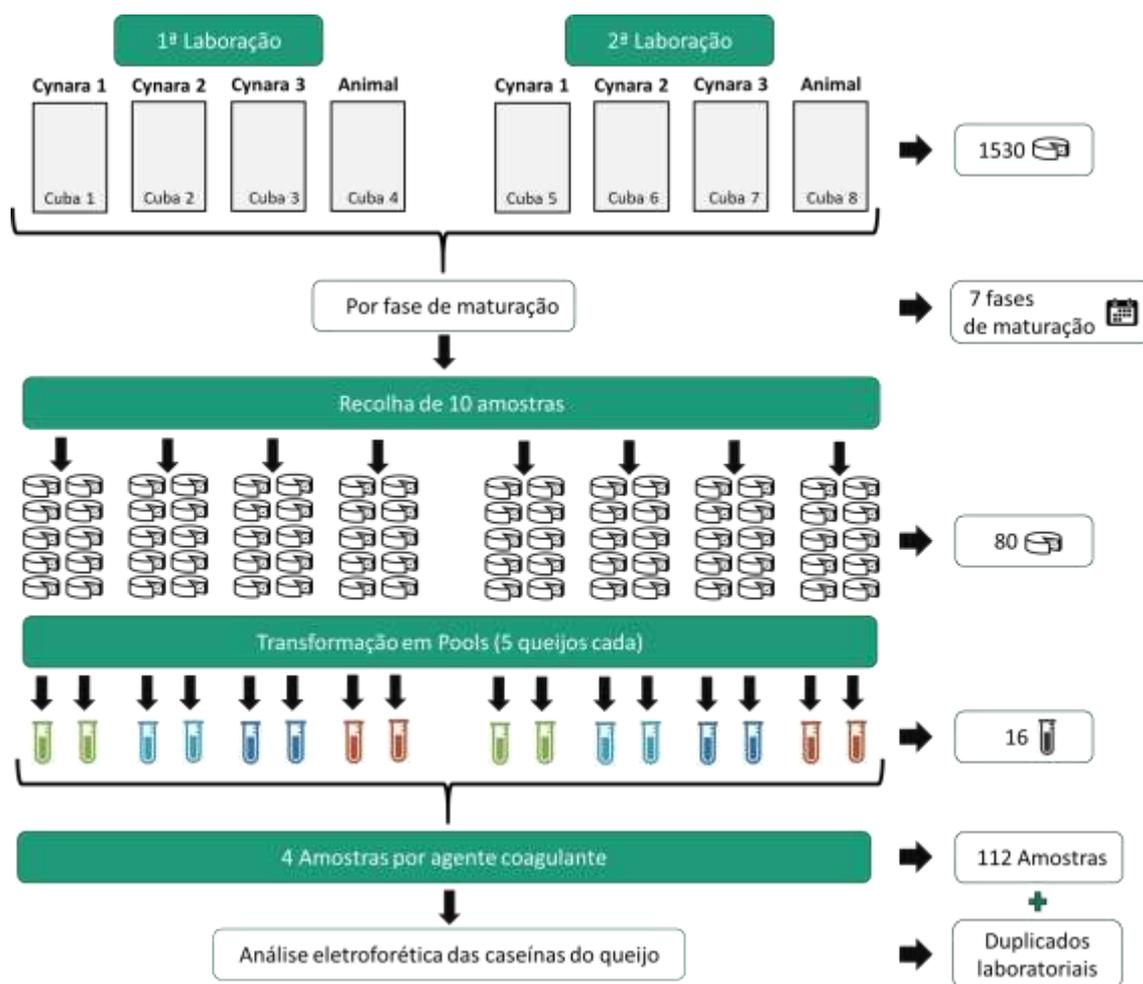


Figura 11 Esquema representativo do fabrico, amostragem e análise laboratorial

3.4. Análise das caseínas do queijo através de técnicas de ureia-PAGE

3.4.1. Precipitação das caseínas do queijo

As caseínas foram obtidas através de precipitação ácida com acetato de amónio, de acordo com o protocolo descrito em Ordiales *et al.* (2013) e após otimização desta técnica extrativa. Este procedimento experimental iniciou-se com a adição de 10mL da solução tampão de acetato de amónio 1M, pH 4,3 a 1g de queijo, sendo a suspensão resultante incubada a 8°C durante 20 minutos. Após esse período, procedeu-se a uma centrifugação a 6000g, 4°C durante 15 minutos, tendo sido descartado o sobrenadante. Ao precipitado resultante, foi adicionado igual volume de solução tampão de acetato de amónio 1mM, pH 4,3, seguindo-se nova centrifugação a 6000g, 4°C, durante 10 minutos. Posteriormente, removeu-se cuidadosamente, com o auxílio de uma espátula, a camada de gordura formada na parte superior, sendo o sobrenadante novamente

desprezado. Ao precipitado volta-se a adicionar 10 mL da solução tampão de acetato de amónio 1mM e foi sujeito a nova centrifugação nas mesmas condições referidas anteriormente.

Por fim, precedeu-se à lavagem do precipitado com acetona fria (90%): numa primeira fase, o precipitado é incubado com 5mL de acetona a -20°C durante 20 minutos, sendo o mesmo posteriormente centrifugado a 12500rpm, 4°C, durante 5 minutos. Este procedimento é repetido mais uma vez. Após a lavagem, o precipitado é seco à temperatura ambiente e congelado até ser utilizado.

3.4.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida com ureia

Para a realização da eletroforese UREA-PAGE (*denaturing urea polyacrylamide gel electrophoresis*) [adaptado de Andrews (1983)] foram preparados géis de 8 x 10 cm e 1 mm de espessura. O gel de resolução (10% acrilamida) consistiu numa mistura de 5mL de acrilamida/bis-acrilamida 30% (m/v), 7,3mL de tampão do gel de resolução (Tris 0,76M; ureia 9M, pH 8,9), 2,5mL de água bidestilada, 150µL de APS (persulfato de amónio) 0,1g/mL e 50µL de TEMED (Tetrametil-etilenodiamina). Esta mistura foi então colocada nas placas de vidro, sem criar bolhas, até 1 cm abaixo do topo do vidro da frente e adicionou-se água bidestilada sobre o gel de modo a evitar o contacto da mistura com o ar. A mistura ficou a polimerizar durante cerca de 15 minutos. Passado o tempo de polimerização, foi aplicado o gel de concentração (4% acrilamida), consistindo em 800µL de acrilamida/bis-acrilamida 30%, 4,7mL de Tampão do gel de concentração (Tris 0,06M; ureia 4,5M, pH 7,6), 450µL de água destilada, 40µL de APS e 10µL de TEMED. No gel de concentração é aplicado um pente (Mini-PROTEAN; 1,0 mm) levando à formação de 10 poços onde a amostra será aplicada.

Após a polimerização os géis foram colocados num sistema Protean mini (Bio-Rad). As câmaras superiores e inferiores foram cheias com tampão de elétrodo (Tris 0,02 M; glicina 0,19 M). As amostras foram misturadas na proporção de 1:2 com o tampão de amostra (Tris 0,125M; Ureia 8,2 M; EDTA 2,5 Mm; β-mercaptoetanol 0,2 M; 0,01% de azul de bromofenol, pH 6,8). Foram aquecidas num banho seco, a 95°C, durante 5 minutos e em seguida colocadas em gelo, seguindo-se a sua aplicação nos poços do gel. Em cada poço foi aplicado um volume de 2,5 µL de amostra, diluída 2x, sendo que todas as amostras foram aplicadas em igual volume.

A eletroforese desenvolveu-se inicialmente a 20 mA até atingir o gel de corrida e posteriormente a 40 mA, durante cerca de 2 horas e 30 minutos.

No final da corrida electroforética, os géis foram corados durante duas horas em solução 0,1% Coomassie Brilliant Blue R-250 em 50% (v/v) metanol e 10% (v/v) ácido acético, e descorados numa solução de 10% (v/v) ácido acético, a qual foi mudada várias vezes até as bandas serem visíveis e o fundo ficar claro.

Por fim, os géis foram digitalizados num scanner (HP ScanJet 3400C) para posterior análise das imagens, com recurso ao *software* GelAnalyser. Este software permite delimitar todas as bandas correspondentes a cada *lane*, para o cálculo do volume relativo de cada uma, para posterior comparação de amostras entre géis.

3.5. Tratamento estatístico

Os dados foram introduzidos numa base de dados Excel e posteriormente analisadas em função dos tratamentos (4 agentes coagulantes e 7 fases de cura).

A análise estatística dos resultados foi feita usando o software SPSS, versão 24, para o Windows, sendo estabelecido um intervalo de confiança de 95%.

Todas as variáveis, neste caso o volume relativo de cada banda, foram analisadas de modo a garantir os pressupostos de normalidade, independência e homocedasticidade. O pressuposto da Normalidade foi validado pelo teste de Shapiro-Wilk, e a homocedasticidade pelo teste de Levene. Se os pressupostos não eram validados, efetuava-se uma análise através de testes não paramétricos (Kruskal-Wallis).

Sempre que os pressupostos eram cumpridos, os dados eram analisados através de uma análise de variância segundo o modelo ANOVA, em função dos fatores em causa. Sempre que se verificaram diferenças significativas, utilizou-se o método de Tukey para efetuar a comparação das médias. Em todas as análises de variância, foram considerados como valores significativos aqueles cuja probabilidade de ocorrência foi superior a 95% ($p < 0,05 = \text{sig}^*$), a 99% ($p < 0,01 = \text{sig}^{**}$) e 99.9% ($p < 0,001 = \text{sig}^{***}$) e não significativos, aquela cuja probabilidade de ocorrência foi inferior a 95% ($p > 0,05 = \text{n.s.}$).

Posteriormente, foi realizada uma análise multivariada, especificamente a Análise de Componentes Principais (PCA) e ou *Factor Análises* (FA).

4. Resultados

4.1. Perfil das caseínas no Queijo de Ovelha

A proteólise primária do queijo de ovelha, foi avaliada por eletroforese das frações insolúveis em água usando Géis de Poliacrilamida com ureia (ureia-PAGE). Este método escolhido permitiu uma clara resolução das caseínas precipitadas a partir de queijos fabricados de acordo com a tecnologia de fabrico do Queijo Évora.

Na Figura 12 pode-se observar o exemplo de um perfil de caseínas (respetiva representação das bandas identificadas), obtido por ureia-PAGE representativo de queijos fabricados com agente coagulante vegetal, tendo como referência um padrão de caseína (M) assim como o perfil obtido quando se utilizava o agente coagulante animal.

Ao longo da maturação, foram identificadas doze bandas, que foram denominadas com letras maiúscula, da letra A à letra L, correspondendo a letra A à primeira a aparecer (menor mobilidade electroforética). Os queijos foram analisados com 1, 7, 14, 21, 35, 49 e 63 dias de maturação e nem todas as bandas foram observadas nestes dias de maturação (bandas ausentes ou presentes em quantidades vestigiais).

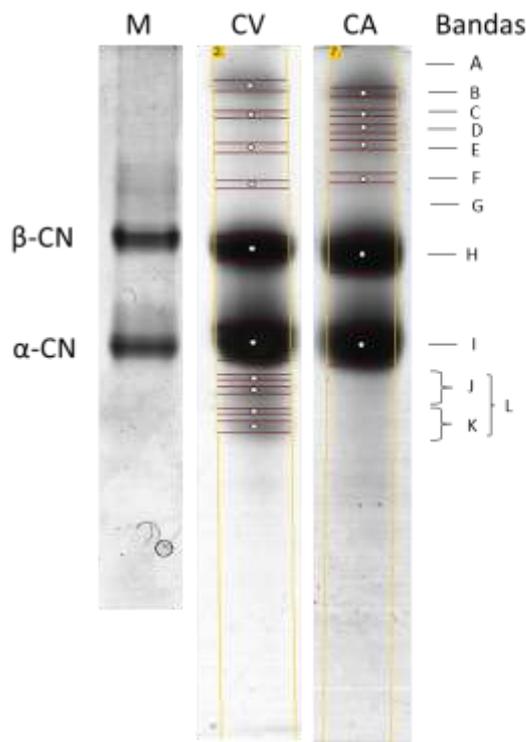


Figura 12 Perfil de caseínas por ureia-PAGE da fração insolúvel em água do queijo de ovelha, fabricado com agente coagulante vegetal (CV) e com agente coagulante animal (CA), com 1 dia de maturação; (M) marcador de caseínas de leite bovino (Sigma LifeScience); (Bandas) bandas identificadas

Em termos de perfis de caseínas, as porcentagens de volume foram quantificadas, tendo em conta a proporção do volume de cada banda em relação ao volume do total das bandas de cada amostra. O volume corresponde à intensidade * área da banda (valores em *píxel*). A diminuição percentual das referidas bandas ao longo da maturação ou entre agentes coagulantes deve interpretar-se como uma maior taxa de degradação da fração em causa, assim como o aumento ou aparecimento de outras bandas traduz o aparecimento de outras frações, normalmente resultantes da degradação.

Considerando o fator agente coagulante, foi efetuada uma análise aos resultados das bandas observadas nos queijos fabricados com os 3 ecótipos de *Cynara Cardunculus* L. (Figura 13), verificando-se que, para cada banda, não existem diferenças significativas ($p > 0,05$) entre estes três ecótipos.

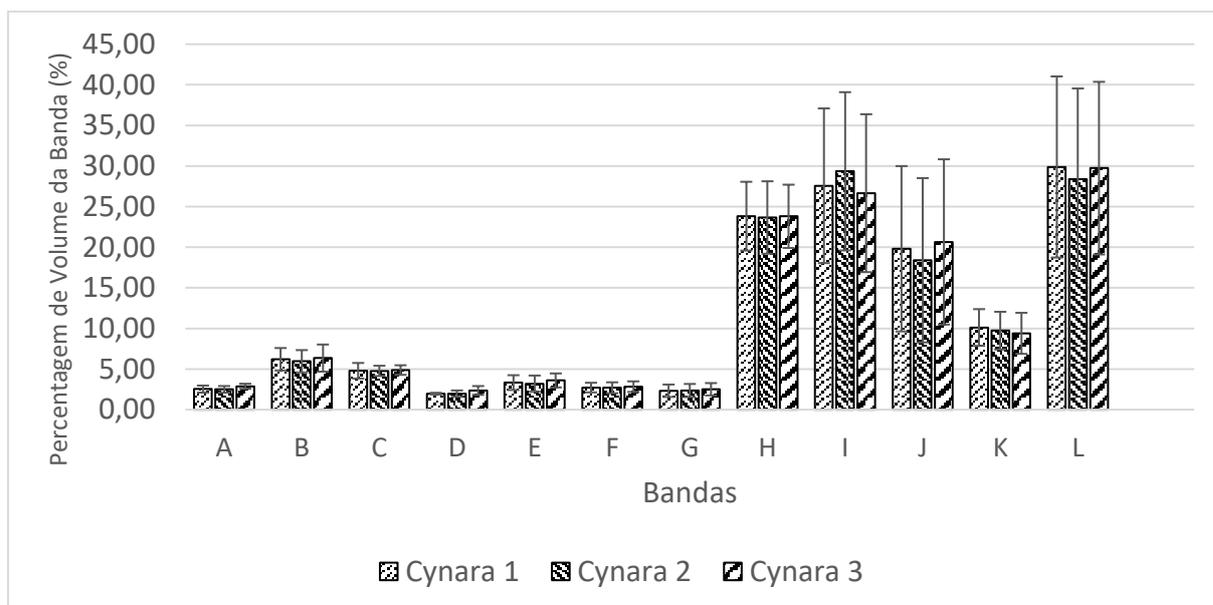


Figura 13 Volumes relativos das bandas diferencialmente expressas, observadas nos perfis de caseínas (ureia-PAGE) (média \pm desvio-padrão da média), nos queijos fabricados com os 3 ecótipos do agente coagulante vegetal, tendo em conta toda a maturação (tempo médio)

Uma vez que não foram observadas diferenças significativas para os três ecótipos de *Cynara cardunculus* L. efetuou-se uma análise aos resultados das bandas identificadas nos queijos fabricados com agente coagulante vegetal (considerando os 3 ecótipos de cardo em conjunto) comparativamente aos resultados das bandas observadas nos queijos fabricados com agente coagulante animal, como se pode observar na Figura 14.

