

# **Efeito da formulação e da conservação nas propriedades de extratos de flor de cardo para fabrico de queijo**

**Andreia Filipa Morais Penas**

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em  
**Engenharia Alimentar**

Orientador: Professor Doutor António Pedro Louro Martins

**Júri:**

Presidente: Doutora Margarida Gomes Moldão Martins, Professora Associada com Agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Vogais:

Doutora Maria Isabel Nunes Januário, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Doutor António Pedro Louro Martins, Professor Auxiliar Convidado do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

2018

## Agradecimentos

Na sequência da elaboração desta dissertação, não poderia deixar de agradecer a todas as pessoas que foram importantes para mim, me ajudaram e permitiram que isso fosse possível.

Em primeiro lugar, agradeço ao meu orientador, professor da cadeira de Laticínios, Doutor António Pedro Louro Martins, por ter sugerido este tema que vem de encontro aos meus interesses por esta área. Obrigada por todo o apoio durante a elaboração dos trabalhos práticos e também da parte escrita. Mesmo sendo uma pessoa ocupada, nunca deixou as suas duas alunas sem orientação.

Aos meus pais, por me terem apoiado nas minhas decisões ao longo de todo o percurso académico, apesar de por vezes não terem concordado com elas. Espero que depois possamos todos ver algum sucesso.

Obrigada Sandra, por teres estado sempre disponível para nos ajudar nas atividades laboratoriais e me teres ensinado muito, tanto a nível prático como psicológico (por vezes é difícil lidar com as coisas no laboratório), foste praticamente uma segunda orientadora, mas como seria ilegal o teu nome na capa, tens aqui o teu louvor. A Dra. Maria João, a Eng. Paula e as restantes investigadoras, também estiveram sempre lá para ajudar na microbiologia e como tal, muito obrigada. A Margarida também foi uma ótima colega, sempre pronta a alertar-me e a ajudar em certas situações, agradeço porque tive menos distrações graças a ela.

Sem os amigos também teria sido tudo mais complicado, como tal quero agradecer à Páscoa, por ter sempre aturado, ao longo destes mais de 10 anos de amizade, todos os meus stresses, tanto com a faculdade, como com o resto. Os primos serão sempre mais do que amigos, e sem eles não seríamos nada, obrigada a todos por estarem sempre presentes e serem um apoio constante, Tânia, Cláudia, Susi, Riri, Luís, Rita, Carlos, Pedro, vocês sabem! Também aos tios que sempre estiveram lá para me dar comida, bebida e café para acordar!

Daniel, obrigada por teres entrado na minha vida nesta altura, foi sempre ótimo ter o teu apoio e companhia para estudar e escrever. Sempre foste uma motivação extra e estiveste sempre disponível para me ajudar e dar um abraço nos momentos mais complicados, sem o teu apoio de certeza que as coisas não fluiriam da mesma forma.

Agradeço a todos os que estiveram presentes para me ajudar e apoiar ao longo deste percurso e durante a minha vida. Apesar de todas as dificuldades inerentes à elaboração

deste trabalho, sem o vosso apoio as coisas teriam sido bem piores. Fico muito contente por nunca ter estado sozinha.

Andreia

Este trabalho foi realizado com o contributo do projeto “ValBioTecCynara – Valorização económica do Cardo (*Cynara cardunculus*): estudo da sua variabilidade natural e suas aplicações biotecnológicas” (ALT20-03-0145-FEDER-000038), financiado pelo Programa Operacional Regional do Alentejo (Alentejo 2020), através do Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER).

## Resumo

O cardo (*Cynara cardunculus*), é uma planta muito valorizada, pois desde tempos muito antigos, é utilizada como coagulante no fabrico de queijos tradicionais, alguns dos quais beneficiam da designação DOP. Infelizmente, devido à sua carência e heterogeneidade inerente, não existe ainda a possibilidade da extrapolação do fabrico tradicional onde a planta é utilizada, para uma escala industrial. Com este trabalho, pretendeu-se testar a capacidade de conservação de quatro diferentes formulações de extratos de cardo, obtidas com soluções extratantes diferentes (NaCl 5%, NaCl 20%, tampão acetato pH 5,5 e tampão citrato pH 3), ao longo de 4,5 meses, com o objetivo de encontrar uma formulação capaz de conservar as propriedades das enzimas coagulantes da flor do cardo. Verificou-se, de um modo geral, que a solução de NaCl 20% foi a que induziu mais perdas de atividade coagulante. A solução obtida com a solução de NaCl 5% foi a que apresentou melhores resultados em termos tecnológicos, com firmeza da coalhada superior e a solução de tampão citrato teve um comportamento mais estável a nível tecnológico e foi a que manteve menor contaminação microbiológica, com baixas contagens de microrganismos, apesar de que, de modo geral, a contaminação microbiana se revelar baixa em todas as formulações analisadas.

Palavras-chave: *Cynara cardunculus*, flor de cardo, enzimas coagulantes, conservação de extratos, fabrico de queijo

## Abstract

The thistle flower (*Cynara cardunculus*), is a highly valued plant, since ancient times, it is used as a coagulant in the manufacture of traditional cheeses, some of which benefit from the PDO designation. Unfortunately, due to its inherent lack and heterogeneity, there still is no possibility of extrapolation of the traditional manufacture where the plant is used, for an industrial scale. The aim of this work was to test the storage capacity of four different formulations of thistle flower extracts obtained with different extractive solutions (5% NaCl, 20% NaCl, acetate buffer pH 5.5 and citrate buffer pH 3) over 4,5 months, in order to find a formulation able to preserve the properties of the thistle flower's coagulant enzymes. It was generally found that the 20% NaCl solution was the one that induced more losses of coagulant activity. The solution obtained with the 5% NaCl solution presented the best results in technological terms, with greater firmness of curd and the citrate buffer showed a more stable behavior at a technological level and was the one that had less microbiological contamination, with a low microorganism count, although, in general point of view, the microbial contamination was low in all formulations analyzed.

Key-words: *Cynara cardunculus*, thistle flower, coagulant enzymes, extract preservation, cheese making

Índice

|   |    |
|---|----|
| 1. Introdução.....  | 6  |
| 2. Revisão bibliográfica.....   | 8  |
| 2.1. O Leite.....   | 8  |
| 2.1.1. As caseínas.....   | 10 |
| 2.1.2. A micela de caseína .....  | 11 |
| 2.2. O Cardo.....   | 14 |
| 2.1.2. O cardo e suas utilizações.....  | 14 |
| 2.2.2. O cardo na indústria queijeira .....   | 15 |
| 2.2.3. As enzimas coagulantes de <i>C. cardunculus</i> .....  | 17 |
| 2.2.4. A utilização do cardo vs. outros coagulantes no fabrico de queijo .....                                    | 19 |
| 2.2.5. A ação das proteases aspárticas de <i>C. cardunculus</i> no fabrico de queijo vs. outros coagulantes ..... | 20 |
| 2.2.6. Conservação de extratos de cardo .....   | 23 |
| 3. Trabalho experimental .....  | 27 |
| 3.1. Material e métodos .....   | 27 |
| 3.1.1. Leite .....  | 27 |
| 3.1.2. Cardo .....  | 28 |
| 3.1.3. Preparação das amostras e extração .....   | 28 |
| 3.1.4. Medição da atividade coagulante.....   | 29 |
| 3.1.5. Propriedades tecnológicas.....   | 29 |
| 3.1.6. Caracterização microbiológica dos extratos de flor de cardo .....  | 30 |
| 4. Resultados e discussão.....  | 32 |
| 4.1. Propriedades tecnológicas.....   | 32 |
| 4.1.1. Atividade coagulante .....   | 32 |
| 4.1.2. Medidas obtidas a partir do Optigraph® .....   | 34 |
| 4.1.3. Conclusões parciais.....   | 41 |
| 4.2. Caracterização microbiológica dos extratos de flor de cardo .....  | 42 |

## 1 – Introdução

|   |    |
|---|----|
| 4.2.1. Conclusões parciais.....             | 46 |
| 4.3. Conclusões gerais .....                | 47 |
| 4.4. Sugestões para trabalhos futuros ..... | 47 |
| 5. Referências Bibliográficas .....         | 48 |

## Lista de tabelas

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1 - Composição média do leite de ovelha e vaca (resultados expressos em %).<br>Adaptado de: Park <i>et al.</i> , 2006. ....  | 8  |
| Tabela 2 - Composição média em matérias azotadas do leite de ovelha e vaca (resultados expressos em % de azoto total) (Fonte: Alves, 2003).....   | 9  |
| Tabela 3 - Tabela-resumo da ANOVA, testando a influência das variáveis independentes Tempo e Solução em cada uma das variáveis dependentes, relacionadas com as propriedades tecnológicas.....                        | 32 |
| Tabela 4 - Valores médios da atividade coagulante para cada solução ao longo do tempo (IUMC.mL <sup>-1</sup> ).....   | 33 |
| Tabela 5 - Valores médios do tempo de início da floculação (R), em segundos, para cada solução, ao longo do tempo. ....   | 34 |
| Tabela 6 - Valores médios de AR (V) para cada formulação ao longo do tempo. ....  | 35 |
| Tabela 7 - Valores médios de A2R (V) para as diferentes formulações ao longo do tempo..   | 36 |
| Tabela 8 - Valores médios de A <sub>20</sub> (V) para cada formulação ao longo do tempo. ....   | 37 |
| Tabela 9 - Valores médios de A <sub>40</sub> (V) para cada solução nos quatro tempos testados. ....   | 39 |
| Tabela 10 – Valores médios de OK20, para cada formulação ao longo do tempo.....   | 40 |
| Tabela 11 - Tabela-resumo da ANOVA, testando a influência das variáveis independentes Tempo e Solução para cada uma das variáveis relacionadas com a caracterização microbiológica dos extratos de flor de cardo..... | 42 |
| Tabela 12 - Valores médios do Log do número de mesófilos totais presentes (log ufc.mL <sup>-1</sup> ) em cada formulação ao longo do tempo.....   | 43 |
| Tabela 13 - Valores médios do Log do número de fungos presentes (log ufc.mL <sup>-1</sup> ) em cada formulação ao longo do tempo. ....  | 44 |
| Tabela 14 - Valores médios do Log do número de bolores presentes (log ufc.mL <sup>-1</sup> ), para cada solução nos quatro tempos testados.....   | 45 |
| Tabela 15 - Valores médios do Log do número de leveduras presentes (log ufc.mL <sup>-1</sup> ), para cada solução nos quatro tempos testados.....   | 45 |

## Lista de figuras

|  |    |
|--|----|
| Figura 1 - Estrutura da micela de caseína segundo Schmidt (Fonte: Walstra et al., 1999). ...   | 12 |
| Figura 2 - <i>Cynara carduculus</i> . A – Vista geral das inflorescências. B – Inflorescência. C –<br>Inserção das folhas no caule (Fonte: Flora On).....          | 14 |
| Figura 3 – Evolução dos valores médios da atividade coagulante para cada solução ao longo<br>do tempo. ....  | 33 |
| Figura 4 - Evolução dos valores médios do tempo de início da floculação (R), em segundos,<br>ao longo do tempo de conservação.....                                 | 34 |
| Figura 5 – Valores médios de AR (V) para cada uma das formulações, ao longo do tempo.  | 36 |
| Figura 6 - Valores médios de A2R (V) ao longo do tempo, para cada uma das formulações.<br>.....  | 37 |
| Figura 7 – Valores médios de A <sub>20</sub> (V) para cada formulação ao longo do tempo. ....  | 38 |
| Figura 8 - Valores médios de A <sub>40</sub> (V) para cada formulação ao longo do tempo.....   | 39 |
| Figura 9 - Valores médios de OK20 para cada formulação ao longo do tempo. ....   | 40 |
| Figura 10 - Evolução ao longo do tempo dos valores médios do Log do número de mesófilos<br>totais (log ufc.mL <sup>-1</sup> ) para as diferentes formulações. .... | 43 |
| Figura 11 – Evolução ao longo do tempo dos valores médios do Log do número de fungos<br>presentes (log ufc.mL <sup>-1</sup> ) para cada formulação.....            | 44 |
| Figura 12 – Gráfico com os valores médios do Log do número de bolores presentes (log<br>ufc.mL <sup>-1</sup> ), para cada solução nos quatro tempos testados.....  | 45 |
| Figura 13 – Gráfico com os valores médios do Log do número de fungos presentes (log<br>ufc.mL <sup>-1</sup> ), para cada solução nos quatro tempos testados.....   | 46 |

## 1 – Introdução

### Lista de abreviaturas

A20 – Intensidade do sinal ótico após 20 minutos desde o início do ensaio

A2R – Intensidade do sinal ótico, em volt, quando decorreu um tempo igual ao triplo do tempo de coagulação de coagulação

A40 – Intensidade do sinal ótico após 40 minutos desde o início do ensaio

AC – Atividade coagulante

AR – Intensidade do sinal ótico, em volt, quando decorreu um tempo igual ao dobro do tempo de coagulação de coagulação

BSE – Encefalopatia Espongiforme Bovina

DOP – Denominação de Origem Protegida

EC – Enzyme Commission Numbers

*et al.* – “e outros”

Fen – Fenilalanina

*i. e. – id est* (isto é)

IDF – International Dairy Federation

IGP – Indicação Geográfica Protegida

INIAV – Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária

ISO – International Organization for Standardization

IUMC – International Milk-Clotting Units

Met – Metionina

OK20 – Tempo decorrido, a partir do início da coagulação, até se obter uma consistência padrão

PCA – Plate Count Agar

R – Tempo de coagulação

Sol. T. Acetato – Solução de tampão acetato

Sol. T. Citrato – Solução de tampão citrato

ufc – Unidades Formadoras de colónias

VRBGA – Violet Red Bile Glucose Agar

## 1. Introdução

O cardo (*Cynara cardunculus* L.) é uma planta muito valorizada pelas suas diferentes utilizações, principalmente no sector alimentar, medicina e mais recentemente por ser uma fonte de biocombustíveis. Em Portugal e também em Espanha, diversos queijos tradicionais com Denominação de Origem Protegida (DOP) têm nas suas formulações a utilização de extratos aquosos desta planta, havendo uma obrigatoriedade no seu uso. Como é um fator determinante para a qualidade dos queijos, tem sido cada vez mais estudado, visto que lhes confere características particulares.

O fabrico de queijo depende da combinação da Arte, Tradição, Tecnologia e Ciência, mas como o processo não ocorre sempre do mesmo modo, é importante que exista um acompanhamento constante. O uso de coagulantes de forma empírica pode reduzir a aceitabilidade, qualidade e homogeneidade dos queijos tradicionais fabricados desse modo. Sendo os queijos um dos produtos lácteos mais apreciados, a padronização do uso do cardo como coagulante será, assim, um aspeto a ter em conta de modo a aumentar a confiança nos produtos.

Existem diversas preparações comerciais que disponibilizam enzimas ou misturas de enzimas purificadas para fabrico de queijo, de origem animal, de origem microbiana ou de origem animal obtidas a partir de organismos geneticamente modificados. A utilização destas preparações, na forma líquida ou em pó, com atividade coagulante padronizada, permite aos produtores de queijo a planificação dos seus fabricos e a replicação das mesmas tecnologias de fabrico de forma a poderem apresentar produtos com alguma homogeneidade, isto permite a fidelização do consumidor na escolha dos produtos.

No entanto, para os extratos de flor de cardo não existem ainda formulações *standard* purificadas, pelo menos com a garantia necessária para poderem ser utilizadas em queijos DOP nacionais. Por isso, os produtores de queijo continuam a utilizar o cardo de forma tradicional, sem outra medida de padronização que não seja a quantificação da quantidade da flor. Esta apresenta composição e características muito variáveis e sem processos padronizados de extração, o que contribui para a frequente falta de homogeneidade quanto às características dos queijos.

O aumento do volume de produção de queijo que tem ocorrido ao longo dos últimos anos aumenta a necessidade de dispor de soluções padronizadas deste coagulante de origem vegetal e que, para além disso, apresentem boas condições de conservação da atividade coagulante. Têm sido testadas formulações alternativas aos extratos aquosos de cardo, em

## 1 – Introdução

pó e soluções recombinantes, no entanto estas não resolvem alguns problemas associados à utilização desta planta como coagulante.

Deste modo, o objetivo deste trabalho será integrar estudos sobre a ação do cardo como agente coagulante e procurar estudar diferentes formas de preparação de extratos desta planta, que tenham a capacidade de manter a sua integridade e capacidades ao longo do tempo. Começa-se por elaborar uma breve revisão bibliográfica acerca da matéria-prima, o leite, e do cardo como coagulante e suas formas de extração e conservação, a que se segue a descrição do trabalho experimental efetuado.

Toda a atividade laboratorial foi desenvolvida na Unidade de Tecnologia e Inovação do INIAV - Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária.

## 2. Revisão bibliográfica

### 2.1. O Leite

O leite foi definido, em 1909 pelo Congresso Internacional da Repressão das Fraudes, como o produto integral da ordenha total e ininterrupta de uma fêmea leiteira em boas condições de saúde, bem alimentada e não fatigada, devendo ser recolhido com asseio e não conter colostro (Luquet, 1985). É um meio multifásico, em que a água é o componente principal, onde se encontram dissolvidos, fundamentalmente, lactose e sais minerais, e dispersos elementos de natureza lipídica (glóbulos de gordura) e de natureza proteica (micelas de caseína) (Amiot, 1991). Trata-se de um líquido branco, opaco, com sabor ligeiramente adocicado e odor suave, mais viscoso que a água e composição variável de acordo com a espécie, raça, indivíduo, com a alimentação e o tempo de gestação, entre outros fatores (Gomes, 2012).

Tabela 1 - Composição média do leite de ovelha e vaca (resultados expressos em %).

Adaptado de: Park *et al.*, 2006.

| <i>Composição</i>                               | <i>Ovelha</i> | <i>Vaca</i> |
|---|---------------|-------------|
| <i>Água (%)</i>                                 | 80,1          | 87,4        |
| <i>Gordura (%)</i>                              | 7,9           | 3,6         |
| <i>Resíduo seco isento de matéria gorda (%)</i> | 12,0          | 9,0         |
| <i>Lactose (%)</i>                              | 4,9           | 4,7         |
| <i>Proteína (%)</i>                             | 6,2           | 3,2         |
| <i>Caseína (%)</i>                              | 4,2           | 2,6         |
| <i>Albumina, globulina (%)</i>                  | 1,0           | 0,6         |
| <i>Azoto não proteico (%)</i>                   | 0,8           | 0,2         |
| <i>Cinza (%)</i>                                | 0,9           | 0,7         |
| <i>Calorias/100 mL</i>                          | 105           | 69          |

A fração azotada do leite é a que se destaca no processo de fabrico de queijo, influenciando todo o processo. Como tal, evidencia-se, em seguida, a sua composição detalhada.

Tabela 2 - Composição média em matérias azotadas do leite de ovelha e vaca (resultados expressos em % de azoto total) (Fonte: Alves, 2003).

| <i>Azoto total</i>   | <i>Ovelha</i> | <i>Vaca</i> |
|--|---------------|-------------|
| <i>Proteínas (%)</i>   | 97,6          | 95,0        |
| <i>Caseína Isoelétrica (insolúvel) (%)</i>                   | 80,0          | 78,0        |
| <i>Caseína <math>\alpha_{s1}</math> (%)</i>                  | 15,5          | 36,0        |
| <i>Caseína <math>\alpha_{s2}</math> (%)</i>                  | 14,7          | 10,0        |
| <i>Caseína <math>\beta</math> (%)</i>                        | 47,1          | 34,0        |
| <i>Caseína K (%)</i>   | 7,3           | 13,0        |
| <i>Caseína <math>\gamma_1, \gamma_2, \gamma_3</math> (%)</i> | 15,4          | 7,0         |
| <i>Proteínas do soro (solúvel) (%)</i>                       | 17,6          | 17,0        |
| <i>Albuminas</i>   |               |             |
| <i><math>\beta</math>-lactoglobulina (%)</i>                 | 51,4          | 50,0        |
| <i><math>\alpha</math>-lactoalbumina + serumalbumina (%)</i> | 25,1          | 27,0        |
| <i>Imunoglobulinas (%)</i>                                   | 17,9          | 12,0        |
| <i>Proteose-peptona (%)</i>                                  | 5,6           | 10,0        |
| <i>Azoto não proteico (%)</i>                                | 2,4           | 5,0         |

### 2.1.1. As caseínas

As proteínas são componentes essenciais de todas as células vivas e têm uma particular importância no leite e produtos lácteos. O leite de vaca apresenta um teor médio de 3,2% de proteína, das quais aproximadamente 80% são caseínas (Amiot, 1991).

As propriedades das caseínas diferem da maioria das proteínas. São hidrofóbicas, com cargas relativamente elevadas devido principalmente à presença de grupos fosfato, têm uma grande proporção de prolina e poucos resíduos de cisteína, apresentando uma grande quantidade de hélices- $\alpha$  de pequena dimensão e pouca estrutura terciária (Walstra *et al.*, 1999). Precipitam a pH 4,6, distinguindo-se assim das proteínas do soro que apenas precipitam se forem desnaturadas pela ação do calor ou de outros tratamentos (Amiot, 1991).

De acordo com diferenças no peso molecular, evidencia-se a heterogeneidade das caseínas, distinguindo-se cinco tipos: a caseína  $\alpha_{s1}$  (peso molecular 23.600 D), a caseína  $\alpha_{s2}$  (peso molecular 25.200 D), a caseína  $\beta$  (peso molecular 23.983 D), a caseína K (peso molecular 19.550 D) e a caseína  $\gamma$  (peso molecular 20.500 D) (Amiot, 1991, Walstra *et al.*, 1999). As caseínas  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$  e K são sintetizadas no epitélio secretor mamário (Barth & Schlimme, 1989) enquanto a caseína  $\gamma$  é um produto de degradação da caseína  $\beta$  (Walstra *et al.*, 1999).

As caseínas apresentam um conjunto de características transversais a todas: a presença de fósforo sob a forma de agrupamentos fosfoseril, a sua riqueza em certos aminoácidos (ácido glutâmico, leucina, prolina) e a forte proporção de resíduos apolares. Distinguem-se entre si por apresentarem diferente número de agrupamentos fosfoseril, pela presença ou ausência de cisteína, pela presença, ou não, de glúcidos, por serem mais ou menos hidrofóbicas e pelos teores em certos aminoácidos, como prolina, treonina e tirosina, por exemplo (Eck, 1987).

As caseínas  $\alpha$ , sendo as mais ricas em fósforo, têm as maiores cargas (Amiot, 1991, Walstra *et al.*, 1999). Estas são ricas em grupos ácido livres e o seu ponto isoelétrico é o mais baixo entre as caseínas (pH 4,1). Das caseínas  $\alpha_{s1}$  são conhecidas 5 variantes genéticas, que se diferenciam pelo número de átomos de fósforo e resíduos de aminoácidos por molécula, são formadas por uma cadeia peptídica de 199 a 191 resíduos de aminoácidos, na variante mais pequena. Estas caseínas apresentam uma região hidrofílica onde se localizam a maior parte dos grupos ácidos e restos hidrofóbicos, sendo as outras regiões mais ou menos hidrofóbicas, apresentando uma hidrofobicidade regular. Por sua vez, as caseínas  $\alpha_{s2}$  são formadas por uma cadeia de 207 resíduos de aminoácidos, apresentam pouca prolina e baixa hidrofobicidade (Alonso, 2001).

As caseínas  $\beta$  são formadas por uma cadeia polipeptídica de 207 resíduos de aminoácidos, com alta percentagem de prolina (Alonso, 2001). Apresentam solubilidade a baixas temperaturas (2°C), têm menos fósforo e mais enxofre que as caseínas  $\alpha$  e o seu ponto isoelétrico é a pH 4,9 (Amiot, 1991). São mais hidrofóbicas que a caseína  $\alpha_{s1}$  e menos ácidas, com cargas uniformes ao longo da cadeia, apresentam uma região N-terminal mais hidrófila e ácida e uma região C-terminal mais hidrófoba. As caseínas  $\beta$  apenas são sensíveis ao cálcio a temperaturas iguais ou superiores a 20°C, permanecendo solúveis na presença de cálcio a temperaturas inferiores a 10°C (Alonso, 2001).

A presença de agrupamentos fosfoseril, confere às caseínas uma grande afinidade para o cálcio, sendo maior, quanto maior o grau de fosforilação. Este é superior nas caseínas  $\alpha$ , um pouco mais baixo nas caseínas  $\beta$  e menor para as caseínas K. Nas caseínas  $\alpha_s$  e  $\beta$ , muito fosforiladas observam-se agrupamentos fosfoseril, que resultam em cadeias peptídicas com zonas ácidas e hidrofóbicas muito marcadas; estas aglomerações de cargas negativas conferem o seu poder de fixação do cálcio (Eck, 1987).

Tanto as caseínas  $\alpha$  como as  $\beta$  são, assim, sensíveis ao cálcio. As caseínas K têm um papel estabilizante da micela de caseína, pois não são sensíveis a este íão. Estas são solúveis na presença de uma elevada concentração de  $\text{Ca}^{2+}$ , isto é, quando se adiciona cálcio a uma suspensão de caseína, dá-se a rutura do complexo  $\alpha_s$ -K e as caseínas  $\alpha$  e  $\beta$  tendem a precipitar, enquanto as caseínas K permanecem em solução (Amiot, 1991).

A caseína K diferencia-se das restantes caseínas pela sua grande sensibilidade à ação de enzimas coagulantes, fraca afinidade para o cálcio e presença de glúcidos, que é variável, originando as sete formas diferentes da caseína K ( $K_1$  a  $K_7$ ) (Eck, 1987). É ao nível da ligação Fenilalanina 105-Metionina 106 (Fen 105-Met 106) que a caseína K apresenta a maior sensibilidade à atividade das enzimas coagulantes; esta ação dá origem a uma agregação micelar por aprisionamento da fase aquosa, traduzindo-se no início da coagulação do leite (Alonso, 2001, Silva & Malcata, 2005, Broome *et al.*, 2006, Galán *et al.*, 2008, Jacob *et al.*, 2011).

### 2.1.2. A micela de caseína

Devido à presença de muitos grupos hidrofóbicos expostos, as moléculas formam ligações hidrofóbicas, promovendo-se uma grande associação entre as diferentes caseínas, formando-se as micelas de caseína (Walstra *et al.*, 1999).

## 2 – Revisão Bibliográfica

A micela de caseína é uma partícula esférica, com diâmetros que vão dos 30 nm aos 300 nm, formada pela associação das caseínas ( $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$  e K), com alguns fragmentos peptídicos (caseínas  $\gamma$ ) oriundas da proteólise da caseína  $\beta$  e componentes salinos, principalmente cálcio e fosfato. As suas propriedades conferem-lhe uma grande estabilidade em meio aquoso (Eck, 1987, Amiot, 1991). A proporção das caseínas no leite de vaca é, geralmente, 1K : 3 $\beta$  : 5 $\alpha$ , sendo que a proporção da caseína K varia inversamente com o tamanho da micela de caseína, enquanto a caseína  $\beta$  se encontra em proporcionalidade direta com o mesmo (Amiot, 1991).

Assume-se que a micela de caseína é formada por submicelas, de cerca de 14nm, agregadas entre si por pontes de fosfato de cálcio. As submicelas são maioritariamente de dois tipos, as formadas por caseínas  $\alpha_s$  e  $\beta$  e as outras de  $\alpha_s$  e K, as quais se vão agregando até formarem uma micela, onde as caseínas K ficam localizadas na periferia. Consequentemente, as cadeiras moleculares da extremidade C-terminal da caseína K projetam-se a partir da superfície da micela, formando uma camada pilosa que impede, por repulsão eletrostática, qualquer agregação adicional de submicelas. Esta camada também é responsável pela estabilidade das micelas contra a floculação (Walstra, 1999).

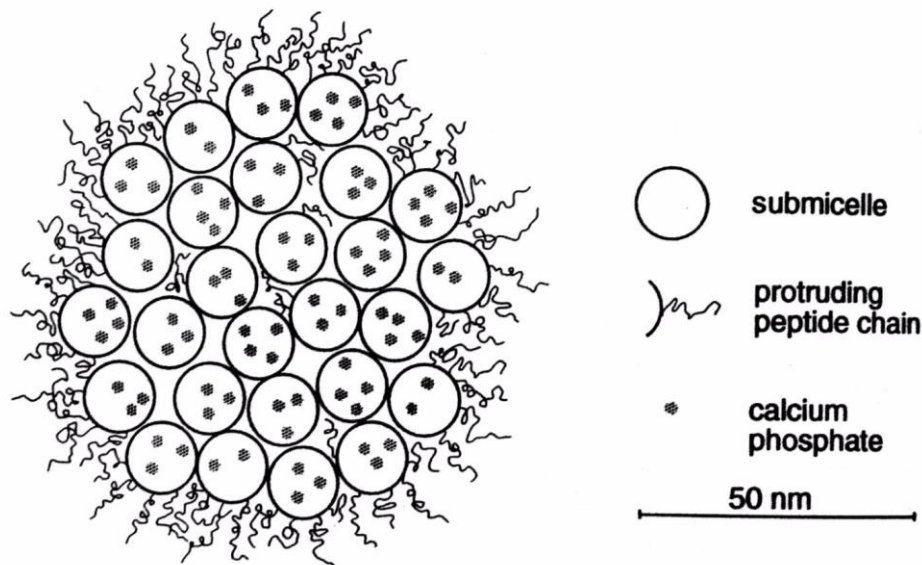


Figura 1 - Estrutura da micela de caseína segundo Schmidt (Fonte: Walstra *et al.*, 1999).

As micelas de caseína encontram-se em suspensão na fase aquosa do leite, onde se encontram dissolvidos a lactose e os sais minerais. Diversas observações demonstraram que as micelas de caseína não são estruturas fixas. O cálcio solúvel encontra-se em equilíbrio com o da micela, no entanto, diversos fatores, como a temperatura, o pH, a força iónica, atividade da água e os teores de fosfato e citrato solúveis, podem afetar esse equilíbrio, levando a mudanças na distribuição de tamanho e proporção de micelas livres (Walstra,

1999). Quando há um aumento da temperatura e do pH e aumenta o teor de cálcio iónico, dá-se um aumento dos teores de cálcio e de fosfato na micela e, conseqüentemente, um aumento das suas dimensões; por outro lado, o inverso ocorre em casos de diminuição da temperatura, acidificação, adição de água, de cloreto de sódio, de citrato ou de outro agente quelante (Eck, 1987, Alves, 2003).

O carácter ácido das micelas de caseína confere ao pH do leite um grande número de cargas negativas. É devido às repulsões eletrostáticas que ocorrem, que as micelas não se aproximam e não se agregam, mantendo-se em dispersão entre as mesmas, apesar da curta distância entre si. Para além do potencial electrocinético, as micelas são capazes de fixar água em grande quantidade, parte desta água tem o papel de estabilizar e proteger a micela, pois encontra-se imobilizada à superfície (Eck, 1987). Outro fator importante para a estabilidade coloidal é a repulsão estérica que ocorre devido à densidade da “cabeleira” das micelas, ligada à caseína K. Esta repulsão pode ser muito importante devido à natureza hidrófila da componente COOH terminal da caseína K (Alves, 2003).

A composição das micelas, mais concretamente a proporção das diferentes caseínas, nomeadamente de caseína K, o teor em fosfato de cálcio e a composição salina da fase aquosa, condicionam o seu grau de estabilidade. A destabilização do sistema coloidal poderá ocorrer diretamente ao nível da micela ou indiretamente ao nível do ambiente circundante. A coagulação do leite é a base para o fabrico de queijo e está associada à destabilização do sistema coloidal (Macedo *et al.*, 1993, Silva & Malcata, 2005, Jacob *et al.*, 2011).

## 2.2. O Cardo

### 2.1.2. O cardo e suas utilizações

O cardo (*Cynara cardunculus* L.), é uma planta herbácea dicotiledónea, diplóide, anual e perene, pertencente à ordem Asterales e à família Asteraceae. Apresenta ciclos anuais, secando completamente no verão e rebentando com as primeiras chuvas de outono (Conceição *et al.*, 2018). Tem cerca de 1 a 2 metros de altura, raiz apumada e caule tomentoso com espessura até cerca de 17 milímetros. Apresenta folhas de grandes dimensões inseridas em roseta basilar ao longo do caule, de cor verde-vivo, que exibem espinhos rígidos de cor castanha na periferia. A planta apresenta flores hermafroditas de cor púrpura que ocorrem em inflorescências organizadas em capítulos compactos, com 80 a 240 flores e, em cada uma delas, é possível observar-se dois carpelos unidos no estigma (Wiklund, 1992, Martins, 1999, Martins, 2011).