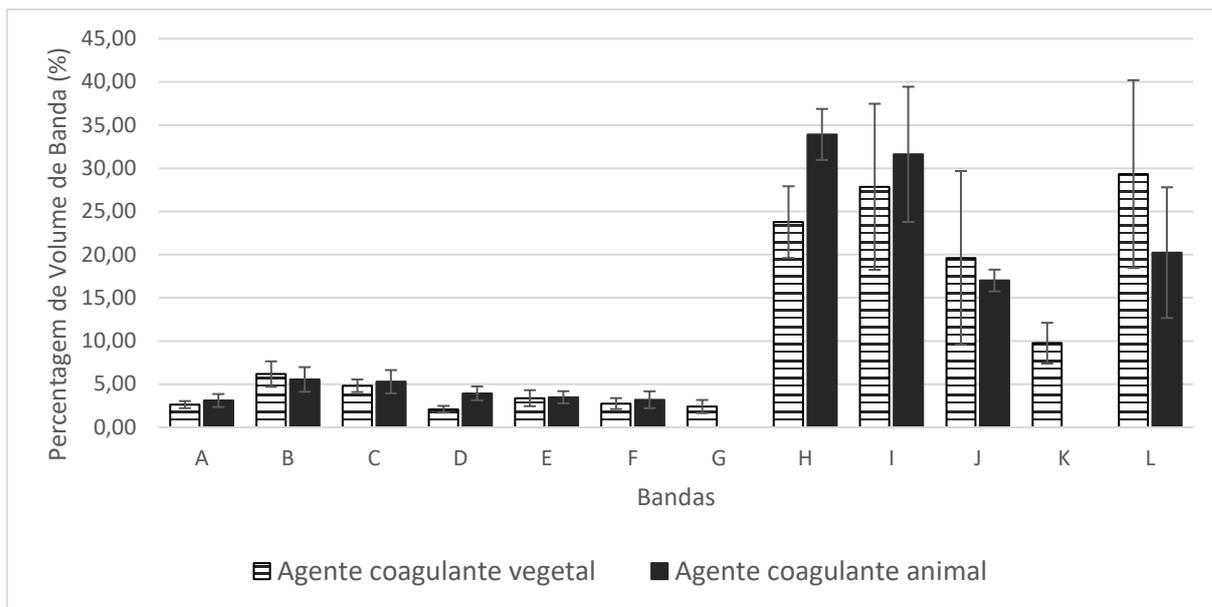


Figura 14 Volumes relativos das bandas diferencialmente expressas, observadas nos perfis proteicos (ureia-PAGE) (média \pm desvio-padrão da média), nos queijos fabricados com agente coagulante vegetal ou animal, tendo em conta toda a maturação (tempo médio)

De acordo com a análise estatística, verificam-se diferenças significativas ($p < 0,05$) nas Bandas D, H, I e L entre o agente coagulante vegetal e o agente coagulante animal. Neste caso, de acordo com a comparação de médias, a Banda D, a Banda H e a Banda I apresentam uma percentagem relativa de volume superior nos queijos fabricados com agente coagulante animal, ao longo dos dias de cura, enquanto a Banda L apresenta um valor inferior relativamente ao valor apresentado pelo agente coagulante vegetal.

Ainda se pode observar o aparecimento da Banda G e da Banda K, apenas identificadas nos queijos fabricados com agente coagulante vegetal.

Considerando que não foi possível avaliar a existência de interação, entre a variável agente coagulante e a variável tempo de maturação, os resultados dos perfis eletroforéticos são apresentados fixando os fatores de variação, apresentando no ponto 4.2. as diferenças significativas encontradas (Anexo II), para cada banda proteica.

4.2. Comparação do perfil eletroforético entre os agentes coagulantes ao longo do processo de maturação.

Na Figura 15 podemos observar os perfis eletroforéticos da fração insolúvel em água (caseínas) dos queijos fabricados com 3 ecótipos de *Cynara cardunculus* L. e com agente coagulante animal, aos 1, 7, 14, 21, 35, 49 e 63 dias de maturação.

Os resultados são apresentados tendo por base várias fontes bibliográficas (Pino et al., 2009; Tejada et al., 2008), baseada no estudo feito por Marcos et al. em 1979, apresentam e interpretam os resultados, relativos à análise da evolução do perfil eletroforético das caseínas dos queijos de acordo com o fator em estudo.

Foi possível estabelecer quatro zonas eletroforéticas, da menor para a de maior mobilidade electroforética: γ -caseínas, β -caseínas, α_s -caseínas e pré- α_s -caseínas. Desta forma a correspondência entre as bandas identificadas de A a L e as várias caseínas pode observar-se na Tabela 4.

Tabela 4 Correspondência entre as Bandas Identificadas (A-L) com as zonas eletroforéticas delimitadas por Marcos et al. (1979)

Bandas Identificadas	Bandas segundo Marcos et al., 1979
A, B, C, D, E, F, G	γ -caseínas
H	β -caseína
I	α_s -caseína
J, K, L	Pré- α_s -caseínas

Com base na Figura 15 pode observar-se uma diferença entre o perfil das caseínas dos queijos fabricados com o agente coagulante animal comparativamente ao perfil apresentado pelos queijos fabricados com agente coagulante vegetal. Entre estes últimos as diferenças nas tendências das bandas são menos evidentes, contudo através de uma análise estatística é possível observar algumas diferenças significativas ($p < 0,05$), entre alguns dias de maturação e entre agentes coagulantes.

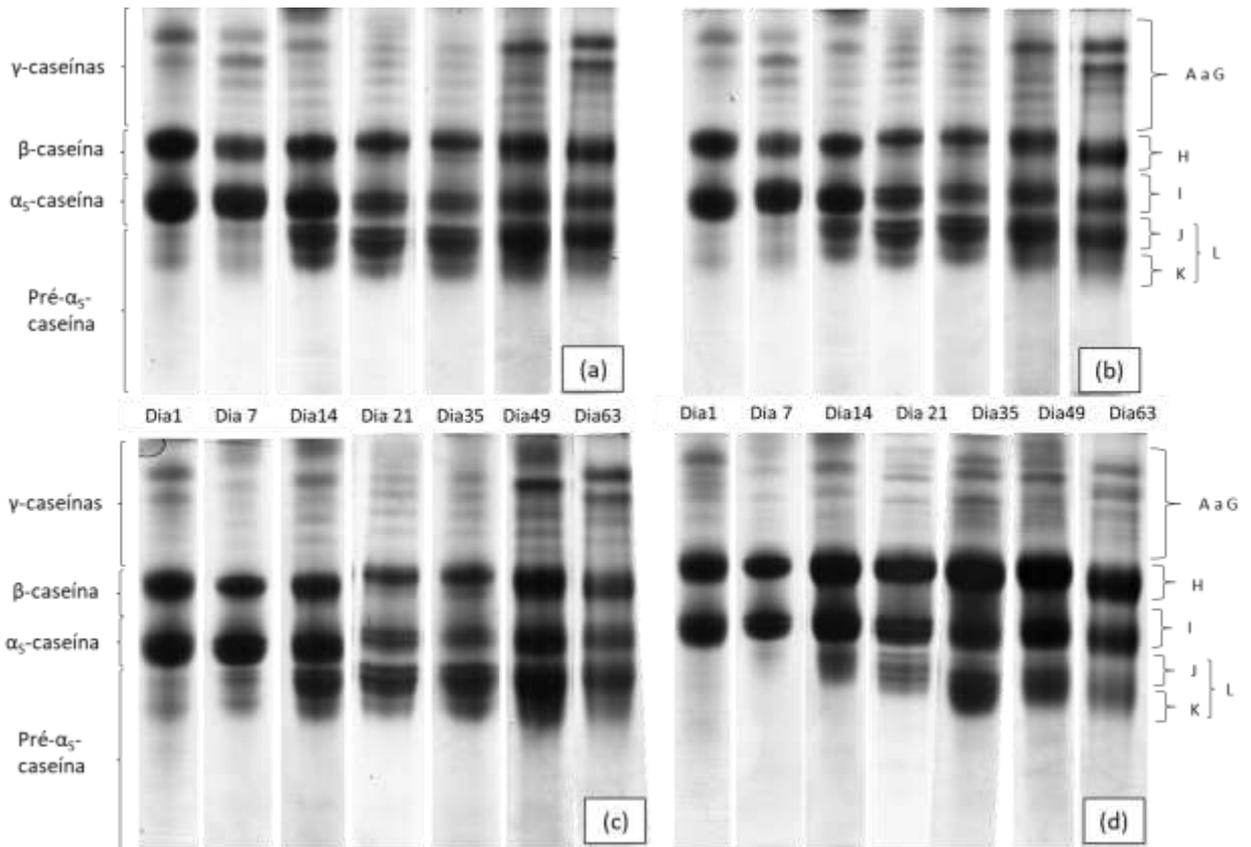


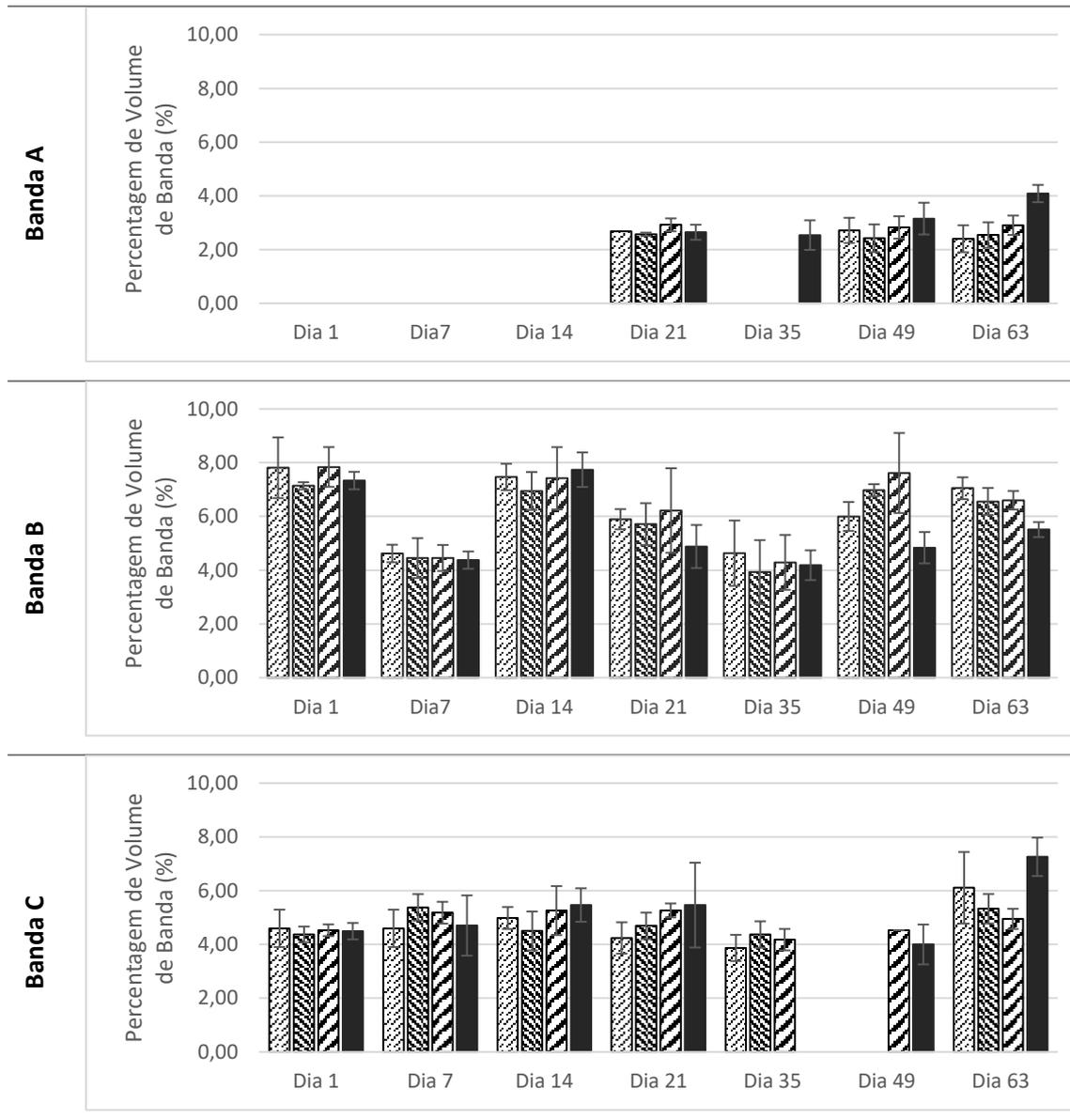
Figura 15 Perfil de caseínas obtido por ureia-PAGE dos queijos de ovelha fabricado com (a) Cynara 1; (b): Cynara 2; (c) Cynara 3; (d) agente coagulante animal, ao longo da maturação (Dia 1, Dia 7, Dia 14, Dia 21, Dia 35, Dia 49 e Dia 63)

Assim, torna-se importante, para uma melhor compreensão do comportamento evolutivo das caseínas, ao longo das fases de maturação e de acordo com o agente coagulante utilizado, a variação da percentagem de volume relativo de cada banda, de acordo com a zona delimitada (γ -, β -, α_s - e pré- α_s - caseínas) a que pertencem, ao longo dos dias de maturação (Figura 16, Figura 18, Figura 20 e Figura 22).

De realçar que alguma variabilidade existente entre a percentagem de volume de cada banda, pode derivar de pequenas imprecisões laboratoriais, tais como erros de pipetagem, pequenas diferenças quanto ao tempo da corrida eletroforética ou a diferenças na coloração dos géis.