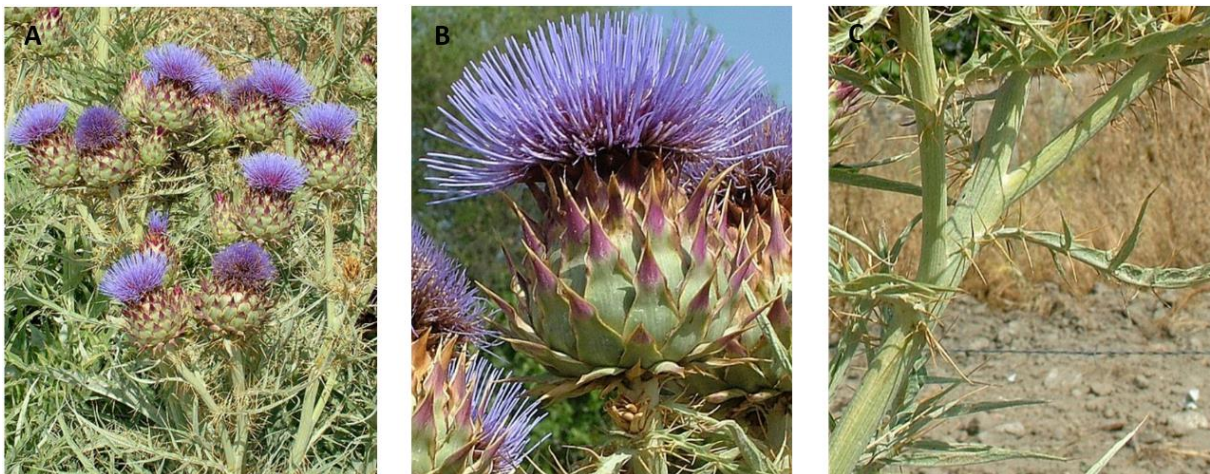


Figura 2 - *Cynara cardunculus*. A – Vista geral das inflorescências. B – Inflorescência. C – Inserção das folhas no caule (Fonte: Flora On).

O género *Cynara* tem uma distribuição ao longo da região mediterrânea, sendo *C. cardunculus* a espécie com distribuição mais alargada. Esta encontra-se distribuída por toda a zona Norte e Sudoeste do Mediterrâneo e Macaronésia (arquipélagos da Madeira e Canárias), surgindo em regiões costeiras e com influência marítima. No entanto, também é invasora noutras partes do Mundo, tendo colonizado regiões como o México, Califórnia, Argentina, Chile, Peru, Austrália, China e Oeste de África. A sua alargada distribuição é reflexo da grande adaptabilidade às diferentes condições edafoclimáticas, visto que nasce de forma espontânea, adaptando-se a ambientes extremos, mesmo sob *stress* hídrico. Por este motivo,

crece em vários locais, nas margens de campos de cultura, pastos, terrenos de pousio, ao longo de caminhos e até em zonas extremas, como solos argilosos, arenosos e pedregosos, surgindo frequentemente em regiões calcárias. Esta planta também é cultivada, por semente ou por via vegetativa, principalmente nas regiões de fabrico de queijo. Como é usada como coagulante, o objetivo do cultivo será contornar a carência desta planta, modo a ser utilizada pelas queijarias (Wiklund, 1992, Martins, 1999, Conceição *et al.*, 2018).

O cardo é uma planta com algum valor económico devido à sua utilização como substituto do coalho animal no fabrico de queijo, pois tem a capacidade de coalhar o leite (Vieira de Sá, 1974, Veríssimo *et al.*, 1995). Mas também é importante pelo consumo das suas folhas e caules, tradicional em Espanha e Itália, por ser uma fonte de óleo adequado ao consumo humano, por ser utilizada para produção de combustível (biodiesel) e bioetanol ou de pesticidas biodegradáveis (devido à presença de furanocumarinas), na medicina (pois apresenta propriedades nutracêuticas, farmacológicas e terapêuticas), para a produção de papel, alimentação de ruminantes, forragem verde para o gado ou para silagem e também por ser aplicada como cultura alternativa para terrenos marginais ou de pousio (Faro *et al.*, 1995, Martins, 1999, Christaki *et al.*, 2012, Conceição *et al.*, 2018).

### **2.2.2. O cardo na indústria queijeira**

Em Portugal, esta planta é conhecida como “cardo de coalho” ou “cardo hortense”, uma vez que as suas flores secas (concretamente os estigmas e os estiletos), são muito usadas desde tempos antigos como agente coagulante na queijaria tradicional, devido à sua riqueza em proteases aspárticas (Martins, 1999, Roseiro *et al.*, 2003, Silva & Malcata, 2005, Sarmiento *et al.*, 2006, Conceição *et al.*, 2018). A utilização desta planta como coagulante relaciona-se com o facto da sua distribuição geográfica abranger diversas regiões com tradição queijeira (Martins, 1999). Vários queijos tradicionais portugueses, em particular de ovelha, mas também de cabra, com Denominação de Origem Protegida (DOP) ou Indicação Geográfica Protegida (IGP), têm nas suas formulações a utilização de extratos aquosos desta planta e apresentam na respetiva legislação obrigatoriedade do uso dos mesmos. Alguns exemplos são os queijos “Serra da Estrela”, “Serpa”, “Azeitão”, “Nisa” e “Évora”. O mesmo se passa em Espanha com as variedades “Torta del Casar”, “La Serena” e “Flor de Guía” (Martins *et al.*, 1996, Prados *et al.*, 2007, Shah *et al.*, 2014, Almeida & Simões, 2018).

As enzimas coagulantes do cardo são utilizadas em queijaria de modo tradicional (Sarmiento *et al.*, 2006), sendo preparados diariamente os extratos que são utilizados (Jacob *et al.*, 2011). A flor a ser utilizada, é recolhida tipicamente nos meses de junho e julho (altura

em que estão num estado de maturação mais avançado e apresentam características mais favoráveis ao processo), sofre posteriormente uma secagem ao ar durante 30 a 60 dias a uma temperatura de 25-30°C. Após este período, são obtidos os extratos, através da infusão das flores em água, durante um período de tempo variável, seguida de maceração em almofariz; a mistura é filtrada, obtendo-se um líquido de cor acastanhada que é adicionado ao leite (Martins, 1999, Conceição *et al.*, 2018). Muitas vezes é adicionado sal aquando da maceração para a obtenção dos extratos coagulantes, no entanto, não se quantifica, na maioria das vezes a água e o sal utilizado (Martins, 1999). Considera-se que a presença de cloreto de sódio não influencia a extração da enzima, no entanto, é necessária uma concentração iónica mínima, pois soluções obtidas unicamente com água são menos ativas (Tsouli, 1974).

Para além disto, estes extratos apresentam por vezes uma pobre qualidade microbiológica e alguns componentes da flor, como compostos fenólicos, que poderão influenciar a atividade das enzimas e as características dos produtos-finais obtidos (Fernández-Salguero *et al.*, 1999, Conceição *et al.*, 2018). Torna-se, deste modo, reiteradamente difícil relacionar a qualidade da flor com o extrato obtido, pois existem diversos parâmetros que não são padronizados (Vieira de Sá, 1974, Martins, 1999, Roseiro *et al.*, 2003).

No entanto, nem todas as áreas de fabrico de queijo são regiões onde o cardo ocorre naturalmente (Pires *et al.*, 1994) e assim, para que este possa ser comercializado para o fabrico de queijo, é importante que se mantenham as melhores condições no tratamento e conservação da flor. A sua colheita é uma operação importantíssima para a qualidade do coagulante a obter, deve ser selecionada apenas a porção azul de cada flor, que corresponde ao estigma e à região superior do estilete, local onde se concentram a maior parte das enzimas coagulantes. A secagem ou quaisquer outros tratamentos a aplicar à fração de flor recolhida, devem ser realizados imediatamente a seguir à colheita, de forma a prevenir qualquer deterioração (Martins, 1999). É recorrente a utilização deste processo de secagem tradicional, com o objetivo de conservar e uniformizar a composição e atividade coagulante da flor de cardo ao longo da época de produção de queijo (Roseiro *et al.*, 2003, Conceição *et al.*, 2018). No entanto, apesar da secagem ser realizada a temperaturas baixas, verifica-se uma diminuição da atividade enzimática das flores, medida através da atividade coagulante (Martins *et al.*, 1996) e, em conjunto com a quebra de atividade ao longo da conservação da flor, cerca de 75% do potencial de atividade coagulante, expresso por unidade de matéria seca, pode ser perdido (Martins, 1999). Assim, reduzir o tempo de exposição às condições de secagem tradicionais pode limitar tais perdas, como tal, seria aconselhável a realização de uma desidratação a temperaturas mais elevadas, com a finalidade de reduzir o tempo de secagem e as perdas de atividade coagulante (Conceição *et al.*, 2018). Os extratos aquosos

obtidos de modo tradicional e usados em queijaria terão, desta forma, características variáveis (Martins, 1999), isto porque, a atividade coagulante do extrato desta planta depende de numerosos fatores: como o ecótipo usado, parte da planta utilizada, o seu estado de maturação, tempo de secagem ou o conteúdo final da mistura (Almeida & Simões, 2018).

Posto isto, o cardo é um fator-chave para a qualidade dos queijos e, por lhes conferir certas características particulares, tem sido cada vez mais estudado (Alcaraz *et al.*, 2011). No entanto, devido à variabilidade inerente à própria planta e também relacionada com os processos de conservação da flor, é de esperar alguma heterogeneidade ao nível da composição química dos extratos de cardo (Martins, 1999). O uso de coagulantes de forma empírica pode reduzir a aceitabilidade, qualidade e homogeneidade dos queijos tradicionais fabricados desse modo, assim como a utilização de leite cru, um veículo da flora microbiana que influencia as características dos queijos. Também, as componentes relacionadas com o rebanho (estado sanitário, alimentação, raça, potencial genético, manejo, estábulo, ambiente de produção e ordenha) e com a constituição do leite e sua transformação, irão influenciar a qualidade do produto-final obtido (Martins, 2006). Logo, a possibilidade de se utilizar coagulantes de forma mais controlada pode contribuir para o aumento e preservação do fabrico tradicional de queijo (Martins *et al.*, 1996, Alves, 2003, Almeida & Simões, 2018).

### **2.2.3. As enzimas coagulantes de *C. cardunculus***

A atividade coagulante, *i. e.*, a capacidade para hidrolisar de forma específica a caseína-K (Jacob *et al.*, 2011), do cardo deve-se ao complexo de enzimas proteolíticas existentes em grande quantidade na fração violeta das suas flores, mais concretamente nos estigmas e estiletos. Este complexo engloba predominantemente dois grupos de proteases aspárticas, cardosinas e ciprosinas, geneticamente diferentes (Macedo *et al.*, 1993, Macedo *et al.*, 1996, Martins *et al.*, 1996, Silva & Malcata, 1998, Alves, 2003, Pimentel *et al.*, 2007, Prados *et al.*, 2007, Martins, 2011, Shah *et al.*, 2014, Almeida & Simões, 2018).

As proteases aspárticas (EC 3.4.23) são um grupo de enzimas, endopeptidases, amplamente distribuídas na natureza, presentes em bactérias, protozoários, fungos, plantas, animais e também alguns vírus (Veríssimo *et al.*, 1995, Dunn, 2002, Pina *et al.*, 2003). Estas apresentam dois resíduos aspárticos no seu local catalítico, são mais ativas a pH ácido e mostram especificidade para clivar ligações peptídicas entre resíduos de aminoácidos hidrofóbicos responsáveis pela atividade catalítica (Alves, 2003, Shah *et al.*, 2014, Almeida & Simões, 2018). Têm funções biológicas importantes, apesar de ainda um pouco desconhecidas, ao nível da germinação, senescência, defesa ou reprodução das plantas

(Martins, 1996, Ramalho-Santos *et al.*, 1997, Martins, 2011); têm funções importantes em sistemas biológicos animais, nomeadamente na degradação de proteínas e na regulação da pressão sanguínea (Conceição *et al.*, 2018) e desempenham um papel muito importante ao nível da coagulação das proteínas do leite, podendo substituir o coalho animal e, por estes motivos, tal como referido, têm sido alvo de interesse da investigação científica (Veríssimo *et al.*, 1995, Jacob *et al.*, 2011).

Nos pistilos de *C. carcondulus*, foi possível isolar nove tipos de proteinases aspárticas, sendo um dos números mais altos que foram isolados em apenas um organismo, sugerindo assim a grande importância e especificidade das funções biológicas desta planta (Sarmiento *et al.*, 2009, Conceição *et al.*, 2018). Neste conjunto de enzimas existentes no cardo, surgem dois tipos de cardosinas distintas, A e B, ambas heterodiméricas com um elevado grau de homologia que se encontram em proporções acentuadas, mas diferentes. Aproximadamente 78% da proteína total corresponde à cardosina A e os restantes 22% são representados pela cardosina B, estas duas proteínas apresentam, ao nível dos parâmetros cinéticos, da especificidade e da proporção que se encontram, semelhanças com a quimosina e pepsina do coalho animal, respetivamente (Veríssimo *et al.*, 1995, Silva & Malcata, 1998, Martins, 1999). O coeficiente catalítico da cardosina A é próximo do da quimosina e o da cardosina B é da mesma ordem de grandeza que o da pepsina. A cardosina A tem uma especificidade de substrato mais limitada e menor eficiência catalítica quando comparada com a cardosina B (Martins, 1999, Alves, 2003, Almeida & Simões, 2018). A cardosina A encontra-se altamente restrita aos pistilos e foi detetada maioritariamente nos vacúolos do estilete das flores, mas também ao longo das células da epiderme do estilete (Ramalho-Santos *et al.*, 1997, Duarte *et al.*, 2006). Em contraste, a cardosina B está ausente na parte superior do estigma tendo sido detetada na matriz extracelular do tecido de transmissão do estilete e zona inferior do estigma (Vieira *et al.*, 2001, Duarte *et al.*, 2006).

As ciprosinas, que foram primeiramente designadas por cinarinas, depois por cinarases e, posteriormente, por ciprosinas, são enzimas semelhantes às cardosinas, que também se encontram na zona do pistilo da flor, no entanto com algumas características diferentes das mesmas (Brodellius *et al.*, 1988, Heimgartner *et al.*, 1990, Martins, 1999). Estas são também heterodiméricas e existem sob 3 formas: ciprosina 1, ciprosina 2 e ciprosina 3. Os três tipos de ciprosinas distinguem-se pela sua atividade proteolítica específica. As ciprosinas 2 e 3 têm maior atividade que a quimosina e que a ciprosina 1, sendo a ciprosina 3 a que apresenta maior atividade coagulante (Heimgartner *et al.*, 1990, Martins, 1999, Roseiro *et al.*, 2003, Almeida & Santos, 2018).

As duas cardosinas são ativas a pH entre 2 e 7, sendo o pH ótimo entre 5 e 5,5. As três cipsosinas mostram um máximo de atividade a um valor de pH próximo de 5,1 a 37°C, no entanto a cipsosina 3 apresenta um pH ótimo de 4,1 (Martins, 1999, Alves, 2003, Almeida & Santos, 2018).

### **2.2.4. A utilização do cardo vs. outros coagulantes no fabrico de queijo**

Devido ao grande crescimento na produção de queijo a partir de 1960 e à redução da disponibilidade de coalho animal, por restrições ao acesso a estômagos de vitelo, têm-se assistido à procura de substitutos com potencial para o fabrico de queijo, que devem mimetizar as propriedades do coalho no fabrico de queijo, *i. e.*, uma elevada proporção entre atividade coagulante e proteolítica nas condições de pH e temperatura específicas para o fabrico de queijo. Os mais importantes substitutos para o coalho animal incluem enzimas de origem microbiana, enzimas recombinantes obtidas a partir de organismos geneticamente modificados e proteases de plantas (Jacob *et al.*, 2011).

O uso de coalho animal tem algumas limitações religiosas (Judaísmo e Islamismo) e em termos de dieta (vegetarianismo), existindo ainda alguma oposição quanto à utilização de alimentos ou ingredientes geneticamente modificados (na Alemanha e na Holanda, por exemplo, há a proibição do uso de coalho de vitela recombinante). Mais recentemente, devido à incidência de encefalopatia espongiforme bovina (BSE), reduziu-se tanto a oferta como a procura de coalho bovino. Como tal, atualmente, o interesse na utilização de coagulantes vegetais tem vindo a aumentar (Roseiro *et al.*, 2003, Almeida & Simões, 2018). O cardo é uma das fontes mais importantes de coagulante vegetal. Outras plantas, como, por exemplo, a papaeira (*Carica papaya*) e a figueira (*Ficus cantia*), têm também sido alvo de investigação, no entanto não têm aplicação industrial devido à extrema atividade proteolítica não específica das enzimas que lhes estão associadas, a papaína e a ficina, que geram problemas a nível tecnológico e nos produtos finais obtidos (Martins, 1999, Jacob *et al.*, 2011).

Contrariamente ao que acontece com os extratos de cardo, existem diversas preparações comerciais que disponibilizam enzimas ou misturas de enzimas purificadas para fabrico de queijo, de origem animal, de origem microbiana ou de enzimas de origem animal obtidas a partir de organismos geneticamente modificados, não sendo estas últimas permitidas no fabrico de queijos DOP (Jacob *et al.*, 2011). A utilização de preparações, na forma líquida ou em pó, com atividade coagulante padronizada, permite aos produtores de queijo a planificação dos seus fabricos. Possibilitam, além disso, a reprodução das mesmas tecnologias de fabrico de forma a poderem apresentar produtos com alguma homogeneidade,

o que motiva a fidelização do consumidor na escolha dos produtos que prefere (Shah *et al.*, 2014). No entanto, para os extratos de flor de cardo, tal como referido, não existem ainda formulações *standard* purificadas, pelo menos com a garantia necessária para poderem ser utilizadas em queijos DOP nacionais (Martins *et al.*, 1996, Almeida & Simões, 2018). Por isso, os produtores de queijo continuam a utilizar o cardo de forma tradicional, empírica, sem outra medida de padronização que não seja a quantificação da quantidade da flor. Esta, apresentando composição e características muito variáveis, e sem processos padronizados de extração, contribui para a frequente falta de homogeneidade quanto às características dos queijos (Vieira de Sá & Barbosa, 1972, Martins *et al.*, 1996, Martins, 1999, Martins, 2006, Jacob *et al.*, 2011).

Numa grande parte dos queijos tradicionais de elevada qualidade, é utilizado o cardo como agente coagulante (Prados *et al.*, 2007), no entanto, isto é difícil transparecer para uma escala industrial. Por este motivo, a este nível ainda é mais utilizado o coalho de origem bovina. A utilização de agentes coagulantes alternativos seria uma mais-valia, tanto ao nível da inovação dos produtos, como das propriedades organoléticas e reológicas dos mesmos. Apesar de todas as propriedades únicas intrínsecas do cardo, este não pode ser utilizado a uma escala mais alargada devido à sua variabilidade no que diz respeito à atividade enzimática, qualidade microbiológica e pelas limitações de acesso à planta em alguns locais, o que contribui para uma elevada heterogeneidade dos produtos finais (Fernández-Salguero *et al.*, 1999, Almeida *et al.*, 2015, Almeida & Simões, 2018).

### **2.2.5 A ação das proteases aspárticas de *C. cardunculus* no fabrico de queijo vs. outros coagulantes**

O complexo enzimático, formado pelas cardosinas e ciprosinas, não apresenta características e propriedades assim tão distintas das restantes enzimas utilizadas na indústria queijeira, o seu efeito no processo tecnológico é semelhante (Silva & Malcata, 2005). Estas enzimas também clivam especificamente a ligação Fen 105-Met 106 da caseína K de origem bovina e ovina, que tem o papel de estabilizar a micela de caseína, da mesma forma que a quimosina e a pepsina, permitindo a agregação das micelas de caseína, por intermédio da ação do cálcio iónico (Silva & Malcata, 2005, Broome *et al.*, 2006, Sarmiento *et al.*, 2006, Martins, 2006, Prados *et al.*, 2007, Galán *et al.*, 2008, Jacob *et al.*, 2011, Almeida & Simões, 2018, Conceição *et al.*, 2018). No entanto, nos coagulantes distingue-se a atividade proteolítica específica para a fase primária coagulação e a atividade proteolítica não específica. O facto das proteases do cardo apresentarem uma forte atividade proteolítica não específica (que se reflete na maior libertação de azoto solúvel) (Vieira de Sá, 1974, Martins,

## 2 – Revisão Bibliográfica

2006), promovendo uma hidrólise mais acentuada das caseínas  $\alpha_s$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , quando comparadas com outras enzimas coagulantes, diferencia-as das restantes proteases aspárticas utilizadas no fabrico de queijo (Alves, 2003). Em *C. cardunculus*, aponta-se uma relação atividade proteolítica/atividade coagulante significativamente maior comparativamente à quimosina e ao coalho. Estes efeitos são mais notórios no leite de ovelha e menos evidentes em leite de vaca (Conceição *et al.*, 2018).

Esta atividade proteolítica não específica das enzimas do cardo, é muitas vezes apontada como um aspeto negativo, estando associada a alguns defeitos ao nível da textura e sabor, e a uma quebra de rendimento (Vieira de Sá & Barbosa, 1972, Martins 1999). O soro resultante do fabrico de queijo com cardo como agente coagulante, apresenta maior turbidez relativamente ao soro oriundo do fabrico de queijo com coalho animal, considerando-se que isto se deve à presença de caseínas em suspensão, o que pode ser uma explicação para a quebra de rendimento no fabrico (Vieira de Sá, 1974). No entanto, a fração residual de proteases que fica retida na coalhada influencia a proteólise ao longo da maturação, sendo muito importante para definir certas características dos queijos, como a textura (cremosidade) em queijos feitos a partir de leite de ovelha (Conceição *et al.*, 2018). Assim, em situações específicas, como a utilização do cardo em leite de ovelha, que por si só apresenta propriedades físico-químicas únicas, poderá ser um fator favorável tanto na coagulação como na maturação, levando ao surgimento de produtos com elevado valor intrínseco e características particulares de textura, aroma e sabor (Martins, 1999, Martins, 2006, Galán *et al.*, 2008, Alcaraz *et al.*, 2011, Almeida & Simões, 2018).

A ação das proteases do cardo nas regiões hidrofóbicas das caseínas resulta na formação de maior proporção de péptidos com características diferentes dos formados aquando da adição de outros coagulantes, devido à pronunciada proteólise das caseínas. Isto resultará no desenvolvimento de algumas características comuns, em particular em queijos produzidos com leite de ovelha, que estão relacionadas com um sabor amargo ou por vezes picante e uma pasta mole (Martins, 1999, Prados *et al.*, 2007, Correia *et al.*, 2014, Almeida & Simões, 2018). Estes péptidos, relacionados com o sabor amargo, devem-se à degradação das caseínas  $\alpha$  e  $\beta$  e a sua concentração é mais elevada quanto maior a proteólise da caseína, como em queijos de cura mais prolongada (Toelstede & Hofmann 2008, Jacob *et al.*, 2010). Será ao nível das caseínas  $\alpha_{s1}$  que as proteases do cardo terão maior influência a nível físico e organoléptico, pois a sua ação é muito diferente relativamente à de outros coagulantes usados (Alves, 2003).

Agboola *et al.* (2004) verificaram que, queijos de ovelha produzidos com o cardo como coagulante apresentam maiores níveis de péptidos hidrofílicos e hidrofóbicos,

comparativamente aos queijos produzidos utilizando coalhos de origem animal e microbiana. No entanto, detetaram que os primeiros não apresentavam um sabor amargo tão intenso como queijos feitos com coalho microbiano e animal, possivelmente estando este mascarado por outros componentes do queijo, sendo os queijos produzidos com coalho microbiano, os que demonstraram ser mais percebidos como “picante” pelo painel sensorial, tendo o mesmo sido referido por Jacob *et al.* (2011) no seu trabalho de revisão. Fernández-Salguero & Sanjuán (1999) investigaram o efeito, tanto do cardo como do coalho, como coagulantes, na proteólise durante a maturação do queijo “Los Pedroches”, produzido com leite de ovelha. E, indo de acordo com o que já foi referido, neste trabalho também verificaram que a hidrólise das caseínas ocorreu de forma mais extensiva e rápida, aquando da utilização de *C. cardunculus*.

Noutro trabalho, Pino *et al.* (2009) compararam as ações do cardo como coagulante e do coalho de origem bovina, para o fabrico de queijo com leite de cabra. Concluíram que, os queijos confeccionados com o uso das proteases de *C. cardunculus* como coagulante, apresentaram maiores teores de péptidos hidrofóbicos e um maior rácio de péptidos hidrofóbicos/hidrofílicos durante todo o processo de maturação, comparativamente queijos aos produzidos com coalho bovino. Também entenderam que a ação do cardo como coagulante, em queijo de cabra tradicional, levou a uma atividade proteolítica superior à resultante da ação da quimosina, nos primeiros estágios da maturação. O uso de cardo como coagulante no fabrico do queijo de cabra pode acelerar a maturação, contribuindo para o surgimento de características sensoriais diferentes, causadas pelo aumento da atividade proteolítica da cimosina (Tejada *et al.*, 2008). No entanto, a sua utilização pode ser uma via favorável ao aumento da produção deste tipo de queijos, com redução de custos e amplificando o mercado para os mesmos (vegetarianismo) (Alcaraz *et al.*, 2011).

É possível considerar, de forma consensual, que a fase de agregação micelar durante a coagulação do leite, a segunda fase do processo de coagulação, é composta por um conjunto de reações que dependem da composição do leite, relativamente aos seus elementos proteicos e minerais, em particular o cálcio iónico, não diretamente dependentes das enzimas coagulantes. No entanto, o tipo de coagulante apresenta uma influência indireta através da atividade proteolítica exercida sobre a proteína destabilizada na fase primária da coagulação, interferindo na velocidade da reação e firmeza do gel. O tipo de coagulante tem, deste modo, um importante papel na definição das características da coalhada (Conceição *et al.*, 2018).

### 2.2.6. Conservação de extratos de cardo

O provisionamento de flor de cardo para o fabrico de queijo baseia-se sobretudo na conservação da mesma, por secagem, uma vez que a colheita se concentra na época de floração. Sendo um processo eficiente sob o ponto de vista da conservação da flor, não deixa de provocar alguma quebra relativamente ao potencial coagulante, quer pelo processo de secagem, com quebras estimadas em cerca de 20 a 50%, quer ao longo do tempo, num total de até 75% da atividade inicial da flor até ao momento de nova colheita (Martins *et al.*, 1996; Martins, 1999; Conceição *et al.*, 2018).

O aumento do volume de produção de queijo que vem ocorrendo ao longo dos últimos anos e a extensão do consumo de flor de cardo como coagulante ao nível da indústria, acompanhando o aumento de dimensão das unidades de transformação, intensifica a necessidade de dispor de soluções padronizadas deste coagulante de origem vegetal e que, para além disso, apresentem boas condições de conservação e atividade coagulante. Assim, será importante o desenvolvimento de formulações que mantenham a sua atividade coagulante e proteolítica, parâmetros importantes no que diz respeito à avaliação dos coagulantes para o fabrico de queijo, e que possam ser utilizadas em queijaria de modo industrial, ao longo do tempo (Martins, 1996). Desta forma será possível incrementar a quantidade de produto e a qualidade dos queijos produzidos, aproveitando igualmente o potencial nutricional e propriedades físico-químicas do leite de ovelha e de cabra (este último utilizado no queijo mestiço de Tolosa, com designação IGP), superando a carência de um coagulante adequado para o fabrico destes tipos de queijo a uma escala industrial (Almeida & Simões, 2018).

Com estes objetivos, isto é, visando o desenvolvimento de soluções mais eficazes com potencial para aumentar a produção e aplicação comercial, várias estratégias foram empreendidas nos últimos anos para estabelecer novos coagulantes à base de cardo. Regista-se o desenvolvimento e a disponibilização de três tipos de soluções: formulações de extrato de cardo, cipsosina B (designação dada à cinarase 3 pelos autores) recombinante e cardosinas A e B recombinantes (Almeida & Simões, 2018).

Os extratos de cardo poderão ser um fator adicional de contaminação microbiana, por vezes, favorável para a maturação dos queijos, mas também poderão contribuir com microrganismos não desejáveis ao processo (Vieira de Sá, 1974, Fernández-Salguero *et al.*, 1999, Prados *et al.*, 2007). Para evitar esse tipo de situações, foi desenvolvido há alguns anos um coagulante vegetal em pó, obtido por liofilização dos extratos aquosos de flores de *C. cardunculus*. Este é um produto livre de microrganismos, solúvel em água ou no leite, estável, sem necessitar de conservantes, com atividade coagulante fácil de tipificar e de simples

utilização, com sucesso em diversas variedades de queijo (Fernández-Salguero *et al.*, 2002, Jacob *et al.*, 2011). Em diferentes queijos, como por exemplo, “Los Pedroches” e “Manchego”, o uso deste coagulante em pó deu origem a produtos com características organolépticas e reológicas semelhantes às dos obtidos com extratos aquosos de cardo, no entanto, com menor carga microbiana. A sua utilização também pode ser estendida a um conceito de aceleração da maturação e, dessa forma, contribuir para produtos finais com melhores atributos sensoriais, mais cremosos e suaves (Almeida & Simões, 2018).

Em relação à comparação da utilização do coagulante em pó com o coalho animal, no fabrico dos mesmos tipos de queijo, concluiu-se que os dois tipos de coagulante não apresentaram diferenças significativas na maioria dos parâmetros químicos estudados, no entanto, ao nível da qualidade sensorial (odor, cor, intensidade do sabor e cremosidade), esta foi superior em queijos obtidos com a utilização do coagulante vegetal em pó (Tejada & Fernández-Salguero, 2003, Prados *et al.*, 2007). A maior limitação deste tipo de coagulante em pó à escala industrial prende-se com a disponibilidade de flor de cardo e com a variabilidade de ecótipos existente, que se reflete em diferenças ao nível da atividade proteolítica (Correia *et al.*, 2016, Almeida & Simões, 2018).

Através de duas espécies de leveduras, concretamente *Pichia pastoris* e *Saccharomyces cerevisiae*, foi possível obter cipsosinas B recombinantes que geraram, no fabrico de queijo, uma proteólise elevada, refletindo-se numa maior taxa de azoto solúvel e num maior índice de maturação, comparativamente queijos fabricados com coalho animal. Considerou-se que as cipsosinas B recombinantes apresentam os mesmos padrões de hidrólise que os extratos aquosos da flor de cardo ou que o coagulante em pó descrito anteriormente (Fernández-Salguero *et al.*, 2003, Almeida & Simões, 2018).

As cardosinas A e B englobam a maioria da proteína solúvel presente nas flores de cardo, consideradas como tendo uma importância fundamental na coagulação do leite, têm sido estudadas desde há vários anos no sentido de desenvolver um coagulante vegetal sintético à base das mesmas (Almeida & Simões, 2018). Foi possível expressar cardosina A em *Escherichia coli*, com propriedades idênticas às da enzima natural (Castanheira *et al.*, 2005). Em estudos mais recentes, procurou-se o desenvolvimento de uma forma recombinante de cardosina B com aplicação industrial no fabrico de queijo, em particular de leite de ovelha e de cabra. Neste caso, o sistema de expressão escolhido foi *Kluyveromyces lactis* e foi demonstrado que a enzima secretada demonstra propriedades proteolíticas idênticas às da cardosina B natural e com maior rendimento comparativamente à quimosina sintética (Almeida *et al.*, 2015). A cardosina B sintética mostrou ter menor eficiência catalítica, mas ser mais seletiva que a cardosina B. Ambas as propriedades foram apontadas como

aspectos positivos, podendo influenciar positivamente o desempenho deste tipo de preparação enzimática no fabrico de queijo (Almeida & Simões, 2018).

Uma outra alternativa é a disponibilização de extratos líquidos titulados de flor de cardo, à semelhança do que acontece para outros coagulantes de origem animal ou microbiana. Já existem no mercado soluções comerciais deste tipo, no entanto sem garantias que permitam a respetiva utilização em queijos DOP, para os quais ainda hoje a forma tradicional de preparação de extratos é a única permitida. Ao nível das queijarias que produzem estes tipos de queijo, existem tentativas de preparação de extratos em maior escala, para utilização que ultrapasse a quantidade necessária a cada fabrico. A questão que se coloca nestas situações será a capacidade de conservação destas soluções. Na verdade, alguns trabalhos efetuados para avaliar a capacidade de conservação dos extratos aquosos de cardo, obtidos de forma tradicional, revelam que a sua atividade proteolítica diminui ao longo do tempo, mesmo com conservação a 4°C, o que motiva a procura de outro tipo de soluções ou métodos de conservação mais adequados (Tavaria *et al.*, 1997, Conceição *et al.*, 2018). Foi demonstrado por Tavaria *et al.* (2001) e por Tejada *et al.* (2008), que a liofilização dos extratos apresenta vantagens em relação à refrigeração e congelação, no que diz respeito à conservação da atividade coagulante. Segundo Tavaria *et al.* (2001) a liofilização dos extratos da flor de cardo retarda as perdas de atividade coagulante durante o armazenamento, providenciando uma maior estabilidade conformacional da enzima coagulante. Os mesmos autores concluíram também que a liofilização em conjunto com a reconstituição com água, resultou em maior atividade coagulante e melhor atividade proteolítica, que os extratos frescos ou reconstituídos com tampão citrato (pH 5,4).