4.2.1. γ -caseínas

Na Figura 16 encontram-se representadas todas as bandas pertencentes à zona das γ -caseínas, nomeadamente os dias em que são observadas, assim como os agentes coagulantes que apresentam níveis de expressão para estas e a sua evolução ao longo dos dias de maturação.



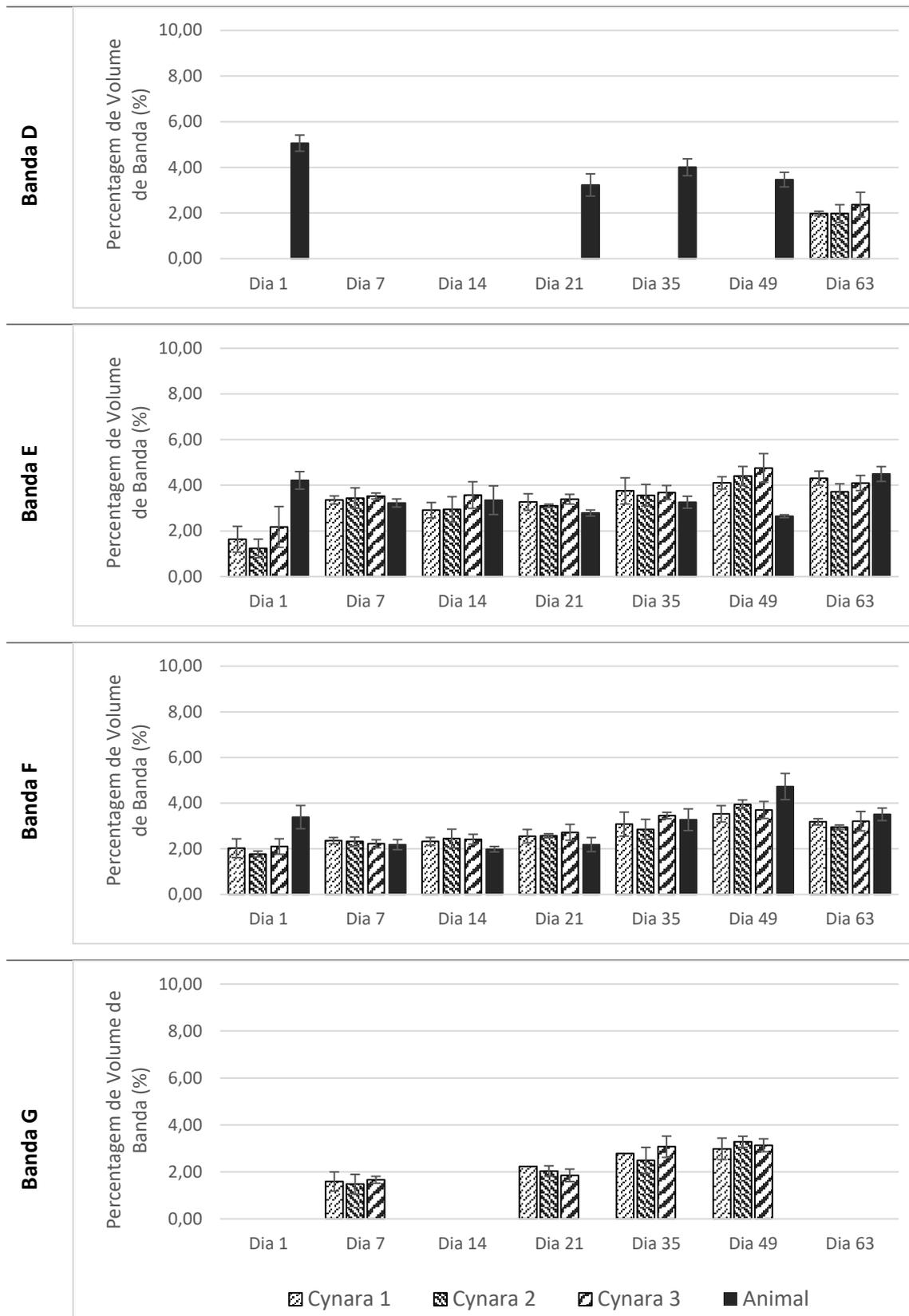


Figura 16 Volumes da Banda A à Banda G, diferencialmente expressos, observados nos perfis proteicos (ureia-PAGE) (média \pm desvio padrão da média), em queijos produzidos com os 3 ecótipos de agente coagulante vegetal (Cynara 1, Cynara 2, Cynara 3) e com agente coagulante animal (Animal), para todas as fases de maturação (Dia 1, Dia 7, Dia 14, Dia 21, Dia 35, Dia 49 e Dia 63)

Como se pode observar, apenas as Bandas B, Banda E e Banda F apresentam níveis de expressão para os quatro tipos de queijos fabricados, em todos os dias de maturação. Ou seja, os níveis de expressão destas bandas variam de acordo com o agente coagulante utilizado e com o dia de maturação em que são analisados.

A Banda B apresenta diferenças significativas ($p < 0,05$) aos 49 e aos 63 dias de maturação, entre os queijos fabricados com agente coagulante vegetal (*Cynara 3*) e os queijos fabricados com agente coagulante animal, apresentando estes um nível de expressão inferior. Da mesma forma também podemos observar que apresenta diferenças significativas ($p < 0,05$) nos seus níveis de expressão, para cada agente coagulante ao longo do processo de maturação dos queijos.

As Bandas E e Banda F exibem um comportamento semelhante. Ou seja, entre agentes coagulantes as diferenças são significativas ($p < 0,05$) aos dias 1, 21 e 63 de maturação. Esta diferença, aos 63 dias de maturação, é apresentada entre os queijos fabricados com *Cynara 2* e os queijos fabricados com agente coagulante animal, os quais apresentam um volume relativo superior.

Também é possível concluir que estas duas bandas possuem diferenças significativas ($p < 0,05$) para cada agente coagulante ao longo dos dias de maturação. Para os agentes coagulantes vegetais estas diferenças são entre o Dia 1 e o Dia 49 de maturação, ocorrendo um aumento nos níveis de expressão.

Relativamente à Banda A, esta apenas foi observada a partir dos 21 dias de maturação, aparecendo aos 35 dias apenas no agente coagulante animal. Apresenta diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os queijos fabricados com o *Cynara 1* e os queijos fabricados com agente coagulante animal, sendo maior o nível de expressão para estes últimos, aos 63 dias de maturação. Quanto à variação da percentagem de volume da banda ao longo dos dias, somente o agente coagulante animal apresenta diferenças significativas ($p < 0,05$), exprimindo um aumento.

A Banda C, apresenta um comportamento constante ao longo dos dias de maturação, apenas não apresentando níveis de expressão aos 35 dias de maturação, para os queijos fabricados com agente coagulante animal e aos 49 dias para os queijos fabricados com *Cynara 1* e com *Cynara 2*.

Os queijos com 63 dias de maturação apresentam diferenças significativas entre agentes coagulantes, nomeadamente entre os queijos fabricados com *Cynara 3* e os queijos fabricados

com Animal, apresentando os últimos um maior nível de expressão. Os queijos fabricados com os quatro agentes coagulantes apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$), na sua maioria entre os níveis de expressão dos últimos dias de maturação, onde aumentam significativamente.

A Banda D, não foi observada na maioria dos agentes coagulantes nos vários dias de cura, sendo o seu aparecimento pontual, em especial nos queijos fabricados com agente coagulante animal. Trata-se de uma banda com pouca expressão, pelo que não vai ser considerada.

A última banda pertencente às γ -caseínas, a Banda G, apenas foi observada aos 7, 21, 35 e 49 dias de maturação, para os 3 ecótipos de agente coagulante vegetal, não sendo visualizada para os queijos fabricados com agente coagulante animal. De acordo com a análise estatística não existem diferenças significativas ($p < 0,05$) nos níveis de expressão da banda entre os agentes coagulantes, mas existem diferenças no *Cynara 2* e no *Cynara 3*, ao longo dos dias. Ou seja, a fase de maturação vai influenciar os níveis de expressão desta banda.

Após a apresentação dos resultados individuais das bandas identificadas que constituem as γ -caseínas, é possível a sua análise global, ou seja, a evolução desta fração de caseínas ao longo dos dias de maturação. Pode observar-se (Figura 17) um comportamento muito semelhante entre todos os agentes coagulantes, que se traduz numa evolução gradual da percentagem relativa desta fração de caseínas, ao longo dos dias de maturação, para os três ecótipos de *Cynara cardunculus* L. Esta fração apresenta uma diferença de comportamento entre os queijos fabricados com agente coagulante animal, em relação aos queijos fabricados com agente coagulante vegetal, pois apresenta uma diminuição dos níveis de expressão entre o dia 1 e o dia 7 de maturação.

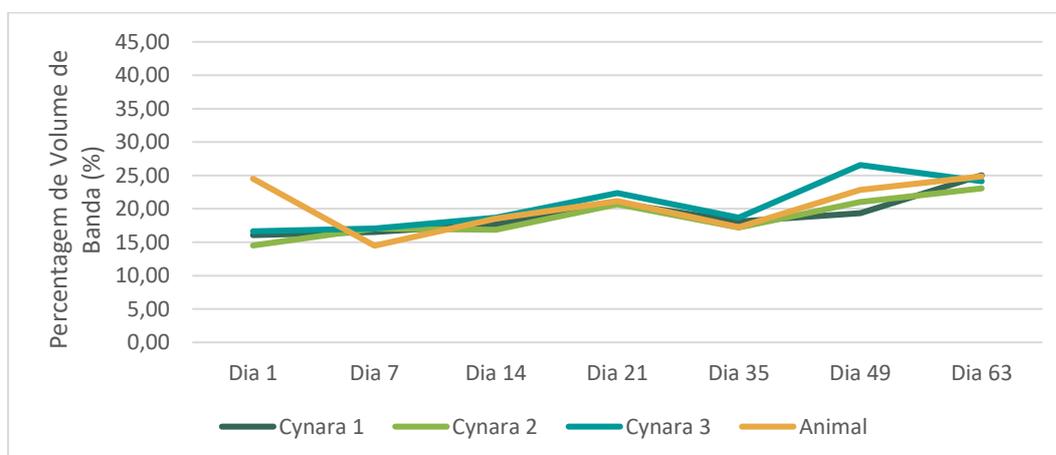


Figura 17 Evolução da percentagem relativa das γ -caseínas ao longo dos dias de maturação (Dia 1, Dia 7, Dia 14, Dia 21, Dia 35, Dia 49 e Dia 63) para os quatro agentes coagulantes utilizados (Cynara 1, Cynara 2, Cynara 3 e Animal)

4.2.2. β -caseína

A Banda H, identificada nos perfis eletroforéticos, diz respeito à β -caseína, sendo por isso uma das bandas identificadas mais importante.

Como se pode observar na Figura 18 esta banda pode ser observada para todos os agentes coagulantes, em todos os dias de maturação, apresentando diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os agentes coagulantes, no mesmo dia, e entre dias de maturação para o mesmo agente coagulante. Ou seja, os níveis de expressão desta banda são influenciados tanto pelo agente coagulante utilizado no fabrico dos queijos, como pelo dia de maturação.

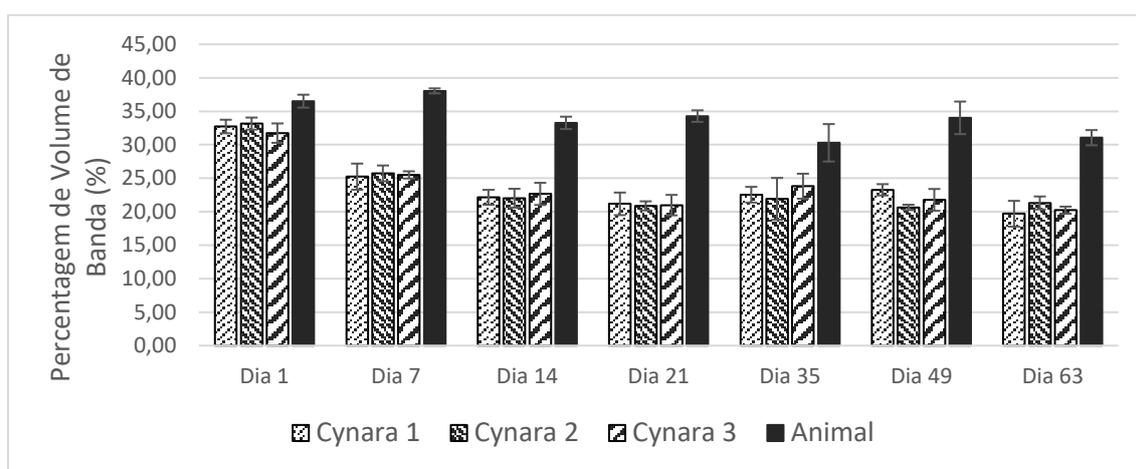


Figura 18 Volumes da Banda H diferencialmente expressos, observados nos perfis proteicos (ureia-PAGE) (média \pm desvio padrão da média), em queijos produzidos com os 3 ecótipos de agente coagulante vegetal (Cynara 1, Cynara 2, Cynara 3) e com agente coagulante animal (Animal), para todas as fases de maturação (Dia 1, Dia 7, Dia 14, Dia 21, Dia 35, Dia 49 e Dia 63)

Começando pelas diferenças entre agentes coagulantes, podemos concluir, pela análise estatística, um nível médio de expressão superior, em cada dia de maturação, para os queijos fabricados com agente coagulante animal em relação aos queijos fabricados com agente coagulante vegetal.

Através da análise estatística pode concluir-se que aos dias 1 e dias 63 de maturação, existem diferenças significativas entre os níveis de expressão dos queijos fabricados com Cynara 3 e os queijos fabricados com agente coagulante animal. Aos 7 dias e aos 35 dias de maturação, estas diferenças são significativas entre o Cynara 1 e o agente coagulante animal. Em ambos os casos as diferenças encontradas são entre um dos ecótipos de *Cynara cardunculus* L. e o agente coagulante animal, apresentando este, níveis de expressão superiores.

Na sua globalidade, esta banda apresenta um comportamento muito semelhante entre os queijos fabricados com agente coagulante vegetal ao longo dos dias de maturação, diferindo

estes dos queijos fabricados com agente coagulante animal que apresentam sempre níveis de expressão superiores, como se encontra ilustrado na Figura 19.