Silva & Malcata (2005) verificaram a atividade coagulante e proteolítica em extratos liofilizados de *C. cardunculus*, reconstruídos com tampão citrato (pH 6,2) e, em alternativa, com tampão citrato (pH 5,0) 10mM com 20 g/L de NaCl. A incubação das enzimas coagulantes em tampão citrato (pH 5,0) mostrou ter efeitos significativos na sua atividade, demonstrando-se que é mais elevada a pH mais ácido, o que não é surpreendente, pois tratam-se de proteases aspárticas.

Noutro estudo, Sousa & Malcata (1998) investigaram o efeito do tampão fosfato, a pH 6,5 ou 5,5, na ausência de NaCl, e a pH 5,2 com NaCl a 5% (g/v), na atividade proteolítica primária do complexo de caseinato de sódio de ovelha e cabra, de extratos aquosos de cardo. O caseinato caprino apresentou maior degradação que o ovino, nas mesmas condições (pH 6,5 e 5,5), na ausência de NaCl, e verificaram, em ambos os caseinatos de sódio, que a presença deste sal reduz a proteólise das caseínas  $\alpha_s$  e  $\beta$ . Neste trabalho também verificaram que a pH mais baixo a degradação das  $\beta$  caseínas foi mais rápida, o que corrobora outros

estudos. Assim, entende-se que tanto o pH como a força iônica afetam a atividade destas enzimas.

A introdução de um sistema orgânico numa mistura reacional pode afetar a atividade, estabilidade e especificidade das enzimas, dando-lhes novas propriedades (Sarmiento *et al.*, 2006). A nível laboratorial, não aplicável ao setor alimentar, têm-se vindo a desenvolver estudos, desde o início dos anos 90, acerca da estabilidade das proteases de *Cynara carduculus* em sistemas orgânicos aquosos. Barros *et al.* (1992), testaram a preservação das propriedades destas enzimas em sistemas bifásicos contendo acetato de etilo, *n*-hexano e isoctano e compararam-nas com as da pepsina. Verificaram que o *n*-hexano e o isoctano apresentam maior capacidade de desnaturação que o acetato de etilo e, relativamente à comparação entre a enzima vegetal e a pepsina, concluíram que a retenção da atividade enzimática por parte da protease ácida do cardo se mantém mais estável e mais elevada, com as soluções de *n*-hexano e o isoctano; o acetato de etilo não demonstrou reter tão eficazmente as propriedades de ambas as enzimas. No mesmo estudo, investigou-se o efeito da temperatura, sendo que a temperaturas mais altas, a atividade de ambas as enzimas decresceu significativamente ao longo do tempo.

Mais recentemente, foi testado o efeito do acetronitrilo na estabilidade da cardosina A. Verificou-se algum efeito ao nível da estrutura e cinética sem resultar numa perda significativa de atividade da enzima. Demonstrou-se que o solvente pode afetar a atividade da enzima através de mudanças conformacionais, não sendo possível, no entanto, descartar uma presumível interação com o sítio ativo da enzima (Shnyrova *et al.*, 2006). Noutro estudo, foi testado o efeito de solventes orgânicos na especificidade da cardosina A, em substratos complexos, como as caseínas  $\alpha$ ,  $\beta$  e K, sem que se demonstrassem consequências de qualquer uma das soluções utilizadas, na especificidade desta enzima. Sarmiento *et al.* (2006) demonstraram que a cardosina A não só se mantém ativa nesses sistemas orgânicos como a sua especificidade se mantém.

Estudos como estes, acerca da conservação das propriedades destas enzimas, são muito importantes para compreender o seu comportamento ao longo do tempo. No entanto não se podem aplicar à indústria alimentar, pois as soluções testadas apresentam solventes orgânicos com alguma toxicidade. Será realmente importante, por isso, testar soluções aquosas, não tóxicas, que ajudem a manter as propriedades das enzimas do cardo durante o maior tempo possível, para que este seja utilizável à escala industrial (Martins *et al.*, 1996).

### **3. Trabalho experimental**

Este trabalho pretendeu dar alguma resposta às questões abordadas no final do capítulo anterior, através do estudo da conservação de extratos de flor de cardo sob diferentes condições de formulação.

Foram preparados extratos de flor de cardo utilizando o mesmo lote de flor seca de cardo e quatro soluções de extração diferentes, as quais funcionaram como formulações enzimáticas relativamente às quais foi avaliada a respetiva ação coagulante ao longo do tempo sob condições de refrigeração.

Todos os extratos foram preparados em simultâneo, e conservados nas mesmas condições (4°C) ao longo de 135 dias (quatro meses e meio). Após a avaliação das características iniciais, os extratos foram colocados sob refrigeração, procedendo-se à sua avaliação ao fim de 45 dias, 90 dias e 135 dias.

#### **3.1. Material e métodos**

##### **3.1.1. Leite**

Para a medição da atividade coagulante utilizou-se um leite de referência (*spray dried skimmed milk powder*, Actalia Cecalait, Poligny, France) e um coalho em pó padrão de referência (*Calf rennet reference standard powder*, Chr. Hansen, Hørsholm, Denmark) de acordo com a Norma ISO 23058|IDF 199: 2006.

Na caracterização da aptidão tecnológica para a coagulação utilizou-se leite em pó magro de vaca, reconstituído a 11% (m/v) com uma solução de cloreto de cálcio 0,01M, acertado a pH 6,6.

Tanto para a medição da atividade coagulante como para a caracterização da aptidão tecnológica, a preparação do leite foi sempre efetuada no próprio dia dos ensaios e realizada do mesmo modo, para diminuir a respetiva influência nos resultados.

### 3.1.2. Cardo

O material utilizado foi um lote de cardo colhido em Oeiras, no campus do INIAV, no período de junho a julho de 2016. Utilizou-se a técnica de corte ao nível da base dos estiletos, nas inflorescências com flores que apresentaram o desenvolvimento de estigmas de cor azul ou lilás característicos, com o cuidado de selecionar as partes das inflorescências com interesse para a coagulação, evitando as brácteas ou o receptáculo. O material recolhido será designado por “flor de cardo”, no entanto sabe-se que apenas foi colhida e utilizada uma parte da flor para a preparação dos extratos.

A flor colhida foi armazenada em sacos de papel e seguiu para o local de secagem após a colheita. Aí procedeu-se à secagem sem incidência direta da luz solar, em camada fina, à temperatura ambiente (25-30°C), de acordo com o modo tradicional. A secagem funciona como um método de conservação da flor, caso esta não seja utilizada de imediato.

Após a secagem, o material foi armazenado em saco de papel para posterior utilização na preparação dos extratos.

### 3.1.3. Preparação das amostras e extração

Para a preparação dos extratos de cardo foram utilizadas quatro soluções diferentes: tampão acetato a pH 5,5, tampão citrato a pH 3, uma solução de cloreto de sódio a 5% (m/v) e uma solução de cloreto de sódio a 20% (m/v).

O tampão acetato foi preparado de acordo com a Norma ISO 23058|IDF 199: 2006 e para o tampão citrato misturaram-se quantidades iguais de uma solução de ácido cítrico a 50mM e de uma solução de citrato de sódio a 50mM, procedendo-se no final a um acerto do pH com ácido clorídrico 1M, para se obter o pH final desejado.

A extração foi efetuada por maceração em almofariz, à temperatura ambiente (aproximadamente 15-20°C), de 4g de flor de cardo seca até obtenção de 100mL de solução após filtração através de papel de filtro Whatman nº 54, obtendo-se quatro extratos diferentes. A todos os extratos foi adicionado 2% de sorbato de potássio e as formulações foram posteriormente armazenadas a 4°C.

#### **3.1.4. Medição da atividade coagulante**

A determinação da atividade coagulante foi efetuada de acordo com a Norma ISO 23058|IDF 199: 2006. Utilizou-se leite padrão reconstituído a 11%, pH 6,5, estabilizado a 32°C em banho de água termostaticado. Para determinação da atividade coagulante, adicionou-se 500 µL de solução coagulante a 25mL de leite e mediu-se o tempo até ao início da floculação.

#### **3.1.5. Propriedades tecnológicas**

Para caracterizar as propriedades tecnológicas na coagulação induzidas pelos coagulantes, recorreu-se ao Optigraph®. Este equipamento foi desenvolvido em 1999 pelo INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) de Grignon e pela empresa Ysebaert, com o objetivo de monitorizar a coagulação do leite em laboratórios de indústrias de laticínios, através de um método óptico.

O Optigraph® é um sistema composto por um *hardware* e um *software* e caracteriza o comportamento do leite ao longo da coagulação. Permite calcular, em tempo real, todos os parâmetros necessários a ter em conta no fabrico de queijo, o tempo de coagulação e vários pontos que permitem avaliar a evolução da firmeza do coágulo, ao longo do tempo.

Neste método, é medida a atenuação do sinal ótico na gama do infra-vermelho próximo; à medida que a coagulação evolui, a luz emitida que atravessa o leite é progressivamente atenuada devido a alterações que ocorrem na estrutura da micela de caseína. São obtidos gráficos, os “optigramas” que são construídos de acordo com a evolução do sinal (Ysebaert, 2000).

Este equipamento mede, entre outros parâmetros, o tempo de início da floculação (R), a intensidade do sinal ótico (em Volt) quando decorreu um tempo igual ao dobro do tempo de coagulação (AR) e quando decorreu um tempo igual ao triplo do tempo de coagulação (A2R). Mede também o tempo decorrido, a partir do início da coagulação, até se obter uma consistência padrão (OK20) e a intensidade do sinal após 20 e 40 minutos desde o início do ensaio ( $A_{20}$  e  $A_{40}$ , respetivamente). Os parâmetros OK20,  $A_{20}$  e  $A_{40}$  são, assim, medidos independentemente do tempo do início da coagulação.

O suporte do Optigraph® contém 10 células, tendo assim capacidade máxima para 10 amostras, podendo funcionar de forma independente. O volume de leite a utilizar deve ser de 10mL e a quantidade de coagulante para cada um de 1mL.

Os ensaios de coagulação em Optigraph® foram realizados durante 120 minutos, para os quatro tipos de soluções de cardo a testar, procurando analisar a respetiva influência na coagulação, quer no que se refere à atividade coagulante (R) quer no que se refere ao comportamento do leite em função da formulação e do tempo de conservação. Cada uma das amostras foi analisada em duplicado.

#### **3.1.6. Caracterização microbiológica dos extratos de flor de cardo**

A caracterização microbiológica dos extratos teve como objetivo avaliar a componente microbiana dos mesmos ao longo do tempo. Os grupos de microrganismos pesquisados contemplam parâmetros relacionados com o ponto de vista higiénico-sanitário, como a contagem de Enterobacteriaceae e alguns indicadores de contaminação genérica, contagem de psicrotróficos, mesófilos totais, bolores e leveduras. As determinações foram efetuadas segundo as seguintes metodologias:

- Contagem de Enterobacteriaceae – sementeira por incorporação em placa de VRBGA com incubação a 37°C durante 24 horas, segundo a Norma ISO 21528-2: 2004, com contagem das colónias vermelhas características e com os resultados expressos em ufc.mL<sup>-1</sup>.
- Contagem de psicrotróficos – sementeira por incorporação em placa de PCA com incubação a 6,5°C durante 10 dias, segundo a Norma ISO 6730|IDF 101: 2005, com contagem de todas as colónias desenvolvidas e com os resultados expressos em ufc.mL<sup>-1</sup>.
- Contagem de mesófilos totais – sementeira por incorporação em placa de PCA com incubação a 30°C durante 72 horas, segundo a Norma ISO 4833-1: 2005, com contagem de todas as colónias desenvolvidas e com os resultados expressos em ufc.mL<sup>-1</sup>.
- Contagem de bolores e leveduras – sementeira por espalhamento em superfície em placas de Rose Bengal Chloramphenicol Agar com incubação a 25°C durante 5 a 7 dias, segundo a Norma ISO 21527-2: 2008, com os resultados expressos em ufc.mL<sup>-1</sup>.

#### **3.2. Tratamento dos resultados**

Como se referiu, os ensaios de conservação foram efetuados em duplicado. Os resultados foram analisados com o recurso à análise de variância, utilizando o *package*

### 3 – Trabalho Experimental

*software* Statistica 8 (StatSoft), considerando a formulação e o tempo de conservação como fatores. Foi utilizado o teste de Tukey para comparação dos grupos em função da interação entre os dois fatores, considerando dois níveis de confiança (95% e 99%).

## 4. Resultados e discussão

### 4.1. Propriedades tecnológicas

Relativamente às propriedades tecnológicas, apresenta-se em seguida (Tabela 3), a tabela-resumo da ANOVA, para os parâmetros analisados.

Tabela 3 - Tabela-resumo da ANOVA, testando a influência das variáveis independentes Tempo e Solução em cada uma das variáveis dependentes, relacionadas com as propriedades tecnológicas.

|  | <i>AC</i> | <i>R</i> | <i>AR</i> | <i>A2R</i> | <i>A<sub>20</sub></i> | <i>A<sub>40</sub></i> | <i>OK20</i> |
|--|-----------|----------|-----------|------------|-----------------------|-----------------------|-------------|
| <i>Tempo</i>                               | ns        | **       | **        | **         | **                    | *                     | ns          |
| <i>Solução</i>                             | **        | **       | **        | **         | **                    | **                    | **          |
| <i>Tempo</i><br><i>x</i><br><i>Solução</i> | ns        | ns       | ns        | ns         | *                     | ns                    | ns          |

\*\* – p-value < 0,01

\* – p-value < 0,05

ns – Diferenças não significativas estatisticamente

A análise da tabela mostra que ambos os fatores em estudo revelaram efeito significativo nas diversas propriedades tecnológicas avaliadas, enquanto a interação dos dois apenas revelou efeito significativo na firmeza do gel em momentos próximos do início da floculação (*A<sub>20</sub>*).

#### 4.1.1. Atividade coagulante

Verificando os dados presentes na Tabela 4 e o gráfico da Figura 3, é possível concluir que a solução de NaCl 20% teve influência significativa na atividade coagulante, originando a atividade coagulante mais baixa desde o início dos ensaios. Nos últimos meses de ensaio, verificou-se que está foi significativamente mais baixa para esta solução quando comparada com as restantes formulações, como se observa claramente na Figura 3.

No tempo 3 meses, também se verificou que a solução de NaCl 5% apresentou valores mais baixos de *AC*, relativamente às duas soluções tampão testadas. Isto poderá ser um indicador de que as soluções salinas, embora conservando a *AC* ao longo do tempo, afecta as propriedades coagulantes das enzimas quando em comparação com as restantes soluções

#### 4 – Resultados e discussão

testadas. Estas parecem induzir algum acréscimo de AC com a conservação, embora as diferenças não sejam significativas.

Tabela 4 - Valores médios da atividade coagulante para cada solução ao longo do tempo (IUMC.mL<sup>-1</sup>).

| <i>Tempo (meses)</i> | <i>NaCl 20%</i>    | <i>NaCl 5%</i>     | <i>Sol. T. Citrato</i> | <i>Sol. T. Acetato</i> |
|----------------------|--------------------|--------------------|------------------------|------------------------|
| 0                    | 2,15 <sup>aA</sup> | 3,5 <sup>aA</sup>  | 3,2 <sup>aA</sup>      | 3,45 <sup>aA</sup>     |
| 1,5                  | 1,6 <sup>aA</sup>  | 2,9 <sup>aA</sup>  | 3,1 <sup>aA</sup>      | 3,2 <sup>aA</sup>      |
| 3                    | 2,05 <sup>aB</sup> | 3,5 <sup>aB</sup>  | 4,3 <sup>aA</sup>      | 4,25 <sup>aA</sup>     |
| 4,5                  | 1,4 <sup>aB</sup>  | 3,55 <sup>aA</sup> | 4 <sup>aA</sup>        | 4,15 <sup>aA</sup>     |

Nota: Letras minúsculas diferentes em cada coluna significam uma diferença significativa. Letras maiúsculas diferentes em cada linha significam uma diferença significativa.