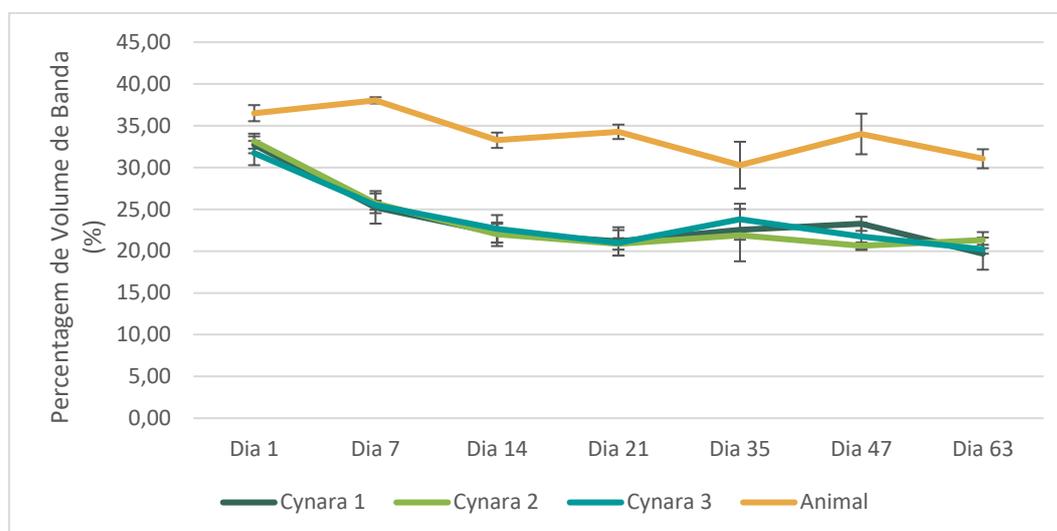


Figura 19 Evolução da percentagem relativa (média \pm desvio-padrão da média) da β -caseína ao longo dos dias de maturação (Dia 1, Dia 7, Dia 14, Dia 21, Dia 35, Dia 49 e Dia 63) para os quatro agentes coagulantes utilizados (Cynara 1, Cynara 2, Cynara 3 e Animal)

Pode ainda dizer-se ao longo dos dias de maturação se verifica uma diminuição da percentagem de volume desta banda, mais acentuada nos queijos fabricados com agente coagulante vegetal do que com agente coagulante animal, correspondendo a uma percentagem de degradação (Tabela 5) de 39,81% para o Cynara 1, de 35,72% para o Cynara 2, de 36,27% para o Cynara 3 e de 14,95% para o Animal.

Tabela 5 Percentagem de degradação (%) da β -caseína entre o primeiro dia de degradação (D1) e os restantes dias de degradação (D7, D14, D21, D35, D49 e D63), para os quatro tipos de queijos (Cynara 1, Cynara 2, Cynara 3 e Animal)

	D1-D7	D1-D14	D1-D21	D1-D35	D1-D49	D1-D63
Cynara 1	22,88	32,32	35,30	31,13	28,90	39,81
Cynara 2	22,43	33,62	37,07	33,91	37,76	35,72
Cynara 3	19,66	28,60	33,89	24,99	31,43	36,27
Animal	-4,21	8,88	6,11	17,04	6,82	14,95

4.2.3. α_5 -caseína

A Banda I, foi identificada como a pertencente à zona da α_5 -caseína, pelo que também se apresenta como uma das mais importantes a ser analisada.

Tal como se encontra ilustrado na Figura 20, esta banda pode ser observada para todos os agentes coagulantes, em todos os dias de maturação, sendo que pela comparação de médias, observa-se uma diminuição ao longo dos dias de maturação, diminuição esta que se mostra mais acentuada para os queijos fabricados com agente coagulante vegetal.

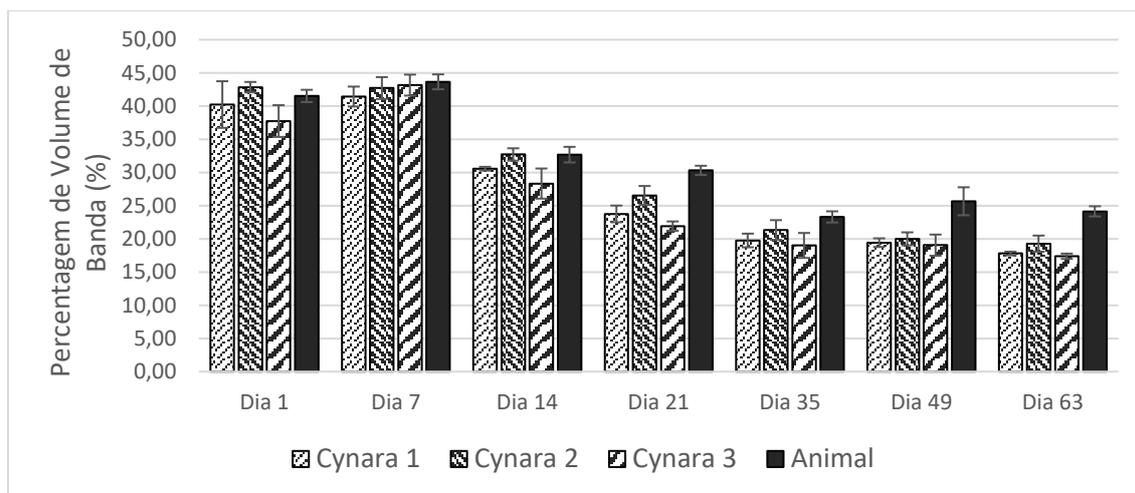


Figura 20 Volumes da Banda I diferencialmente expressos, observados nos perfis proteicos (ureia-PAGE) (média \pm desvio padrão da média), em queijos produzidos com os 3 ecótipos de agente coagulante vegetal (Cynara 1, Cynara 2, Cynara 3) e com agente coagulante animal (Animal), para todas as fases de maturação (Dia 1, Dia 7, Dia 14, Dia 21, Dia 35, Dia 49 e Dia 63)

Através da análise estatística, esta banda apresenta diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os agentes coagulantes, no mesmo dia, e entre dias de maturação para o mesmo agente coagulante. Ou seja, os níveis de expressão desta banda são influenciados tanto pelo agente coagulante utilizado no fabrico dos queijos, como pelo dia de maturação, o que vem em concordância com a primeira abordagem efetuada.

Assim, pode dizer-se que existem diferenças significativas ($p < 0,05$) nos níveis de expressão desta banda, dos 14 aos 63 dias de maturação, entre os queijos fabricados com Cynara 3 e os queijos fabricados com agente coagulante animal, expressando os últimos um valor superior de percentagem de volume, desta banda, para esses dias. Os níveis de expressão da banda de α_5 -caseína para cada agente coagulante ao longo dos dias de maturação também apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$) ou seja, existe uma influência da fase de maturação na proteólise dos queijos.

De uma forma geral, como se encontra ilustrado na Figura 21, a α -caseína, apresenta um comportamento semelhante entre os queijos fabricados com agente coagulante vegetal ao

longo dos dias de maturação, diferindo estes dos queijos fabricados com agente coagulante animal que apresentam sempre níveis de expressão inferiores.

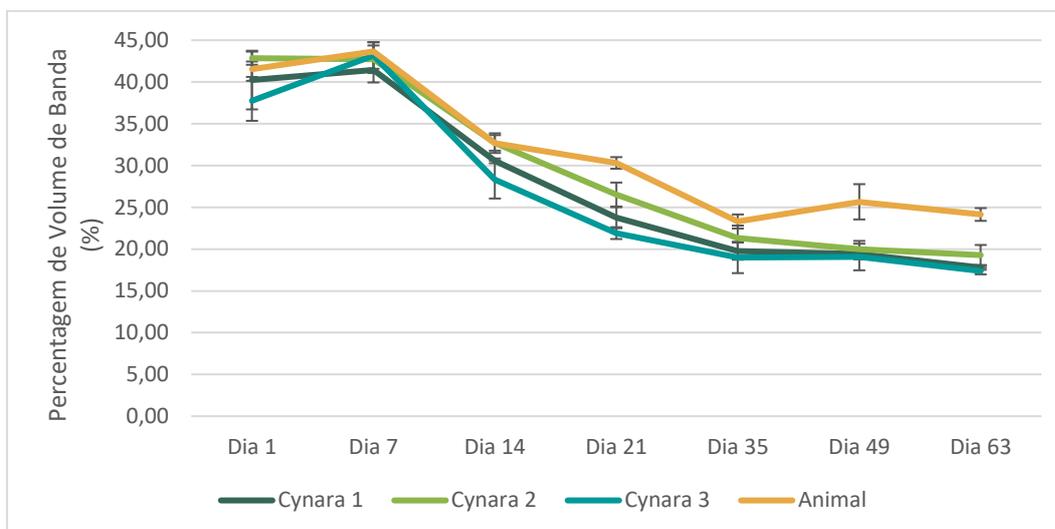


Figura 21 Evolução da porcentagem relativa (média \pm desvio-padrão da média) da α_s -caseína ao longo dos dias de maturação (Dia 1, Dia 7, Dia 14, Dia 21, Dia 35, Dia 49 e Dia 63) para os quatro agentes coagulantes utilizados (Cynara 1, Cynara 2, Cynara 3 e Animal)

É possível concluir que a interação agente coagulante/dias de maturação tem influência nos níveis de expressão da banda, permitindo observar uma maior porcentagem de degradação da α_s -caseína (Tabela 6), nos queijos fabricados com agente coagulante vegetal do que nos queijos fabricados com agente coagulante animal com porcentagens de 55,76% para o Cynara 1, de 54,99% para o Cynara 2, de 53,95% para o Cynara 3 e de 41,86% para o Animal.

Tabela 6 Porcentagem de degradação (%) da α_s -caseína entre o primeiro dia de degradação (D1) e os restantes dias de degradação (D7, D14, D21, D35, D49 e D63), para os quatro tipos de queijos (Cynara 1, Cynara 2, Cynara 3 e Animal)

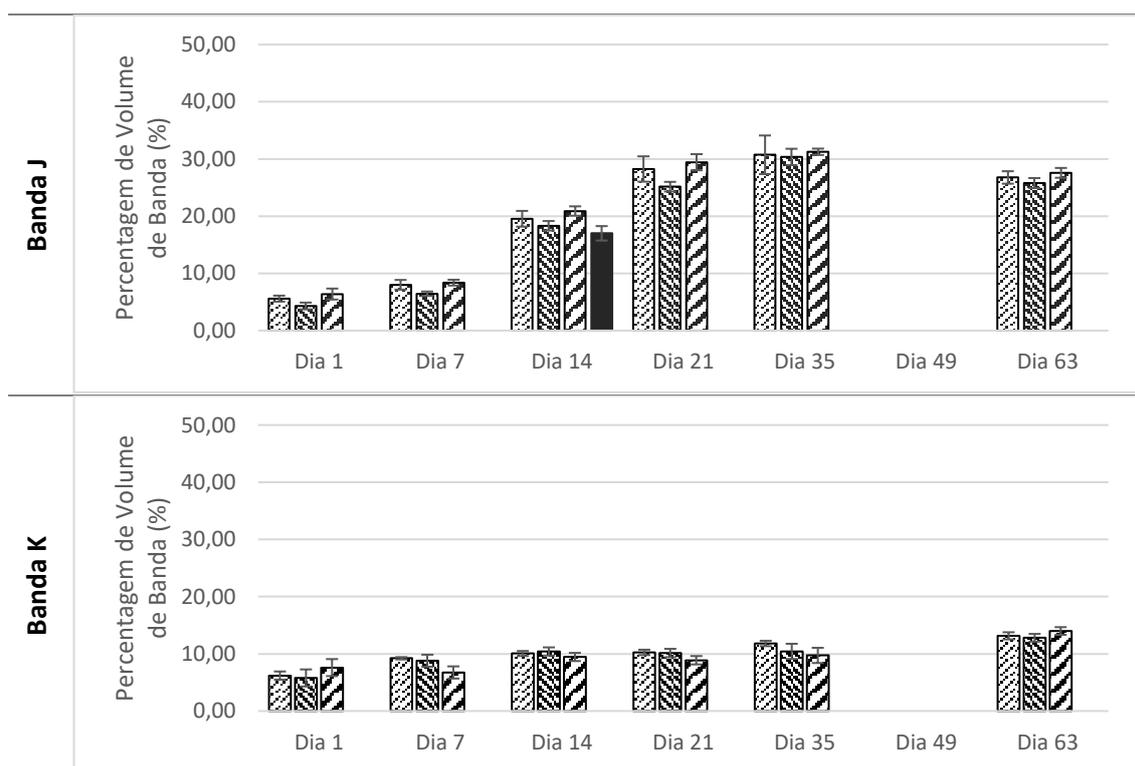
	D1-D7	D1-D14	D1-D21	D1-D35	D1-D49	D1-D63
Cynara 1	-3,00	24,03	40,95	50,89	51,70	55,76
Cynara 2	0,30	23,65	38,08	50,19	53,31	54,99
Cynara 3	-14,35	24,95	41,94	49,65	49,51	53,95
Animal	-5,12	21,30	27,00	43,87	38,21	41,86

4.2.4. Pré- α_s -caseínas

Como anteriormente referido, as bandas observadas correspondentes às pré- α_{s1} -caseínas, são as Bandas J, Banda K e Banda L.

A Banda L diz respeito ao somatório da Banda J e da Banda K, sendo este necessário devido ao facto de não ter sido possível a sua identificação individual nalgumas amostras. Assim, para além dos casos em que estas duas bandas apareceram juntas e se marcou como uma só (Banda L), também se procedeu ao somatório, nos casos em que apareciam separadas, de forma a existir uma comparação desta banda em todos os dias de maturação.

Assim como se encontra ilustrado na Figura 22, as Bandas J e K somente são observadas nos queijos fabricados com agente coagulante vegetal, apenas servindo de comparação para os 3 ecótipos de *Cynara cardunculus* L. Aos 49 dias de maturação estas bandas não são observadas em nenhum dos agentes coagulantes.



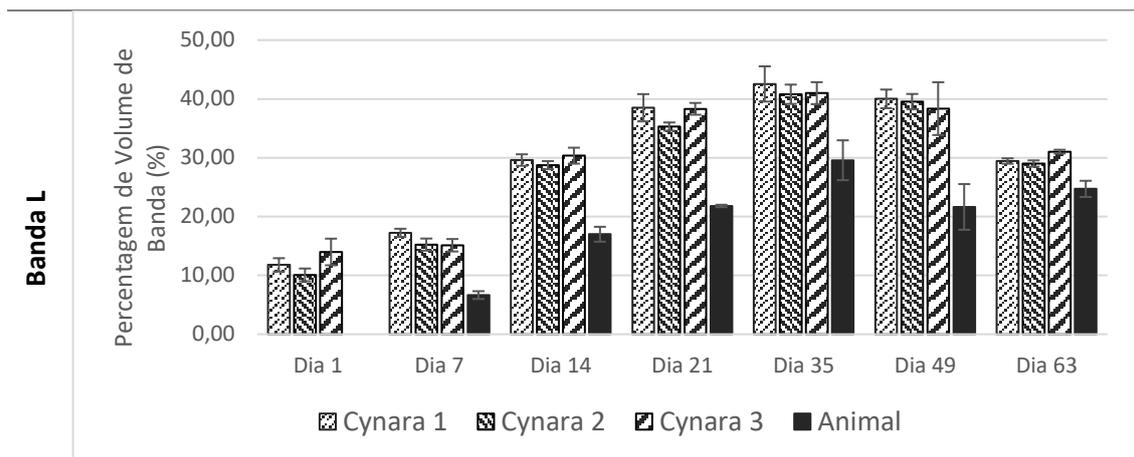


Figura 22 Volumes da Bandas J à Banda L, diferencialmente expressos, observados nos perfis proteicos (ureia-PAGE) (média \pm desvio padrão da média), em queijos produzidos com os 3 ecótipos de agente coagulante vegetal (Cynara 1, Cynara 2, Cynara 3) e com agente coagulante animal (Animal), para todas as fases de maturação (Dia 1, Dia 7, Dia 14, Dia 21, Dia 35, Dia 49 e Dia 63)

A Banda J é observada isoladamente nos queijos fabricados com agente coagulante animal aos 14 dias de maturação.