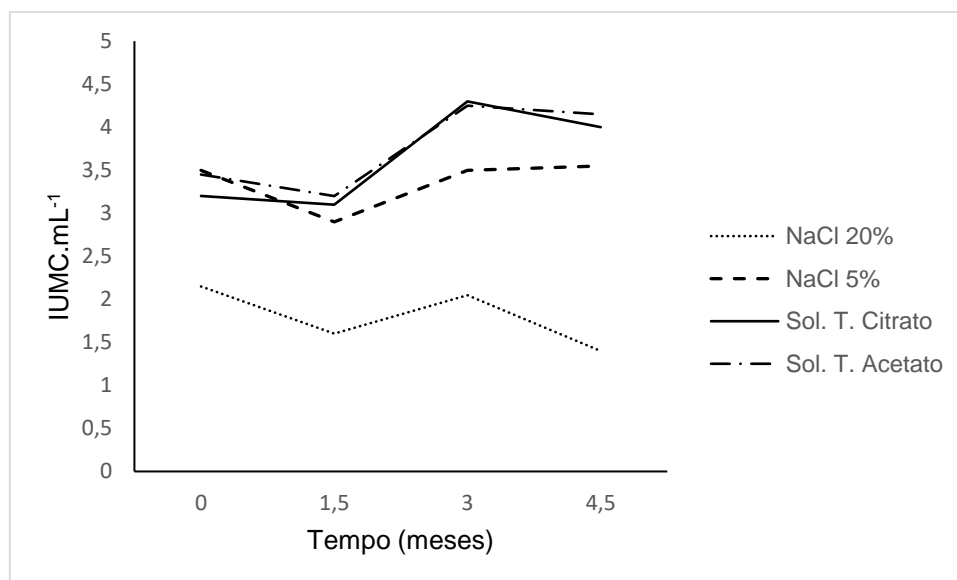


Figura 3 – Evolução dos valores médios da atividade coagulante para cada solução ao longo do tempo.

A AC relaciona-se com o parâmetro R (tempo de início de floculação), analisado em seguida.

#### 4.1.2. Medidas obtidas a partir do Optigraph®

- Parâmetro R – Tempo de início da floculação

A diferença significativa associada ao tempo (meses), para a variável R, tempo de início da floculação, está associada à formulação de NaCl 20%; o tempo de conservação afetou o tempo de início da floculação, verificando-se um aumento deste tempo característico, relacionado com uma diminuição da atividade coagulante.

Tabela 5 - Valores médios do tempo de início da floculação (R), em segundos, para cada solução, ao longo do tempo.

| <i>Tempo (meses)</i> | <i>NaCl 20%</i>    | <i>NaCl 5%</i>    | <i>Sol. T. Citrato</i> | <i>Sol. T. Acetato</i> |
|----------------------|--------------------|-------------------|------------------------|------------------------|
| 0                    | 959 <sup>bA</sup>  | 837 <sup>aA</sup> | 640 <sup>aA</sup>      | 746 <sup>aA</sup>      |
| 1,5                  | 1396 <sup>aA</sup> | 918 <sup>aB</sup> | 863 <sup>aB</sup>      | 887 <sup>aB</sup>      |
| 3                    | 1460 <sup>aA</sup> | 861 <sup>aB</sup> | 825 <sup>aB</sup>      | 831 <sup>aB</sup>      |
| 4,5                  | 1271 <sup>aA</sup> | 716 <sup>aA</sup> | 859 <sup>aA</sup>      | 679 <sup>aA</sup>      |

Nota: Letras minúsculas diferentes em cada coluna significam uma diferença significativa. Letras maiúsculas diferentes em cada linha significam uma diferença significativa.

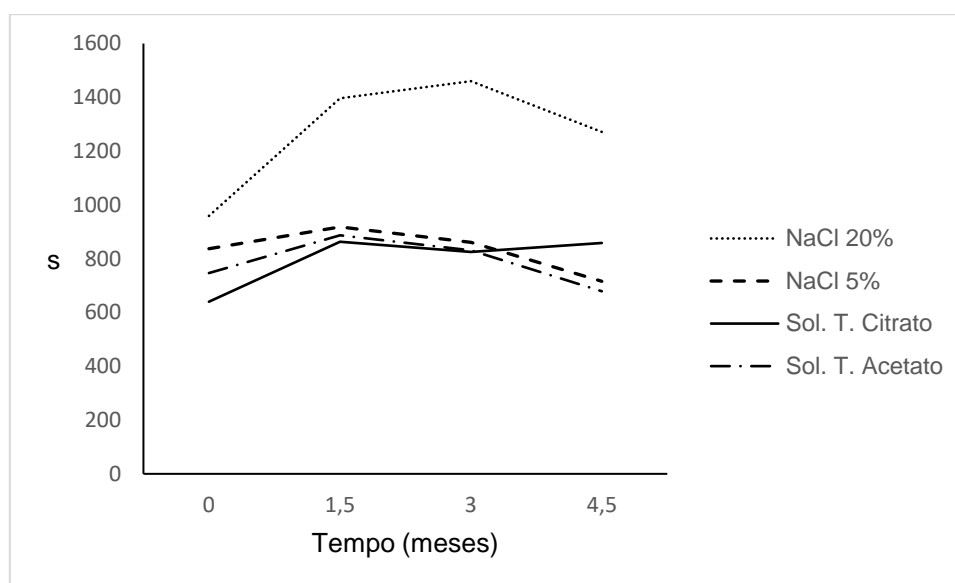


Figura 4 - Evolução dos valores médios do tempo de início da floculação (R), em segundos, ao longo do tempo de conservação.

Para a solução de NaCl 20% verificou-se que no momento inicial (0 meses), o tempo de início da floculação foi de 959 s, no segundo momento (1,5 meses), este tempo aumentou para 1396 s, o que se refletiu num aumento significativo ( $p\text{-value} < 0,01$ ), de 45,6% do tempo

#### 4 – Resultados e discussão

de início de floculação, que se reflete numa perda de atividade coagulante acentuada, mantendo-se estatisticamente estável até ao final do ensaio (4,5 meses).

Em todas as outras formulações ocorreu genericamente algo de semelhante, embora o aumento de R tenha tido menor expressão.

Nos tempos 1,5 meses e 3 meses verificou-se que o tempo de início de floculação para a solução de NaCl 20% foi significativamente mais elevado do que para as restantes soluções.

- Parâmetro AR - firmeza do gel (medida em equivalente de atenuação do sinal óptico, em Volt) medida ao fim de um tempo igual ao dobro do tempo de coagulação

O parâmetro AR é uma medida de firmeza do gel após o dobro do tempo de início da floculação, ou seja, depende desse tempo (R), e está tecnologicamente associado ao momento de corte da coalhada para queijos de pasta mole.

Uma vez que é uma medida dependente de R, está afetada por este; o que se verificou é que a tendência geral foi de diminuição desta medida de firmeza do gel com o tempo, na medida em que os valores de R foram aumentando com o tempo de conservação, sendo os valores significativamente inferiores para o final do tempo de conservação.

Nos dois últimos ensaios (3 meses e 4,5 meses), a solução de NaCl 5% mostrou ter uma consistência superior às restantes. O tempo não demonstrou ter uma influência estatisticamente significativa.

Tabela 6 - Valores médios de AR (V) para cada formulação ao longo do tempo.

| <i>Tempo (meses)</i> | <i>NaCl 20%</i>    | <i>NaCl 5%</i>     | <i>Sol. T. Citrato</i> | <i>Sol. T. Acetato</i> |
|----------------------|--------------------|--------------------|------------------------|------------------------|
| 0                    | 0,96 <sup>aA</sup> | 1,68 <sup>aA</sup> | 1,08 <sup>aA</sup>     | 1,75 <sup>aA</sup>     |
| 1,5                  | 1,75 <sup>aA</sup> | 1,58 <sup>aA</sup> | 1,23 <sup>aA</sup>     | 1,43 <sup>aA</sup>     |
| 3                    | 1,47 <sup>aB</sup> | 2,06 <sup>aA</sup> | 1,39 <sup>aB</sup>     | 1,16 <sup>aB</sup>     |
| 4,5                  | 1,34 <sup>aB</sup> | 1,97 <sup>aA</sup> | 1,37 <sup>aB</sup>     | 1,25 <sup>aB</sup>     |

Nota: Letras minúsculas diferentes em cada coluna significam uma diferença significativa. Letras maiúsculas diferentes em cada linha significam uma diferença significativa.

#### 4 – Resultados e discussão

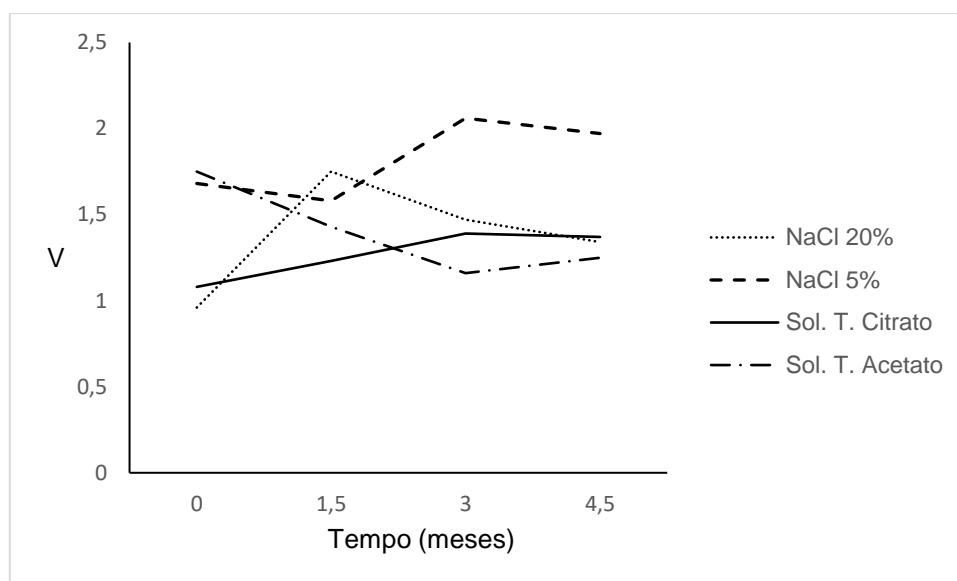


Figura 5 – Valores médios de AR (V) para cada uma das formulações, ao longo do tempo.

- Parâmetro A2R - intensidade do sinal ótico (em Volt) quando decorreu um tempo igual ao triplo do tempo de coagulação

Tal como o parâmetro AR, o A2R também depende do tempo de início da floculação, simplesmente é medido ao fim de um período de aumento de firmeza mais longo, o que dilui o efeito das diferenças de R. Este parâmetro está tecnologicamente associado à firmeza de gel adequada ao corte no caso dos queijos de pasta mais dura.

Nestes ensaios, verificou-se que para o parâmetro A2R, a solução de NaCl 5%, no tempo 3 meses, apresentou uma consistência do gel significativamente superior ao que se verificou para as restantes formulações testadas. Ao longo do tempo, este parâmetro tecnológico não variou significativamente em função das formulações.

Tabela 7 - Valores médios de A2R (V) para as diferentes formulações ao longo do tempo.

| <i>Tempo (meses)</i> | <i>NaCl 20%</i>    | <i>NaCl 5%</i>     | <i>Sol. T. Citrato</i> | <i>Sol. T. Acetato</i> |
|----------------------|--------------------|--------------------|------------------------|------------------------|
| 0                    | 1,6 <sup>aA</sup>  | 2,73 <sup>aA</sup> | 1,75 <sup>aA</sup>     | 1,47 <sup>aA</sup>     |
| 1,5                  | 2,83 <sup>aA</sup> | 2,56 <sup>aA</sup> | 2,05 <sup>aA</sup>     | 2,32 <sup>aA</sup>     |
| 3                    | 2,39 <sup>aB</sup> | 3,3 <sup>aA</sup>  | 2,26 <sup>aB</sup>     | 1,85 <sup>aB</sup>     |
| 4,5                  | 2,19 <sup>aA</sup> | 3,09 <sup>aA</sup> | 2,15 <sup>aA</sup>     | 1,94 <sup>aA</sup>     |

Nota: Letras minúsculas diferentes em cada coluna significam uma diferença significativa. Letras maiúsculas diferentes em cada linha significam uma diferença significativa.

#### 4 – Resultados e discussão

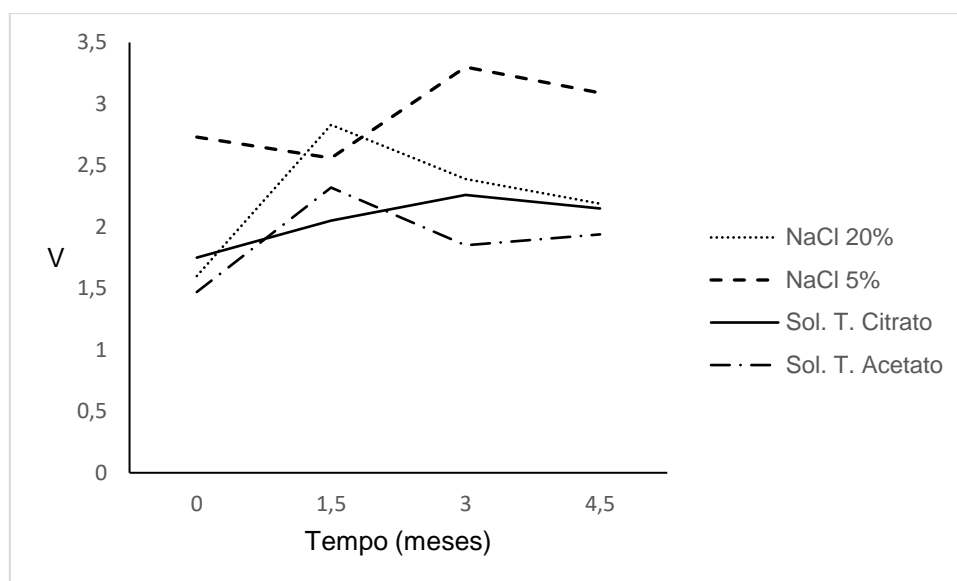


Figura 6 - Valores médios de A<sub>2R</sub> (V) ao longo do tempo, para cada uma das formulações.

- Parâmetro A<sub>20</sub> - firmeza do gel (em Volt) após 20 minutos de ensaio

Analisando os resultados relativos à consistência da coalhada após 20 minutos de ensaio, conclui-se que o tempo apresenta uma influência significativa apenas para a solução de NaCl 5%, observando-se um aumento significativo da consistência no último tempo de ensaio. Isto relaciona-se com facto do tempo de início de floculação (R), ter sido mais baixo neste tempo (716 segundos – Tabela 5); ao ser mais baixo torna possível que a coalhada se encontre mais consistente aos 20 minutos de ensaio.

Tabela 8 - Valores médios de A<sub>20</sub> (V) para cada formulação ao longo do tempo.

| <i>Tempo (meses)</i> | <i>NaCl 20%</i>   | <i>NaCl 5%</i>     | <i>Sol. T. Citrato</i> | <i>Sol. T. Acetato</i> |
|----------------------|-------------------|--------------------|------------------------|------------------------|
| <i>0</i>             | 0,3 <sup>aB</sup> | 0,8 <sup>bB</sup>  | 0,97 <sup>aA</sup>     | 0,58 <sup>aB</sup>     |
| <i>1,5</i>           | 0 <sup>aA</sup>   | 0,58 <sup>bA</sup> | 0,59 <sup>aA</sup>     | 0,59 <sup>aA</sup>     |
| <i>3</i>             | 0 <sup>aB</sup>   | 0,92 <sup>bA</sup> | 0,68 <sup>aB</sup>     | 0,56 <sup>aB</sup>     |
| <i>4,5</i>           | 0 <sup>bB</sup>   | 1,44 <sup>aA</sup> | 1,26 <sup>bA</sup>     | 1,02 <sup>bA</sup>     |

Nota: Letras minúsculas diferentes em cada coluna significam uma diferença significativa. Letras maiúsculas diferentes em cada linha significam uma diferença significativa.