Quanto à evolução desta banda ao longo dos dias de maturação, é possível observar diferenças significativas nos níveis de expressão dos três tipos de queijos. As diferenças são em especial entre o primeiro dia de maturação e os 35 dias de maturação, quando é apresentada uma maior percentagem de volume para esta banda. Entre dias de maturação também se observam diferenças significativas para cada agente coagulante.

Como se encontra ilustrado, a Banda L não foi observada no primeiro dia de maturação, aparecendo a partir dos 7 dias de maturação. Como estas caseínas são provavelmente a degradação da α_s -caseína, pode-se concluir que nos queijos fabricados com agente coagulante animal não sofreram degradação no primeiro dia de maturação.

De acordo com a análise estatística, os níveis de expressão apresentados pelos queijos fabricados com o *Cynara 1* apresentam diferenças significativas dos queijos fabricados com agente coagulante animal, ao longo dos dias de maturação, apresentando os primeiros um nível de expressão superior.

Quanto à evolução desta banda ao longo dos dias de maturação, através da análise estatística observam-se diferenças significativas ($p < 0,05$) para cada agente coagulante.

No entanto, quando é observado o comportamento do volume relativo desta banda, ao longo dos dias de maturação (Figura 23), pode-se observar um aumento dos seus níveis de expressão até ao Dia 35, sendo que a partir daí é possível observar uma diminuição do seu

volume relativo. Também é possível observar que os três ecótipos de *Cynara cardunculus* L. apresentam um comportamento muito semelhante enquanto o agente coagulante animal se destaca pelo aparecimento desta banda apenas a partir do Dia 7, como já foi referido, apresentando sempre, ao longo da maturação, níveis de expressão inferiores.

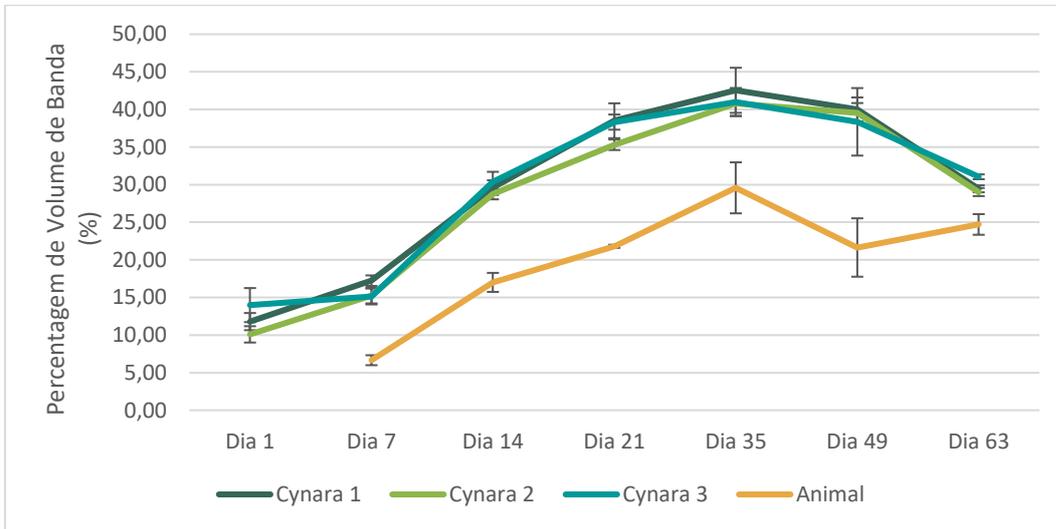
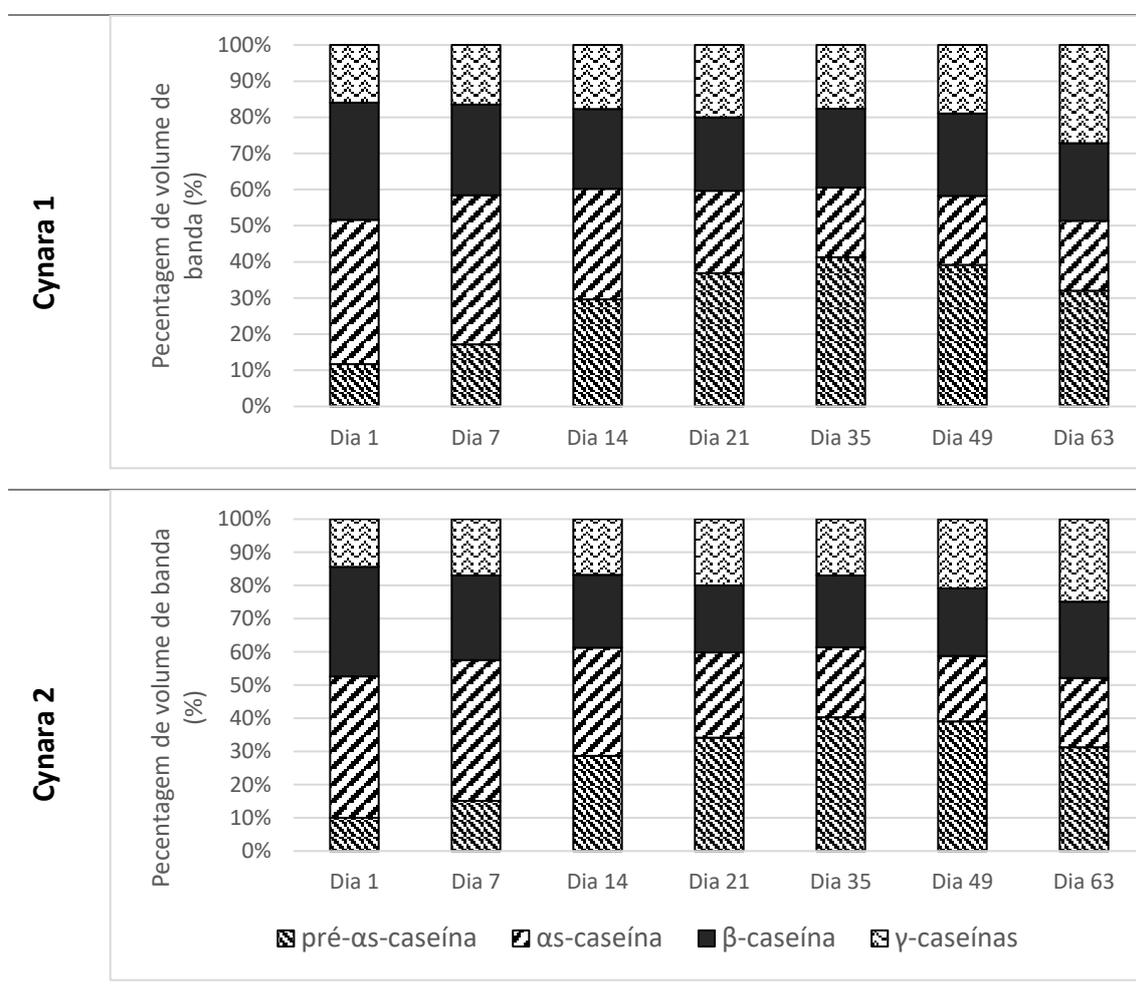


Figura 23 Evolução da percentagem relativa (média \pm desvio-padrão da média) das pré- α_s -caseínas ao longo dos dias de maturação (Dia 1, Dia 7, Dia 14, Dia 21, Dia 35, Dia 49 e Dia 63) para os quatro agentes coagulantes utilizados (Cynara 1, Cynara 2, Cynara 3 e Animal)

5. Discussão

Após a análise individual das quatro zonas de caseínas, é possível uma análise conjunta das mesmas, ao longo do processo de maturação. Ou seja, é possível encontrar um comportamento evolutivo das caseínas, assim como uma relação entre elas, de forma a tentar obter uma caracterização da proteólise no queijo de Évora.

A Figura 24, que espelha a organização das caseínas nos géis eletroforéticos apresenta a evolução da percentagem relativa do volume das γ -, β -, α_s - e pré- α_s -caseínas, ao longo dos dias de maturação, referindo-se esta evolução individualmente aos quatro tipos de queijos fabricados, ou seja, à utilização dos quatro agentes coagulantes.



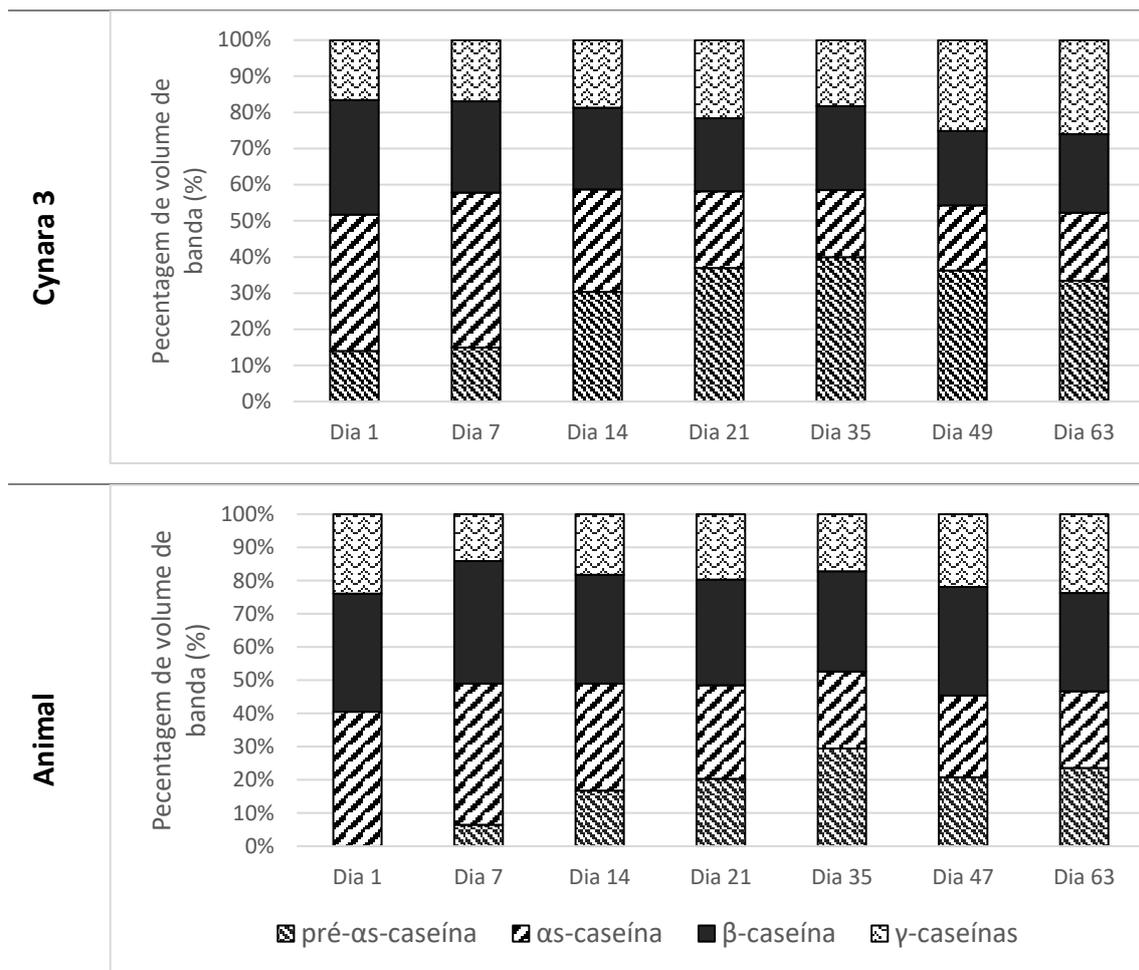


Figura 24 Evolução da percentagem relativa de volume das quatro zonas de caseínas (γ -, β -, α_S - e pré- α_S -caseínas) ao longo dos dias de maturação (Dia 1, Dia 7, Dia 14, Dia 21, Dia 35, Dia 49 e Dia 63), para os quatro agentes coagulantes utilizados: Cynara 1; Cynara 2; Cynara 3; Animal.

Primeiramente, pode-se observar que existe uma grande semelhança nas proporções relativas das caseínas entre os queijos fabricados com agente coagulante vegetal, apresentando estas diferenças referentes às proporções relativas das caseínas entre os queijos fabricados com agente coagulante animal. Isto está de acordo com os resultados obtidos para cada banda individualmente, em que as diferenças significativas encontradas foram essencialmente entre o coagulante vegetal (um ou os vários ecótipos de *Cynara cardunculus* L.) e o agente coagulante animal.

Considerando a importância da α_S -caseína e da β -caseína, a discussão inicia e centra-se na sua evolução ao longo da maturação, seguindo-se os produtos da sua degradação.

A começar pelas α_S -caseínas, a sua proporção relativa diminui ao longo do processo de maturação nos queijos fabricados com agente coagulante vegetal e nos queijos fabricados com agente coagulante animal. Os resultados apresentados mostram uma diminuição mais elevada da quantidade desta proteína, entre os 7 e os 14 dias de maturação, não sendo, no entanto,

uma diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$). A tendência para a diminuição ligeira destes valores continua até ao fim da maturação. Os níveis desta caseína, para os queijos fabricados com agente coagulante vegetal, só se começam a distanciar significativamente da proporção de volume apresentada pelos queijos fabricados com agente coagulante animal a partir dos 21 dias de maturação. Ou seja, baseado nos valores médios das últimas amostras analisadas, aos 63 dias de maturação, a quantidade final apresentada pela α_s -caseína nos queijos fabricados com os três ecótipos de agente coagulante vegetal mostrou ser relativamente inferior à quantidade apresentada pelos queijos produzidos com agente coagulante animal ($17,80 \pm 0,27\%$ - *Cynara 1*; $19,28 \pm 1,21\%$ - *Cynara 2*; $17,38 \pm 0,40\%$ - *Cynara 3* vs $24,15 \pm 0,77\%$ Animal) (média \pm desvio-padrão da média). Estes resultados vão de encontro aos apresentados por outros autores (Fernández-Salguero & Sanjuán, 1999; Pino et al., 2009; Tejada et al., 2008), o que leva a supor que esta diminuição da proporção de volume da α_s -caseína se deve à sua degradação ao longo do processo de maturação.

A região das β -caseínas apresentou uma ligeira diminuição na sua proporção relativa ao longo do período de maturação. No entanto, o nível de expressão desta caseína foi superior nos queijos fabricados com agente coagulante animal ($31,05 \pm 1,14\%$ vs $19,69 \pm 1,19\%$ - *Cynara 1*; $21,31 \pm 0,96\%$ - *Cynara 2*; $20,22 \pm 0,54\%$ - *Cynara 3*) (média \pm desvio-padrão da média). Ou seja, se os queijos fabricados com agente coagulante animal apresentam níveis de expressão superiores, significa que foi menos degradada ao longo do processo de maturação, o que pode demonstrar uma maior resistência da β -caseína à ação do agente coagulante animal comparativamente ao agente coagulante vegetal. Também Freitas e Malcata (1996) afirmaram que a α_s e a β -caseínas sofreram uma degradação mais extensa nos queijos fabricados com agente coagulante vegetal do que os fabricados com agente coagulante animal. Estes mesmos resultados foram encontrados por Nuñez et al. (1991), Sá e Barbosa (1972) e Sousa e Malcata (1997), que reportam uma atividade proteolítica superior do agente coagulante vegetal em queijos de ovelha.

Comparando a evolução da quantidade da α_s -caseína com a quantidade apresentada pela β -caseína, os valores da última foram sempre superiores, ao longo da maturação, a ter em conta todos os agentes coagulantes utilizados. Aos 63 dias de maturação, a percentagem de degradação da β -caseína foi inferior à percentagem apresentada pela α_s -caseína. Estes resultados obtidos levam a supor uma maior resistência enzimática da β -caseína, resultados estes que podem ser confirmados pelos resultados obtidos por outros autores (Fernández-Salguero & Sanjuán, 1999; Fox, 1989; Marcos et al., 1979; Veloso et al., 2004) que apresentam

esta resistência superior da β -caseína à ação do agente coagulante, através de uma menor taxa de degradação, ou seja, uma maior quantidade desta fração proteica presente.

Importante realçar que tanto a α_s - como a β -caseína apresentam um aumento da taxa de degradação até aos 35 dias de maturação, sendo que a partir deste dia, a degradação permanece relativamente constante até aos 63 dias de maturação. Este comportamento vai também influenciar o volume relativo expresso pelo produto da sua degradação.

Quanto ao resultado da degradação da α_s -caseína, as pré- α_s -caseínas, que possuem uma mobilidade eletroforética superior à das α_s -caseínas, apresentam um aumento dos seus níveis de expressão ao longo da maturação, de uma forma que os valores do último dia analisado (63 dias) são praticamente o dobro dos valores apresentados no início da maturação. Foi possível observar diferenças na distribuição das caseínas de acordo com o seu peso molecular, ou seja, algumas das bandas constituintes das pré- α_s -caseínas produzidas com agente coagulante vegetal apresentam mobilidade eletroforética mais baixa do que as produzidas com agente coagulante animal. Isto também foi observado por Pereira *et al.* (2008) e por Freitas e Malcata (1996) noutros queijos de ovelha.

O volume relativo das bandas localizadas na região das γ -caseínas, produto da degradação das β -caseínas, e que possuem uma mobilidade eletroforética inferior, apresentou um ligeiro aumento ao longo do período de maturação, para os três ecótipos de *Cynara cardunculus* L, sendo que nos queijos fabricados com agente coagulante animal foi observada uma formação mais extensiva destas caseínas, tal como apresentado por Freitas e Malcata (1996), o que leva a supor um maior efeito proteolítico do agente coagulante vegetal, em relação ao animal.

Observa-se um comportamento inversamente proporcional entre a α_s - e β -caseínas e as caseínas correspondentes ao produto das suas degradações, as pré- α_s -caseínas e as γ -caseínas, relativamente. Isto pode explicar-se pelo facto de à medida que a α_s - e a β -caseínas vão sendo degradadas, diminuindo a sua percentagem de volume ao longo dos dias de maturação, vai aparecendo o seu produto, aumentando a sua percentagem de volume. Segundo vários autores, como também já foi referido previamente, as bandas correspondentes ao produto da α_s - e β -caseínas, são conhecidas não só como resultantes da ação das enzimas presentes no agente coagulante, como também da ação dos plasmídeos do leite, assim como de enzimas microbianas (Delgado *et al.*, 2010; Fernández-Salguero & Sanjuán, 1999). A ter em conta este facto e o tipo de leite utilizado no fabrico deste queijo (leite não pasteurizado), pode-se considerar que

algumas das variações nestas bandas, a partir dos dias 14 dias de maturação são derivadas da ação dos microrganismos presentes no queijo.

Analisando o perfil de caseínas, pela análise de componentes principais, verificou-se que as primeiras duas componentes explicaram 84,84% da variação total (PC1=67,70% e PC2=17,14%) cujo resultado gráfico pode ser observado na Figura 25.

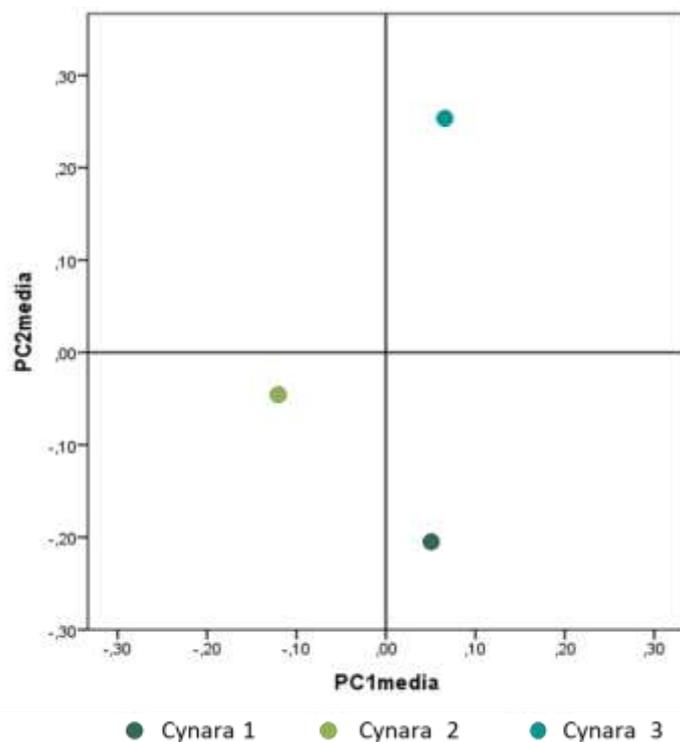


Figura 25 Diferenciação entre os queijos fabricados com os três ecótipos de *Cynara cardunculus* L. (Cynara 1, Cynara 2 e Cynara 3) com base no perfil das caseínas

Segundo a primeira componente (PC1) verificamos que os queijos fabricados com Cynara 2 separam-se dos outros queijos sobretudo quanto à α_s -caseína e quanto à sua degradação, as pré- α_s -caseína. Pelo que demonstra uma menor degradação da α_s -caseína e uma, conseqüente, menor percentagem de volume da pré- α_s -caseína.

Por outro lado, a segunda componente (PC2) separa os queijos fabricados com Cynara 3 dos outros sobretudo pelos produtos de degradação da β -caseína, as γ -caseínas que apresentam uma percentagem de volume superior.

Podemos concluir que no Queijo de Évora, as diferenças nos perfis de caseínas, ao longo da maturação, foram principalmente entre os queijos fabricados com agente coagulante vegetal quando comparados com os queijos fabricados com o agente coagulante animal. No entanto, forma encontradas pequenas diferenças entre os ecótipos de *Cynara cardunculus* L., cujas

consequências seriam interessantes avaliar no que diz respeito a características do queijo, nomeadamente quanto às características sensoriais.

Com o objetivo de se caracterizar este queijo, ou seja, focando apenas os três ecótipos utilizados, pode concluir-se ainda que o produto da proteólise das caseínas aumentou gradualmente ao longo de processo de maturação (dia 1 ao dia 63), no entanto, trata-se de um queijo, que até ao fim da maturação, não apresenta uma degradação muito extensiva das caseínas (54,90% para a α -caseína, e 37,27% para a β -caseína, considerando a média dos três ecótipos), contrariamente ao verificado no queijo *Torta del Casar* (86% para a α -caseína e 74% para a β -caseína) (Ordiales et al., 2012).

6. Conclusão

Tendo presente o objetivo deste trabalho, e após a análise atenta da bibliografia disponível sobre esta temática, podemos realçar que já existe informação sobre a influência de vários fatores na degradação da fração proteica em diferentes variedades de queijo ao longo do período da maturação.

Na região Mediterrânica, o agente coagulante *Cynara cardunculus* L. é cada vez mais utilizado e valorizado na produção de queijo, pelo que os resultados obtidos nesta dissertação contribuíram para aprofundar os conhecimentos sobre o efeito de três ecótipos desta planta, comparativamente a um agente coagulante animal, na degradação da fração proteica, medida pela análise de evolução do perfil de caseínas no Queijo de Évora, analisado ao longo do período de maturação (1, 7, 14, 21, 35, 49 e 63 dias).

Verificou-se que foram identificadas doze bandas proteicas, que foram denominadas com letras maiúscula, da letra A à letra L, correspondendo a letra A à primeira a aparecer (menor mobilidade electroforética). De acordo com a revisão bibliográfica, foi possível fazer uma correspondência das Bandas identificadas às regiões de caseínas, nomeadamente γ -, β -, α_s - e pré- α_s -caseínas. Considerou-se a seguinte correspondência: γ -caseínas – Bandas A, B, C, D, E, F, G; β -caseína – Banda H; α_s -caseína – Banda I; pré- α_s -caseínas – Bandas J, K e L.

Analisando os resultados do perfil das caseínas (com base nas bandas) em função dos agentes coagulantes (considerando todas as fases de maturação), verificou-se que não existem diferenças significativas ($p > 0,05$) no perfil de caseínas entre os queijos fabricados com os três ecótipos de *Cynara cardunculus* L., mas existem diferenças ($p < 0,05$), em algumas bandas, entre estes e os queijos fabricados com agente coagulante animal.

A β -caseína e a α_s -caseína foram identificadas como as caseínas mais importantes na proteólise dos queijos, sendo as que são possíveis de identificar para todos os agentes coagulantes, em todos os dias de maturação, para além de determinarem o aparecimento das outras duas regiões de caseínas.

Os níveis de expressão destas caseínas são influenciados tanto pelo agente coagulante utilizado, como pelo dia de maturação.

São observadas percentagens relativas de volume superiores destas duas bandas, para os queijos fabricados com agente coagulante animal, em relação aos queijos fabricados com agente coagulante vegetal, ao longo de toda a maturação.

Ocorre uma diminuição da percentagem de volume, da α_s - e da β -caseína, ao longo da maturação, ou seja, ocorre uma degradação das caseínas, em ambos os casos mais acentuada nos queijos fabricados com agente coagulante vegetal, traduzindo-se numa percentagem de degradação de: 37,27% nos queijos fabricados com agente coagulante vegetal (sem diferenciação de ecótipos) e de 14,95% nos queijos fabricados com agente coagulante animal, para a β -caseína; 54,90% nos queijos fabricados com agente coagulante vegetal (sem diferenciação de ecótipos) e de 41,86% nos queijos fabricados com agente coagulante animal, para a α_s -caseína.

Durante todo o processo de maturação é possível observar uma maior resistência da β -caseína à hidrólise pelos agentes coagulantes do que da α_s -caseína.

As γ -caseínas e as pré- α_s -caseínas foram identificadas como o produto da degradação da β -caseína e a da α_s -caseína, respetivamente. No entanto, uma conclusão que foi possível tirar é de que estas não apresentam um comportamento assim tão linear com a degradação da β -caseína e a da α_s -caseína. Isto pode ser explicado pelo leite utilizado ser um leite de ovelha cru, que está sujeito à ação de muitos microrganismos ao longo da maturação, especialmente nas últimas fases de maturação. A ter isto em conta, também algumas conclusões foram tiradas do comportamento destas bandas ao longo da maturação:

As γ -caseínas apresentam um comportamento muito semelhante entre os quatro agentes coagulantes utilizados, sendo que os queijos fabricados com agente coagulante animal apenas se diferenciam apresentando uma diminuição dos níveis de expressão nos primeiros dias de maturação contrariamente ao que acontece nos queijos fabricados com agente coagulante vegetal.

As pré- α_s -caseínas apresentam diferenças significativas ($p < 0,01$) entre os queijos fabricados com agente coagulante vegetal e os queijos fabricados com agente coagulante animal, apresentando estes durante toda a maturação uma percentagem de volume inferior. Como estas caseínas são o produto da degradação da α_s -caseína, esta percentagem de volume inferior diz respeito a menores produtos de degradação, o que vai de encontro aos resultados níveis de expressão superiores que a α_s -caseína apresenta nos queijos fabricados com agente coagulante

animal. Verifica-se ainda um aumento da percentagem relativa das pré- α_s -caseínas até aos 35 dias de maturação, diminuindo a partir daí.

Considerando o objetivo principal do trabalho, concluiu-se, por uma análise de componentes principais, que os queijos fabricados com Cynara 2 separam-se dos outros queijos, devido a uma ação proteolítica menor nas α_s -caseína e, conseqüentemente um perfil diferente nas pré- α_s -caseínas. Os queijos fabricados com Cynara 3 separam-se dos outros sobretudo pelos produtos de degradação da β -caseína, as γ -caseínas que apresentam uma percentagem de volume superior.

7. Trabalho futuro

No decorrer do desenvolvimento deste projeto pensaram-se hipoteticamente em eventuais linhas de investigação, nomeadamente em avaliar o teor de sal, e a flora microbiana dos queijos, uma vez que se tratam de parâmetros que podem influenciar os resultados da degradação das frações azotadas. Para um melhor entendimento da ação destes microrganismos, seria vantajoso a elaboração de um ensaio com leite pasteurizado.

Da mesma forma, seria interessante identificar a composição em proteases dos diferentes ecótipos, relacionar com os parâmetros edafo-climáticos da região originária dos ecótipos, assim como associar aos parâmetros de coagulação do leite, frações azotadas, compostos voláteis e os parâmetros de textura e sabor dos queijos.