#### 4 – Resultados e discussão

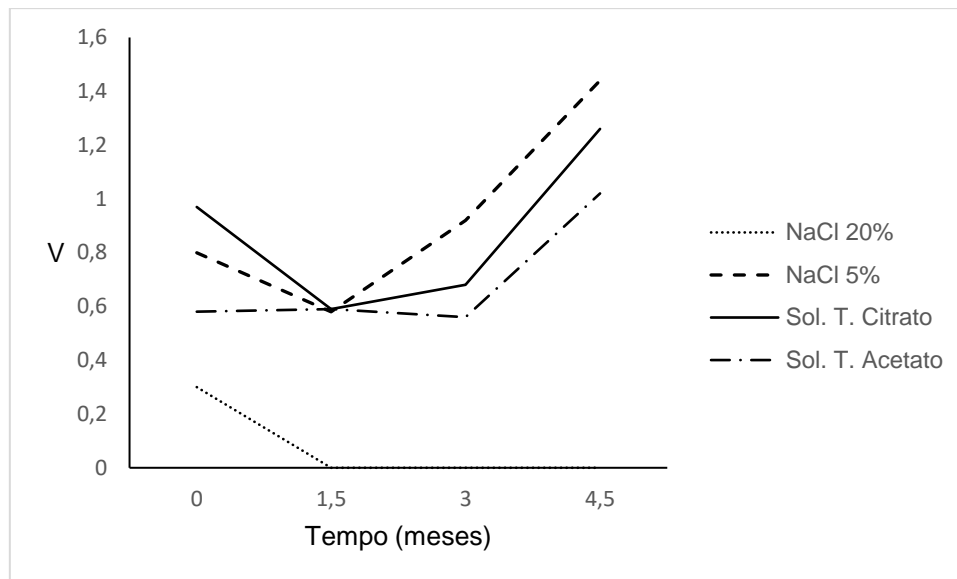


Figura 7 – Valores médios de  $A_{20}$  (V) para cada formulação ao longo do tempo.

O tipo de solução também influenciou significativamente os resultados. No início dos ensaios, a formulação com tampão citrato apresentou também uma consistência superior às restantes soluções. Ao observar, no tempo 0, os tempos de início de coagulação R, verifica-se que o mais baixo é para a solução de citrato, como tal, naturalmente após 20 minutos, a coalhada já se encontraria mais consistente. Por outro lado, verifica-se que para a formulação com NaCl 20% a coagulação iniciou-se após os 20 minutos, donde os resultados apresentados mostram que neste momento ainda não havia firmeza da coalhada (tempos 1,5, 3 e 4,5 meses).

- Parâmetro  $A_{40}$  - firmeza do gel (V) após 40 minutos de ensaio

O parâmetro  $A_{40}$  é uma medida de firmeza do gel para a qual, de certa forma, a influência de R se atenua quando comparada com  $A_{20}$ . Para este parâmetro não se verificaram diferenças estatisticamente significativas em relação ao tempo, no entanto verificaram-se diferenças significativas associadas às soluções.

#### 4 – Resultados e discussão

Tabela 9 - Valores médios de  $A_{40}$  (V) para cada solução nos quatro tempos testados.

| <i>Tempo (meses)</i> | <i>NaCl 20%</i>    | <i>NaCl 5%</i>     | <i>Sol. T. Citrato</i> | <i>Sol. T. Acetato</i> |
|----------------------|--------------------|--------------------|------------------------|------------------------|
| 0                    | 1,27 <sup>aB</sup> | 2,63 <sup>aA</sup> | 2,11 <sup>aB</sup>     | 1,56 <sup>aB</sup>     |
| 1,5                  | 1,31 <sup>aA</sup> | 2,23 <sup>aA</sup> | 1,93 <sup>aA</sup>     | 2,04 <sup>aA</sup>     |
| 3                    | 1,02 <sup>aB</sup> | 3,07 <sup>aA</sup> | 2,18 <sup>aB</sup>     | 1,78 <sup>aB</sup>     |
| 4,5                  | 1,21 <sup>aB</sup> | 3,37 <sup>aA</sup> | 2,58 <sup>aA</sup>     | 2,19 <sup>aB</sup>     |

Nota: Letras minúsculas diferentes em cada coluna significam uma diferença significativa. Letras maiúsculas diferentes em cada linha significam uma diferença significativa.

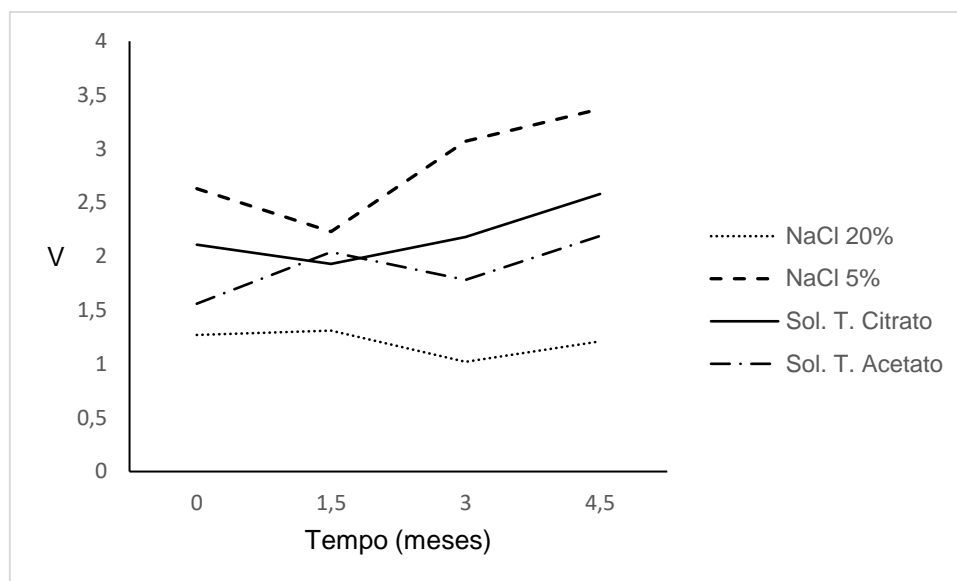


Figura 8 - Valores médios de  $A_{40}$  (V) para cada formulação ao longo do tempo.

A formulação NaCl 20% revelou sempre os menores valores de firmeza, que se mantiveram relativamente constantes ao longo do tempo de conservação.

No início, a solução de NaCl 5% apresentou um valor significativamente superior de  $A_{40}$  relativamente às restantes formulações, o mesmo se passando no tempo 3. No último tempo de ensaio (4,5 meses), as soluções de NaCl 5% e de tampão citrato, foram as que proporcionaram uma consistência superior após 40 minutos de ensaio.

#### 4 – Resultados e discussão

- Parâmetro 0K20 - tempo de ensaio (em segundos) necessário para se obter uma consistência padrão

O parâmetro 0K20 é uma medida importante, que proporciona indicações acerca da taxa de agregação micelar, sobretudo dependente da quantidade e qualidade da proteína, bem como da ação dos coagulantes sobre a fração caseínica. Dado que sofre influência de vários fatores, apresenta, em geral, valores médios com desvios padrão elevados, o que se reflete frequentemente em diferenças estatisticamente não significativas.

De facto, para este parâmetro não foram observadas quaisquer diferenças estatisticamente significativas, apesar de numericamente se registarem algumas diferenças acentuadas nos valores médios obtidos.

Tabela 10 – Valores médios de 0K20, para cada formulação ao longo do tempo.

| <i>Tempo (meses)</i> | <i>NaCl 20%</i> | <i>NaCl 5%</i> | <i>Sol. T. Citrato</i> | <i>Sol. T. Acetato</i> |
|----------------------|-----------------|----------------|------------------------|------------------------|
| 0                    | 2826            | <b>1205</b>    | 1732                   | 2710                   |
| 1,5                  | <b>1368</b>     | 1604           | 1776                   | 1595                   |
| 3                    | 2677            | <b>1090</b>    | 1799                   | 2604                   |
| 4,5                  | 3169            | <b>1148</b>    | 1657                   | 2310                   |

Nota: Valores de tempo mais baixos em linha encontram-se destacados a negrito.

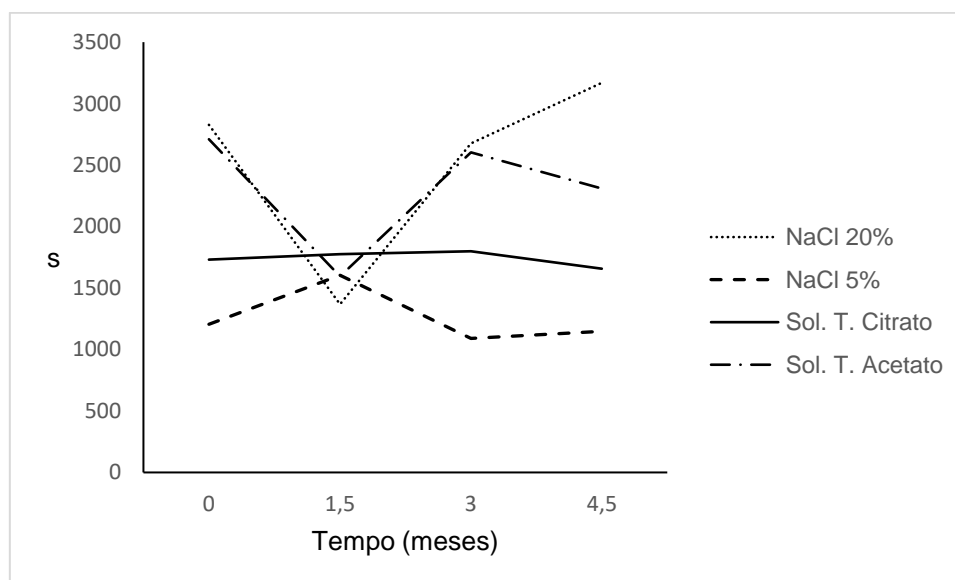


Figura 9 - Valores médios de 0K20 para cada formulação ao longo do tempo.

Na Tabela 10, encontram-se destacados os valores mais baixos, que indicam os casos em que a taxa de agregação micelar foi mais elevada, isto é, em que a estruturação micelar da coalhada foi mais rápida.

Verifica-se que estes valores se mostraram mais baixos para a formulação NaCl 5% nos tempos 0, 3 e 4,5 meses, o que vai de encontro com o facto desta solução ter demonstrado atingir uma consistência superior antes das restantes, observado aquando da análise dos parâmetros acima referidos.

### **4.1.3. Conclusões parciais**

Os resultados obtidos para as propriedades tecnológicas dos extratos de cardo mostraram alguma superioridade para o extrato obtido com a solução de NaCl 5%, quer no início quer nos momentos monitorizados ao longo da conservação, mesmo que considerando alguma flutuação pontual dos resultados.

A atividade coagulante, medida por processo padronizado, mostrou que a preparação do extrato com solução de NaCl 20% é muito penalizadora, reduzindo muito esta atividade logo no início do ensaio. As outras soluções mostraram maior atividade, praticamente ao mesmo nível quer no início quer ao longo da conservação.

As propriedades tecnológicas avaliadas através da monitorização dos ensaios de fabrico de queijo com o Optigraph, em contexto mais real de fabrico, designadamente em termos do pH do leite, confirmaram que a solução de NaCl 20% foi extremamente penalizadora para o início da floculação. Isto é, a redução de atividade coagulante padronizada é potenciada a valores de pH comuns em leite.

Para todas as medidas de firmeza do gel (coágulo), o extrato obtido com a solução de NaCl 5% mostrou-se sempre superior, conduzindo a valores superiores de firmeza, o que significa a obtenção de coágulos de melhor qualidade, mais fáceis de trabalhar e com melhores condições de dessoramento. A extração com as soluções tampão não mostrou diferenças entre elas e a solução NaCl 20% conduziu aos piores resultados. A velocidade de agregação micelar confirma estes resultados; a solução NaCl 5% apresentou melhores resultados, em paralelo com o tampão citrato.

#### 4.2. Caracterização microbiológica dos extratos de flor de cardo

A Tabela 11 resume a análise de variância efetuada relativamente à caracterização microbiológica das formulações, tendo como fatores a formulação e o tempo de conservação.

Tabela 11 - Tabela-resumo da ANOVA, testando a influência das variáveis independentes Tempo e Solução para cada uma das variáveis relacionadas com a caracterização microbiológica dos extratos de flor de cardo.

|                        | <i>Log Meso.</i> | <i>Log Fungos</i> | <i>Log Bolores</i> | <i>Log Leveduras</i> |
|------------------------|------------------|-------------------|--------------------|----------------------|
| <i>Tempo</i>           | *                | ns                | ns                 | ns                   |
| <i>Solução</i>         | **               | ns                | ns                 | ns                   |
| <i>Tempo x Solução</i> | ns               | ns                | ns                 | ns                   |

\*\* – p-value < 0,01

\* – p-value < 0,05

ns – Diferenças não significativas

Nesta tabela observa-se que a formulação e a solução apenas influenciaram significativamente a contagem de mesófilos a 30°C. A interação dos dois fatores não revelou efeito significativo de diferenciação relativamente aos ensaios efetuados.

De seguida, discutem-se os resultados obtidos para os diferentes grupos microbianos monitorizados.

Também foi avaliada a contagem de Enterobacteriaceae e de microrganismos psicrotróficos mas não se registou presença destes grupos.

- Mesófilos Totais

Analisando a Tabela 12 e o gráfico da Figura 10, referentes ao logaritmo da contagem de mesófilos totais obtida para cada formulação, nos quatro períodos de tempo testados, observa-se que a solução de tampão citrato se mostrou mais resistente e com maior capacidade para, ao longo do tempo manter este tipo de contaminação num nível mais baixo.

#### 4 – Resultados e discussão

Tabela 12 - Valores médios do Log do número de mesófilos totais presentes (log ufc.mL<sup>-1</sup>) em cada formulação ao longo do tempo.

| <i>Tempo (meses)</i> | <i>NaCl 20%</i>   | <i>NaCl 5%</i>    | <i>Sol. T. Citrato</i> | <i>Sol. T. Acetato</i> |
|----------------------|-------------------|-------------------|------------------------|------------------------|
| 0                    | 1,5 <sup>A</sup>  | 1,93 <sup>A</sup> | 0,4 <sup>A</sup>       | 1,56 <sup>A</sup>      |
| 1,5                  | 0,89 <sup>A</sup> | 1,04 <sup>A</sup> | 0 <sup>B</sup>         | 0,71 <sup>A</sup>      |
| 3                    | 0,93 <sup>A</sup> | 1,27 <sup>A</sup> | 0 <sup>B</sup>         | 0,74 <sup>A</sup>      |
| 4,5                  | 1,2 <sup>A</sup>  | 1,15 <sup>A</sup> | 0,33 <sup>A</sup>      | 0,54 <sup>A</sup>      |

Nota: Letras maiúsculas diferentes em cada linha significam uma diferença significativa.

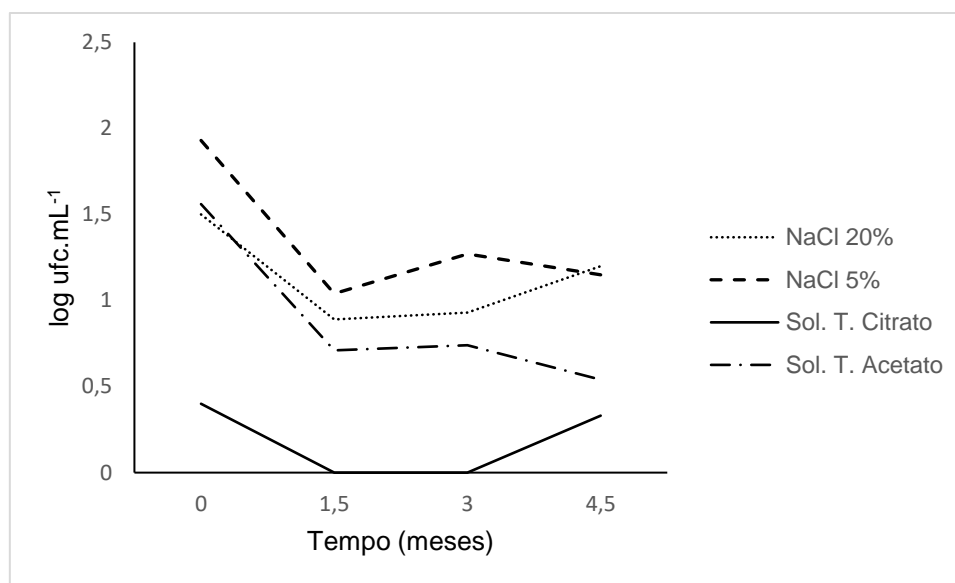


Figura 10 - Evolução ao longo do tempo dos valores médios do Log do número de mesófilos totais (log ufc.mL<sup>-1</sup>) para as diferentes formulações.

No geral, as contagens iniciais de mesófilos não ultrapassaram 1,5 - 2 log e diminuíram ao longo do tempo para todas as formulações. As soluções salinas proporcionaram os níveis mais elevados das formulações em avaliação.

- Fungos, bolores e leveduras

Os resultados da avaliação referente à componente dos fungos, bolores e leveduras dos extratos e respetiva evolução ao longo da conservação contam das Tabelas 13, 14 e 15 e das Figuras 11, 12 e 13.