8. Referências Bibliográficas

- Alzugaray, D., & Alzugaray, C. (1991). *Aprenda a fazer queijos*. (Ed. Mundo Editorial, Ed.) (1ª). S.A.
- Baldini, V. L. S. (1998). *Proteólise em Queijo tipo Prato durante a Maturação*. Universidade de São Paulo.
- Caderno de Especificações do Queijo de Évora. (n.d.).
- CARDOP. (n.d.). Retrieved August 15, 2017, from http://cardop-queijoserradaestrela.blogspot.pt/p/blog-page_3719.html
- Correia, P., Vítor, A., Tenreiro, M., Correia, A. C., Madanelo, J., & Guiné, R. (2016). Effect of different thistle flower ecotypes as milk-clotting in Serra da Estrela cheese. *Nutrition & Food Science*, 46(4), 458–475.
- Delgado, F.-J., Rodríguez-Pinilla, J., González-Crespo, J., Ramírez, R., & Roa, I. (2010). Proteolysis and texture changes of a Spanish soft cheese ('Torta del Casar') manufactured with raw ewe milk and vegetable rennet during ripening. *International Journal of Food Science and Technology*, 45(3), 512–519. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2009.02157.x>
- Despacho 29/94 de 4 de fevereiro. (n.d.). Retrieved from https://tradicional.dgadr.gov.pt/images/prod_imagens/queijos/docs/Desp_29_94.pdf
- Faro, C., Verissimo, P., Lin, Y., Tang, J., & Pires, E. (1995). Cardosin A and B, aspartic proteases from the flowers of cardoon. In K. Takahashi (Ed.), *Aspartic Proteinases. Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 362 (pp. 373–377). Boston, MA: Springer. http://doi.org/10.1007/978-1-4615-1871-6_49
- Fernandes, J. (2013). Produção de queijo: origens dos coalhos. *AGROTEC: Revista Técnico-Científica Agrícola*, 8, 101–103.
- Fernández-Salguero, J., & Sanjuán, E. (1999). Influence of vegetable and animal rennet on proteolysis during ripening in ewes' milk cheese. *Food Chemistry*, 64, 177–183.
- Fox, P. F. (1989). Proteolysis During Cheese Manufacture and Ripening. *Journal of Dairy Science*. [http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(89\)79246-8](http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(89)79246-8)
- Galán, E., Cabezas, L., & Fernández-salguero, J. (2012). Proteolysis , microbiology and sensory properties of ewes' milk cheese produced with plant coagulant from cardoon *Cynara cardunculus*, calf rennet or a mixture thereof. *International Dairy Journal*, 25, 92–96. <http://doi.org/10.1016/j.idairyj.2012.02.001>
- Galán, E., Prados, F., Pino, A., Tejada, L., & Fernández-Salgueiro, J. (2008). Influence of different amounts of vegetable coagulant from cardoon *Cynara cardunculus* and calf rennet on the proteolysis and sensory characteristics of cheeses made with sheep milk. *International Dairy Journal*, 18, 93–98. <http://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.06.003>
- Guiné, R. P. F., Correia, P. M. R., & Correia, A. C. (2015). Avaliação Comparativa de Queijos Portugueses de Cabra e Ovelha. *Millenium*, 49, 111–130.
- Guinee, T. P., & Wilkinson, M. G. (1992). Rennet coagulation and coagulants in cheese manufacture. *Journal of the Society of Dairy Technology*, 45(4), 94–104.
- Heimgartner, U., Pietrzak, M., Geertsen, R., Brodelius, P., Figueiredo, A. C., & Pais, M. S. S. (1990). Purification and partial characterization of milk clotting proteases from flowers of *Cynara cardunculus*. *Phytochemistry*, 29(5), 1405–1410.

- Irigoyen, A., Izco, J. M., Ibáñez, F. C., & Torre, P. (2002). Influence of calf or lamb rennet on the physicochemical, proteolytic, and sensory characteristics of an ewe's-milk cheese. *International Dairy Journal*, *12*, 27–34.
- Irigoyen, A., Izco, J. M., Ibáñez, F. C., & Torre, P. (2001). Influence of rennet milk-clotting activity on the proteolytic and sensory characteristics of an ovine cheese. *Food Chemistry*, *72*, 137–144.
- Machado, M. da G. J. (1997). *Estudo do efeito da adição de coalho vegetal ou animal nas características organolépticas do queijo tipo Évora*. Universidade de Évora.
- Mallatou, H., Pappa, E. C., & Boumba, V. A. (2004). Proteolysis in Teleme cheese made from ewes', goats' or a mixture of ewes' and goats' milk. *International Dairy Journal*, *14*, 977–987. <http://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.03.009>
- Marcos, A., Esteban, M. A., León, F., & Fernández-Salguero, J. (1979). Electrophoretic Patterns of European Cheeses: Comparison and Quantitation. *Journal of Dairy Science*. [http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(79\)83345-7](http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(79)83345-7)
- Martins, A. P. L., Vasconcelos, M. M. P. De, & Sousas, R. B. De. (1996). Thistle (*Cynara cardunculus* L.) flower as a coagulant agent for cheesemaking. Short characterization. *Lait*, *76*(5), 473–477. <http://doi.org/10.1051/lait:1996536>
- McSweeney, P. L. H., & Fox, P. F. (1997). Chemical methods for the characterization of proteolysis in cheese during ripening. *Lait*, *77*, 41–76.
- Melo, S. C. S. (2016). *Estudo Levantamento das Anomalias da Coagulação em Leites Individuais de Vacas Leiteiras da Ilha Terceira*. Universidade dos Açores.
- Moreira, C. P. M. (2011). *Desenvolvimento de metodologias analíticas para queijos. Estudo de caso: Queijos da Beira Interior*. Universidade Técnica de Lisboa.
- O'Mahony, J. A., Sousa, M. J., & Mcsweeney, P. L. H. (2003). Proteolysis in miniature Cheddar-type cheeses made using blends of chymosin and *Cynara cardunculus* proteinases as coagulant. *International Journal of Dairy Technology*, *56*, 52–58.
- Ordiales, E., Benito, M. J., Martín, A., Fernández, M., Hernández, A., & Córdoba, M. D. G. (2013). Proteolytic effect of *Cynara cardunculus* rennet for use in the elaboration of "Torta del Casar" cheese. *Journal of Dairy Research*, *80*, 429–438. <http://doi.org/10.1017/S0022029913000411>
- Ordiales, E., Martín, A., Benito, M. J., Hernández, A., Ruiz- Moyano, S., & Córdoba, M. de G. (2012). Technological characterisation by free zone capillary electrophoresis (FCZE) of the vegetable rennet (*Cynara cardunculus*) used in "Torta del Casar." *Food Chemistry*, *133*, 227–235. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.01.012>
- Park, Y. W., & Jin, Y. K. (1998). Proteolytic patterns of Caciotta and Monterey Jack hard goat milk cheeses as evaluated by SDS – PAGE and densitometric analyses. *Small Ruminant Research*, *28*, 263–272.
- Petrella, G., Pati, S., Gagliardi, R., Rizzuti, A., Mastroilli, P., La Gatta, B., & Di Luccia, A. (2015). Study of proteolysis in river buffalo mozzarella cheese using a proteomics approach. *Journal of Dairy Science*, *98*(11), 7560–72. <http://doi.org/10.3168/jds.2015-9732>
- Pinheiro, C., Banks, J., & Brechany, E. (1998). Amino acid profiles in the ripening of Evora cheese manufactured with calf rennet or an extract from *Cynara*. In *In Symposium: Quality and microbiology of traditional and raw milk cheese*. Dijon, France.

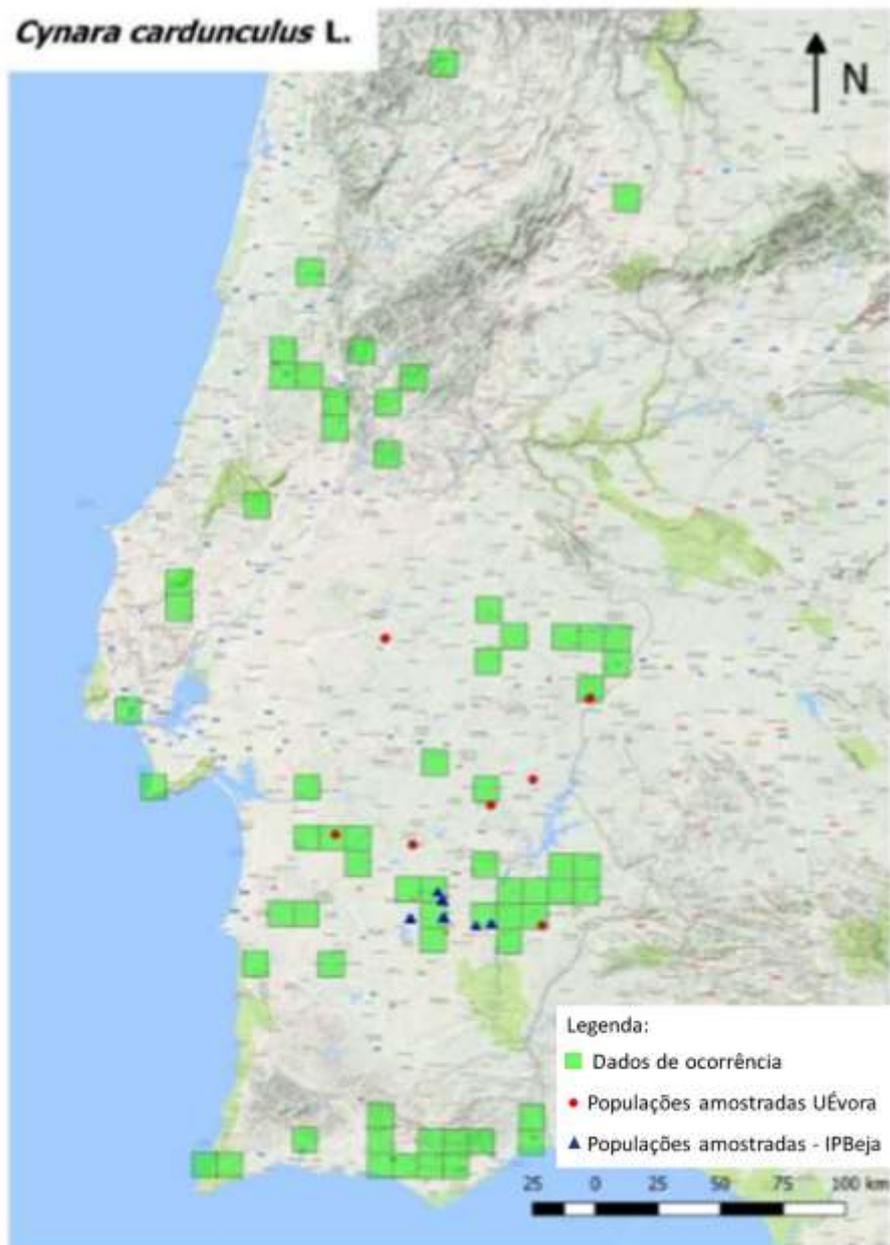
- Pinheiro, C. M. S. C. (2002). *Contributo para a caracterização do queijo de ovelha produzido na região de Évora: Aspectos químicos, bioquímicos do leite obtido em diferentes sistemas de produção e físico-químicos, bioquímicos, tecnológicos e organolépticos do queijo*. Universidade de Évora.
- Pinheiro, C., Machado, G., Bettencourt, C., & Matos, C. (2007). Avaliação sensorial do queijo: Definição dos atributos de qualidade. *Revista de Ciências Agrárias*, 351–357.
- Pino, A., Prados, F., Galán, E., McSweeney, P. L. H., & Fernández-salguero, J. (2009). Proteolysis during the ripening of goats' milk cheese made with plant coagulant or calf rennet. *Food Research International*, 42(3), 324–330. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2008.12.009>
- Pires, E., Faro, C., Macedo, I., Esteves, C., Morgado, J., Veríssimo, P., ... Gomes, D. (1994). Flor do Cardo versus Quimosina no Fabrico de Queijos Artesanais. In *Química* (pp. 66–68).
- Prados, F., Pino, A., & Fernández-salguero, J. (2007). Effect of a powdered vegetable coagulant from cardoon *Cynara cardunculus* in the accelerated ripening of Manchego cheese. *International Journal of Food Science and Technology*, 42, 556–561. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2006.01271.x>
- Ramos, P. A. B. (2015). *Caracterização química e avaliação da atividade biológica de componentes extratáveis da Cynara cardunculus*. Universidade de Aveiro.
- Rebouillat, S., & Ortega-Requena, S. (2015). Potential Applications of Milk Fractions and Valorization of Dairy By-Products: A Review of the State-of-the-Art Available Data, Outlining the Innovation Potential from a Bigger Data Standpoint. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 6(July), 176–203. <http://doi.org/10.4236/jbnb.2015.63018>
- Roa, I., López, M. B., & Mendiola, F. J. (1999). Residual clotting activity and ripening properties of vegetable rennet from *Cynara cardunculus* in La Serena cheese. *Food Research International*, 32(6), 413–419. [http://doi.org/10.1016/S0963-9969\(99\)00098-8](http://doi.org/10.1016/S0963-9969(99)00098-8)
- Rocha, T. L., Costa, P., Magalhães, J., Evaristo, R., Vasconcelos, Érico; Coutinho, M., Paes, N., ... Fátima, M. de. (2005). Eletroforese Bidimensional e análise de proteomas. In *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)*.
- Rosa, I. de F., Lidon, F. C., & Oliveira, J. F. S. (2005). Qualidade do Queijo de Évora, produzido com coagulantes de origem microbiológica (*Mucor miehei*) e vegetal (*Cynara cardunculus* L).
- Roseiro, L. B., Barbosa, M., Ames, J. M., & Wilbey, R. A. (2003). Cheesemaking with vegetable coagulants - The use of *Cynara* L. for the production of ovine milk cheeses. *International Journal of Dairy Technology*, 56(2), 76–85. <http://doi.org/10.1046/j.1471-0307.2003.00080.x>
- Sarmiento, A. C., Lopes, H., Oliveira, C. S., Vitorino, R., Samyn, B., Sergeant, K., ... Barros, M. T. (2009). Multiplicity of aspartic proteinases from *Cynara cardunculus* L. *Planta*, 230(2), 429–439. <http://doi.org/10.1007/s00425-009-0948-9>
- Satyendra, K. G., & Bhavdish, N. J. (1994). Rennet: Current trends and future research. *Food Reviews International*, 10(3), 313–355.
- Sousa, M. J., & Malcata, F. X. (1997). Proteolysis of ovine and caprine caseins in solution by enzymatic extracts from flowers of *Cynara cardunculus*.
- Sousa, M. J., & Malcata, F. X. (2002). Advances in the role of a plant coagulant (*Cynara cardunculus*) in vitro and during ripening of cheeses from several milk species. *Lait*, 82,

151–170. <http://doi.org/10.1051/lait>

- Sousa, Ardö, & McSweeney. (2001). Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *International Dairy Journal*, *11*, 327–345.
- Spudeit, D. A., Dolzan, M. D., & Micke, G. A. (2012). Conceitos básicos em Eletroforese Capilar. *Scientia Chromatographica*, *4*(4), 287–297. <http://doi.org/10.4322/sc.2012.017>
- Tejada, L., & Fernández-Salguero, J. (2003). Chemical and microbiological characteristics of ewe milk cheese (Los Pedroches) made with a powdered vegetable coagulant or calf rennet. *Italian Journal of Food Science*, *15*(1), 125–131.
- Tejada, L., Abellán, A., Cayuela, J. M., Martínez-Cacha, A., & Fernández-Salguero, J. (2008). Proteolysis in goats' milk cheese made with calf rennet and plant coagulant. *International Dairy Journal*, *18*, 139–146. <http://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.08.010>
- Tejada, L., Gómez, R., & Fernández-Salguero, J. (2007). Sensory characteristics of ewe milk cheese made with three types of coagulant: Calf Rennet, Powdered Vegetable Coagulant and Crude Aqueous Extract from *Cynara Cardunculus*. *Journal of Food Quality*, *30*, 91–103.
- Veiros, C. B. R. (2005). *Contributo para a caracterização do queijo Terrincho: estudo da proteólise e avaliação da autenticidade por HPLC/UV*. Universidade do Porto.
- Veloso, A. C. A. (2001). *Análise das caseínas de leite e queijos por HPLC/UV e por Ureia-PAGE*. Universidade do Porto.
- Veloso, A. C. A., Teixeira, N., & Ferreira, I. M. P. L. V. . (2002). Separation and quantification of the major casein fractions by reverse-phase high-performance liquid chromatography and urea-polyacrylamide gel electrophoresis: Detection of milk adulterations. *Journal of Chromatography*, *967*, 209–218.
- Veloso, A. C. A., Teixeira, N., Peres, A. M., Mendonça, Á., & Ferreira, I. M. P. L. V. O. (2004). Evaluation of cheese authenticity and proteolysis by HPLC and urea-polyacrylamide gel electrophoresis. *Food Chemistry*, *87*(2), 289–295. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.12.041>
- Veríssimo, P., Esteves, C., Faro, C., & Pires, E. (1995). The vegetable rennet of *Cynara Cardunculus* L. contains two proteinases with chymosin and pepsin-like specificities. *Biotechnology Letters*, *17*, 621–626.
- Vioque, M., Gómez, R., Sánchez, E., Mata, C., Tejada, L., & Fernández-Salguero, J. (2000). Chemical and Microbiological Characteristics of Ewes' Milk Cheese Manufactured with Extracts from Flowers of *Cynara cardunculus* and *Cynara humilis* as Coagulants. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, *48*, 451–456.

ANEXOS

Anexo I - Mapa de Portugal assinalado com os dados de ocorrência, as populações recolhidas pela Universidade de Évora e pelo Instituto Politécnico de Beja e com os ecótipos de *Cynara cardunculus* L. utilizados neste trabalho experimental



Anexo II – Valores médios e desvio-padrão da percentagem relativa de volume, apresentados por cada banda proteica, para cada agente coagulante ao longo da maturação

	Dia de maturação	Agente coagulante				valor p
		Cynara 1	Cynara 2	Cynara 3	Animal	
Banda A	1					
	7					
	14					
	21	2,69	2,57 ± 0,06	2,92 ± 0,24	2,65 ± 0,28	0,429
	35		±			
	49	2,72 ± 0,47	2,42 ± 0,52	2,83 ± 0,42	3,16 ± 0,59	0,319
	63	2,41 ^a ± 0,50	2,54 ^{ab} ± 0,47	2,91 ^{ab} ± 0,36	4,09 ^b ± 0,32	0,027
	valor p	0,570	0,692	0,986	0,021	
Banda B	1	7,81 ^A ± 1,13	7,14 ^A ± 0,14	7,84 ± 0,74	7,33 ^{AB} ± 0,33	0,485
	7	4,62 ^B ± 0,33	4,45 ^{AB} ± 0,74	4,45 ± 0,48	4,37 ^A ± 0,32	0,819
	14	7,46 ^A ± 0,49	6,95 ^A ± 0,70	7,42 ± 1,16	7,74 ^B ± 0,64	0,481
	21	5,89 ^{AB} ± 0,38	5,71 ^{AB} ± 0,78	6,22 ± 1,57	4,88 ^{AB} ± 0,80	0,185
	35	4,63 ^B ± 1,22	3,93 ^B ± 1,19	4,29 ± 1,02	4,183 ^A ± 0,55	0,750
	49	6,00 ^{abAB} ± 0,54	6,98 ^{abAB} ± 0,22	7,62 ^a ± 1,488	4,83 ^{bAB} ± 0,58	0,012
	63	7,05 ^{aAB} ± 0,41	6,56 ^{abAB} ± 0,50	6,60 ^{ab} ± 0,345	5,51 ^{bAB} ± 0,28	0,023
	valor p	0,001	0,002	0,006	0,002	
Banda C	1	4,60 ^{AB} ± 0,69	4,37 ± 0,29	4,53 ± 0,22	4,49 ^{AB} ± 0,31	0,097
	7	4,96 ^{AB} ± 0,69	5,38 ± 0,49	5,18 ± 0,41	4,70 ^{AB} ± 1,12	0,589
	14	4,98 ^{AB} ± 0,41	4,50 ± 0,72	5,26 ± 0,91	5,47 ^{AB} ± 0,62	0,248
	21	4,24 ^{AB} ± 0,58	4,69 ± 0,49	5,27 ± 0,26	5,46 ^{AB} ± 1,58	0,165

Banda D	35	3,87 ^A ± 0,49	4,37 ± 0,49	4,18 ± 0,40		0,292
	49			4,53	4,00 ^A ± 0,74	0,655
	63	6,11 ^{abB} ± 1,33	5,33 ^{ab} ± 0,55	4,95 ^a ± 0,37	7,26 ^{bB} ± 0,71	0,044
	valor p	0,009	0,042	0,045	0,029	
	1				5,06 ^A ± 0,35	
	7					
	14					
	21				3,23 ^B ± 0,49	
	35				4,00 ^{AB} ± 0,37	
	49				3,46 ^{AB} ± 0,32	0,588
Banda E	63	1,98 ± 0,10	1,97 ± 0,39	2,36 ± 0,54		
	valor p				0,011	
	1	1,63 ^{abA} ± 0,57	1,23 ^{a,A} ± 0,41	2,17 ^{abA} ± 0,89	4,21 ^{bAB} ± 0,38	0,021
	7	3,36 ^{AB} ± 0,18	3,44 ^{AB} ± 0,45	3,53 ^{AB} ± 0,13	3,22 ^{AB} ± 0,18	0,365
	14	2,91 ^{AB} ± 0,34	2,94 ^{AB} ± 0,55	3,57 ^{AB} ± 0,59	3,35 ^{AB} ± 0,63	0,270
	21	3,26 ^{abAB} ± 0,36	3,10 ^{abAB} ± 0,07	3,39 ^{aAB} ± 0,21	2,78 ^{b,A} ± 0,13	0,021
	35	3,75 ^{AB} ± 0,57	3,56 ^{AB} ± 0,48	3,68 ^{AB} ± 0,31	3,26 ^{AB} ± 0,26	0,337
	49	4,10 ^B ± 0,27	4,41 ^B ± 0,42	4,756 ^B ± 0,63	2,644 ^A ± 0,06	0,076
	63	4,31 ^{abB} ± 0,31	3,72 ^{aAB} ± 0,35	4,0979 ^{abB} ± 0,33	4,493 ^{bB} ± 0,33	0,035
	valor p	0,001	0,003	0,005	0,004	
Banda F	1	2,02 ^{abA} ± 0,41	1,77 ^{abA} ± 0,13	2,10 ^{aA} ± 0,34	3,40 ^{bAB} ± 0,51	0,026
	7	2,36 ^{AB} ± 0,14	2,32 ^{AB} ± 0,19	2,22 ^A ± 0,18	2,18 ^A ± 0,22	0,518
	14	2,32 ^{AB} ± 0,18	2,45 ^{AB} ± 0,41	2,42 ^{AB} ± 0,22	1,98 ^A ± 0,12	0,251
	21	2,55 ^{AB} ± 0,30	2,57 ^{AB} ± 0,09	2,72 ^{AB} ± 0,35	2,18 ^{AB} ± 0,31	0,241
	35	3,08 ^{AB} ± 0,53	2,85 ^{AB} ± 0,44	3,46 ^{AB} ± 0,14	3,27 ^{AB} ± 0,48	0,248

Banda G	49	3,53 ^{ab} ± 0,36	3,95 ^B ± 0,19	3,70 ^B ± 0,37	4,7268 ^{ab} ± 0,57	0,024
	63	3,18 ^{AB} ± 0,14	2,95 ^{AB} ± 0,10	3,21 ^{AB} ± 0,43	3,51 ^{AB} ± 0,28	0,080
	valor p	0,002	0,001	0,001	0,003	
	1					
	7	1,59 ± 0,41	1,48 ^A ± 0,42	1,66 ± 0,15		0,735
	14					
	21	2,23	2,03 ^{AB} ± 0,22	1,85 ± 0,27		0,301
	35	2,79	2,49 ^{AB} ± 0,55	3,07 ± 0,45		0,227
	49	2,98 ± 0,46	3,28 ^B ± 0,24	3,13 ± 0,27		0,33
	63					
Banda H	valor p	0,061	0,014	0,020		
	1	32,73 ^{abA} ± 1,01	33,16 ^{abA} ± 0,90	31,74 ^{aA} ± 1,45	36,510 ^b ± 0,96	0,020
	7	25,24 ^{aAB} ± 1,95	25,72 ^{abAB} ± 1,18	25,50 ^{abAB} ± 0,54	38,05 ^{bA} ± 0,37	0,027
	14	22,15 ^{AB} ± 1,12	22,01 ^{AB} ± 1,41	22,66 ^{AB} ± 1,65	33,27 ^{AB} ± 0,92	0,037
	21	21,17 ^B ± 1,68	20,87 ^{AB} ± 0,68	20,98 ^B ± 1,53	34,28 ^{AB} ± 0,86	0,036
	35	22,54 ^{aAB} ± 1,17	21,92 ^{abAB} ± 3,13	23,80 ^{abAB} ± 1,87	30,288 ^{bB} ± 2,80	0,026
	49	23,27 ^{abAB} ± 0,84	20,640 ^{ab} ± 0,40	21,76 ^{abAB} ± 1,63	34,02 ^{bAB} ± 2,43	0,007
	63	19,70 ^{ab} ± 1,92	21,31 ^{abAB} ± 0,96	20,22 ^{ab} ± 0,53	31,05 ^{bB} ± 1,14	0,017
	valor p	0,002	0,008	0,002	0,001	
	1	40,233 ^A ± 3,51	42,85 ^A ± 0,79	37,75 ^A ± 2,39	41,53 ^A ± 0,92	0,078
Banda I	7	41,441 ^A ± 1,50	42,72 ^A ± 1,65	43,16 ^{AC} ± 1,58	43,66 ^A ± 1,12	0,214
	14	30,56 ^{AB} ± 0,28	32,71 ^{AB} ± 0,93	28,33 ^{ABC} ± 2,27	32,68 ^{AB} ± 1,18	0,012
	21	23,76 ^{abAB} ± 1,26	26,53 ^{abAB} ± 1,43	21,92 ^{aABC} ± 0,71	30,32 ^{bAB} ± 0,69	0,004
	35	19,76 ^{abAB} ± 1,03	21,34 ^{abAB} ± 1,48	19,01 ^{aAB} ± 1,88	23,31 ^{bB} ± 0,84	0,017
	49	19,43 ^{abAB} ± 0,65	20,00 ^{abB} ± 0,98	19,06 ^{aAB} ± 1,59	25,66 ^{bAB} ± 2,11	0,030

Banda J	63	17,80 ^{abB} ± 0,27	19,28 ^{abB} ± 1,21	17,38 ^{ab} ± 0,40	24,15 ^{bB} ± 0,77	0,008	
	valor p	0,000	0,000	0,000	0,000		
	1	5,59 ^{abA} ± 0,52	4,30 ^{a, A} ± 0,59	6,39 ^{bA} ± 0,96		0,018	
	7	8,01 ^{AB} ± 0,85	6,45 ^A ± 0,38	8,38 ^{AB} ± 0,50		0,024	
	14	19,55 ^{abAB} ± 1,37	18,32 ^{abAB} ± 0,83	20,90 ^{aAB} ± 0,82	17,00 ^b ± 1,26	0,014	
	21	28,25 ^{abB} ± 2,21	25,16 ^{aAB} ± 0,84	29,44 ^{bA} ± 1,41		0,026	
	35	30,73 ^B ± 3,38	30,36 ^B ± 1,43	31,26 ^B ± 0,56		0,492	
	49						
	63	26,77 ^{AB} ± 1,09	25,79 ^B ± 0,87	27,58 ^{AB} ± 0,86		0,069	
	valor p	0,001	0,001	0,001			
Banda K	1	6,20 ^A ± 0,72	5,79 ^A ± 0,64	7,60 ^A ± 1,49		0,211	
	7	9,22 ^C ± 0,21	8,79 ^{AB} ± 0,74	6,75 ^A ± 1,06		0,031	
	14	10,06 ^{ABC} ± 0,44	10,42 ^{AB} ± 0,47	9,45 ^{AB} ± 0,71		0,146	
	21	10,25 ^{ABC} ± 0,47	10,14 ^{AB} ± 1,54	8,88 ^{AB} ± 0,73		0,092	
	35	11,82 ^{BC} ± 0,47	10,43 ^{AB} ± 0,92	9,73 ^{AB} ± 1,33		0,05	
	49						
	63	13,15 ^B ± 0,63	12,81 ^B ± 0,94	13,98 ^B ± 0,68		0,116	
	valor p	0,001	0,002	0,005			
	Banda L	1	11,79 ^A ± 1,14	10,09 ^A ± 1,08	13,98 ^A ± 2,26		0,049
		7	17,23 ^{aAC} ± 0,70	15,24 ^{abAC} ± 1,03	15,13 ^{abAC} ± 1,06	6,65 ^{bA} ± 0,66	0,008
14		29,61 ^{aAB} ± 0,98	28,74 ^{abABC} ± 0,69	30,35 ^{aABC} ± 1,36	17,00 ^{bAB} ± 1,26	0,012	
21		38,50 ^{aBC} ± 2,32	35,30 ^{abABC} ± 0,70	38,32 ^{aABC} ± 1,01	21,81 ^{bAB} ± 0,20	0,005	
35		42,55 ^{ab} ± 3,00	40,79 ^{abB} ± 1,64	40,98 ^{abB} ± 1,87	29,58 ^{bB} ± 3,39	0,023	
49		40,01 ^{aABC} ± 1,59	39,54 ^{abBC} ± 1,31	38,35 ^{abBC} ± 4,49	21,64 ^{bAB} ± 3,88	0,033	

63	29,45 ^{abB} ± 0,46	29,02 ^{abABC} ± 0,54	31,041 ^{aABC} ± 0,32	24,709 ^{bB} ± 1,37	0,005
valor p	0,001	0,000	0,001	0,001	

Letras minúsculas (^{a, b, c}): Diferenças significativas ($p < 0,05$) por linha, ou seja, entre agentes coagulantes

Letras maiúsculas (^{A, B, C}): Diferenças significativas ($p < 0,05$) por coluna, ou seja, entre dias de maturação