#### 4 – Resultados e discussão

Tabela 13 - Valores médios do Log do número de fungos presentes (log ufc.mL<sup>-1</sup>) em cada formulação ao longo do tempo.

| <i>Tempo (meses)</i> | <i>NaCl 20%</i> | <i>NaCl 5%</i> | <i>Sol. T. Citrato</i> | <i>Sol. T. Acetato</i> |
|----------------------|-----------------|----------------|------------------------|------------------------|
| 0                    | 0,15            | 0,5            | 1,08                   | 0,45                   |
| 1,5                  | 0               | 0,15           | 0                      | 0,45                   |
| 3                    | 0               | 0              | 0                      | 0,15                   |
| 4,5                  | 0               | 0              | 0                      | 0                      |

Da análise da Tabela 13 e da Figura 11, verifica-se que a presença de fungos foi muito limitada desde o início dos ensaios e que a tendência foi de diminuição ao longo da conservação. As diferenças encontradas quer ao longo do tempo, quer entre tratamentos não foram significativas; ao fim de 4,5 meses, não foram detetados fungos nos extratos conservados.

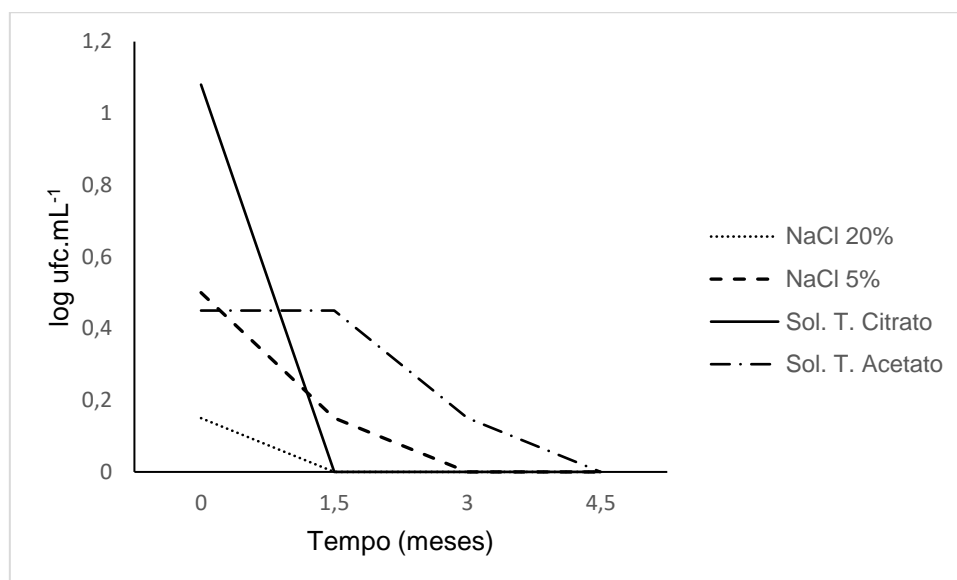


Figura 11 – Evolução ao longo do tempo dos valores médios do Log do número de fungos presentes (log ufc.mL<sup>-1</sup>) para cada formulação.

Do grupo dos fungos, separando as contagens de bolores (Tabela 14, Figura 12) das contagens de leveduras (Tabela 15, Figura 13), verifica-se que foram os bolores que contribuíram mais para os níveis de fungos registados. Os níveis de contaminação foram muito baixos e as diferenças ao longo do tempo e entre os tratamentos não foram significativas.

O grupo das leveduras apenas esteve representado nos extratos correspondentes ao início dos ensaios e o extrato efetuado com solução de NaCl 20% não registou presença de leveduras.

#### 4 – Resultados e discussão

Eventualmente estes resultados poderão ter alguma ligação com a adição a todos os extratos de sorbato de potássio (2%), como referido anteriormente, verificando-se que essa adição se poderá ter revelado eficiente.

Tabela 14 - Valores médios do Log do número de bolores presentes (log ufc.mL<sup>-1</sup>), para cada solução nos quatro tempos testados.

| <i>Tempo (meses)</i> | <i>NaCl 20%</i> | <i>NaCl 5%</i> | <i>Sol. T. Citrato</i> | <i>Sol. T. Acetato</i> |
|----------------------|-----------------|----------------|------------------------|------------------------|
| 0                    | 0,15            | 0,39           | 0,6                    | 1,33                   |
| 1,5                  | 0               | 0,15           | 0                      | 0,45                   |
| 3                    | 0               | 0              | 0                      | 0,15                   |
| 4,5                  | 0               | 0              | 0                      | 0                      |

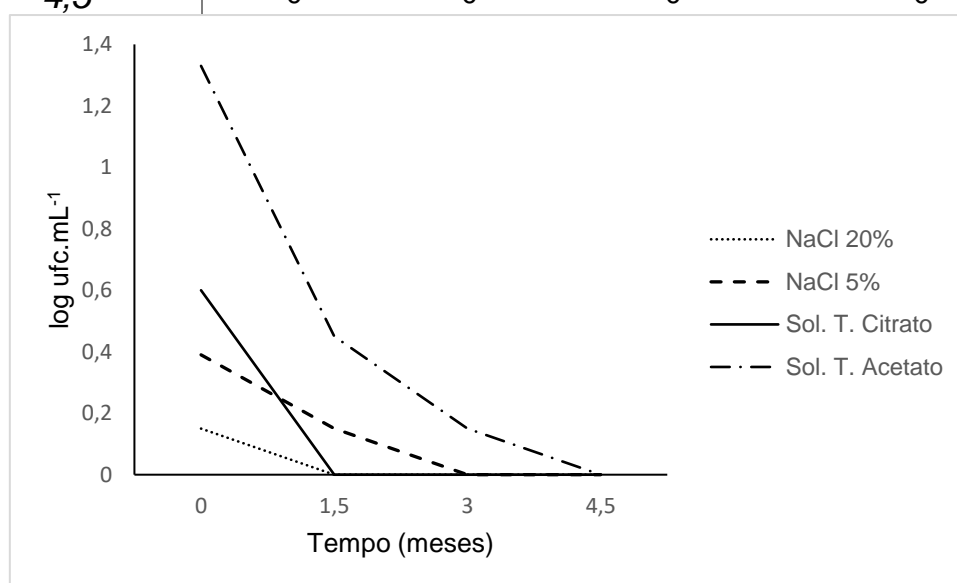


Figura 12 – Gráfico com os valores médios do Log do número de bolores presentes (log ufc.mL<sup>-1</sup>), para cada solução nos quatro tempos testados.

Tabela 15 - Valores médios do Log do número de leveduras presentes (log ufc.mL<sup>-1</sup>), para cada solução nos quatro tempos testados.

| <i>Tempo (meses)</i> | <i>NaCl 20%</i> | <i>NaCl 5%</i> | <i>Sol. T. Citrato</i> | <i>Sol. T. Acetato</i> |
|----------------------|-----------------|----------------|------------------------|------------------------|
| 0                    | 0               | 0,3            | 1,06                   | 1,33                   |
| 1,5                  | 0               | 0              | 0                      | 0                      |
| 3                    | 0               | 0              | 0                      | 0                      |
| 4,5                  | 0               | 0              | 0                      | 0                      |

#### 4 – Resultados e discussão

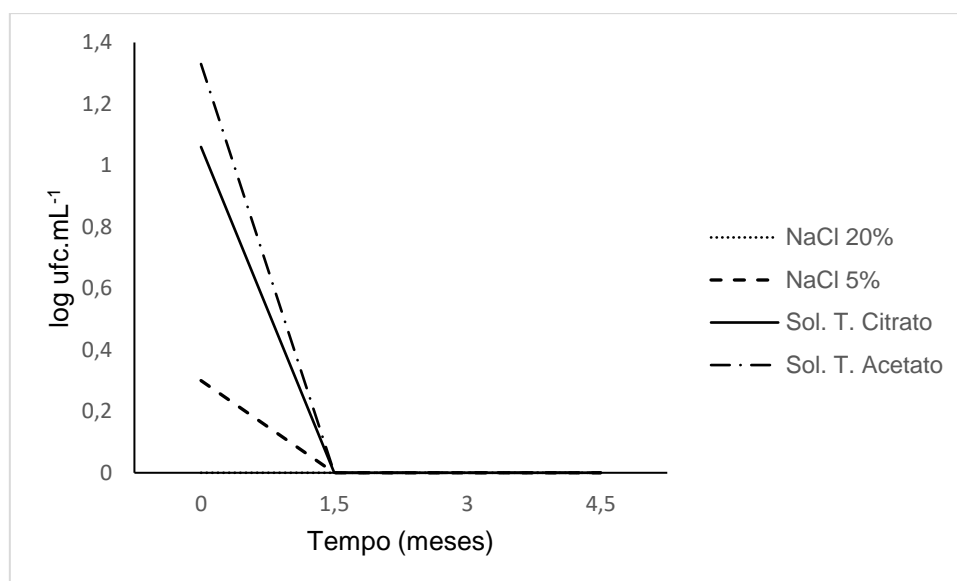


Figura 13 – Gráfico com os valores médios do Log do número de fungos presentes ( $\log \text{ufc.mL}^{-1}$ ), para cada solução nos quatro tempos testados.

##### 4.2.1. Conclusões parciais

Relativamente à análise microbiológica dos extratos de cardo, verificou-se que as contaminações foram muito baixas. Apesar de alguma contaminação inicial, muito baixa para a maioria dos microrganismos nas quatro soluções testadas, conclui-se que em termos microbiológicos as soluções se conservaram bem ao longo dos 4,5 meses de estudo.

Apenas houve diferenças estatisticamente significativas na análise de mesófilos totais. Neste caso, a solução de citrato mostrou ter maior capacidade antimicrobiana, com valores de logaritmo de mesófilos totais sempre mais baixos que as outras soluções e, nos tempos 1,5 e 3 meses, significativamente mais baixos.

Também foi feita a análise microbiológica para detetar microrganismos psicrotróficos e Enterobacteriaceae, no entanto devido às contagens extremamente baixas ou até inexistentes, não se procedeu a uma análise estatística desses dados.

### **4.3. Conclusões gerais**

De um modo geral, as soluções salinas apresentaram uma maior redução da AC, com valores estatisticamente mais baixos relativamente às duas soluções tampão, nos últimos tempos de estudo. O extrato obtido com solução NaCl 20% foi a mais penalizadora, mostrando-se pouco adequada para a extração. Esta solução foi a que apresentou pior desempenho quanto ao comportamento no fabrico de queijo, quer no início dos ensaios quer ao longo da conservação.

A solução de NaCl 5% mostrou-se como a solução mais adequada quer para a extração quer a nível da conservação; apresentou em vários momentos do estudo propriedades tecnológicas superiores, com uma consistência do gel superior às restantes soluções, fruto de uma maior velocidade de agregação micelar. Esta solução mostrou, na conservação, desempenho inferior relativamente à componente bacteriana. No entanto, os níveis microbianos registados estão muito aquém dos limites que acompanham as fichas técnicas da maioria das soluções coagulantes.

A preparação de extratos com solução tampão citrato mostrou razoável desempenho. Nos ensaios de conservação mostrou um bom desempenho a nível do controlo dos diferentes grupos microbianos e as propriedades tecnológicas foram pouco afetadas relativamente à generalidade dos parâmetros considerados.

### **4.4. Sugestões para trabalhos futuros**

Será importante que no futuro sejam estudados os aspetos acima mencionados relativamente ao efeito de outras formulações de extratos de cardo, como por exemplo outras soluções tampão ou soluções salinas com diferentes concentrações de sal, considerando a afinação da eficiência da extração, da extensão da conservação por períodos mais longos e o teste em outros tipos de leite, por exemplo de ovelha, pois este é muito utilizado em queijos DOP onde se usa o cardo como coagulante. Também seria importante a realização dos ensaios com mais réplicas, o que foi difícil por constrangimentos temporais, pois iria contribuir para uma acuidade dos resultados obtidos.

## 5. Referências Bibliográficas

Agboola, J. S., Chen, S., Zhao, J. (2004). Formation of bitter peptides during ripening of ovine milk cheese made with different coagulants. *Lait*, 84, 567-578.

Alcaraz, V. G., Rovira, S., Teruel, R., Roa, I., López, M. B. (2011). Empleo de coagulantes vegetales en leche de cabra murciano-granadina. *Anales de Veterinaria de Murcia*, 27, 73-84.

Almeida, C. M., Gomes, D., Faro, C., Simões, I. (2015). Engineering a cardosin B-derived rennet for sheep and goat cheese manufacture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(1), 269–281.

Almeida, C. M & Simões, I. (2018). Cardoon-based rennets for cheese production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102, 4675–4686.

Alonso, P. R. (2001). Caracterização do perfil proteolítico determinado pela utilização do cardo (*Cynara cardunculus* L.) em queijos de leite cru de ovelha. Relatório do trabalho de fim de curso de Engenharia Agro-Industrial.

Alves, S. M. (2003). Estudo do efeito de alguns factores tecnológicos na coagulação do leite com extractos de cardo (*Cynara cardunculus* L.). Trabalho de fim de Curso de Engenharia alimentar, ISA – UTL, Lisboa.

Amiot, J. (1991). Ciencia y tecnología de la leche: principios y aplicaciones. Acribia. Zaragoza.

Barros, M. T., Carvalho, M. G. V., Garcia, F. A. P., Pires, E. M. V. (1992). Stability performance of *Cynara cardunculus* L. acid protease in aqueous-organic biphasic systems. *Biotechnology letters*, 14(3), 179-184.

Barth, C. A. & Schlimme, E., (1989). Milk proteins: nutritional, clinical, functional and technological aspects. Darmstadt: Steinkopff Verlag

Brodelius, P. E., Heimgartner, U., Geertsen, R., Pietrzak, M., Pais, M. S. S., Figueiredo, C. (1988). Isolation and partial characterization of milk clotting proteases from dried flowers of *Cynara cardunculus* L.. *IV Congresso Nacional de Biotecnologia*, BV-1. Dezembro, Coimbra.

Broome, M. C., Xu, X., Mayes, J. J. (2006). Proteolysis in Cheddar cheese made with alternative coagulants. *Australian Journal of Dairy Technology*, 61, 85–87.

## 5 – Referências Bibliográficas

- Castanheira, P., Samyn, B., Sergeant, K., Clemente, J. C., Dunn, B. M., Pires, E., Van Beeumen, J., Faro, C. (2005). Activation, proteolytic processing, and peptide specificity of recombinant cardosin A. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(13), 13047–13054.
- Conceição, C., Martins, A. P. L., Alvarenga, N., Dias, J., Lamy, E., Garrido, L., Gomes, S., Freitas, S., Belo, A., Brás, T., Paulino, A., Duarte, M. F. (2018). *Cynara cardunculus*: Use in Cheesemaking and Pharmaceutical Applications. *Technological Approaches for Novel Applications in Dairy Processing Nurcan Koca, IntechOpen*.
- Correia, P., Vitor, A., Tenreiro, M., Correia, A. C., Pinto, A., Correia, P., Madanelo, J., Vacas, M., Guiné, R. (2014). Influence of Different Processing Parameters in Physical and Sensorial Properties of Serra De Estrela Cheese. *Journal of Hygienic Engineering and Design*, 8, 135-140.
- Correia, P., Vitor, A., Tenreiro, M., Correia, A. C., Madanelo, J., Guine, R. (2016). Effect of different thistle flower ecotypes as milk-clotting in Serra da Estrela cheese. *Nutrition & Food Science*, 46(4), 458–475.
- Christaki, E., Bonus, E., Florou-Paneri, P. (2012). Nutritional And Functional Properties of *Cynara* Crops (Globe Artichoke and Cardoon) and Their Potential Applications: A Review. *International Journal of Applied Science and Technology*, 2 (2), 64-70.
- Cynara cardunculus* L. – Flora On. Disponível em: <http://flora-on.pt/#/1cynara+cardunculus>. Consultado a: 15 de Junho de 2018.
- Duarte, P., Figueiredo, R., Pereira, S., Pissarra, J. (2006). Structural characterization of the stigma-style complex of *Cynara cardunculus* (Asteraceae) and immunolocalization of cardosins A and B during floral development. *Canadian Journal of Botany* 84(5), 737-749.
- Dunn, B. M. (2002). Structure and mechanism of the pepsin-like family of aspartic peptidases. *Chemical Reviews*, 102, 4431-4458.
- Eck, A. (1987). O queijo. Volume 1. Coleções Euro-Agro. Publicações Europa-América.
- Faro, C., Verissimo, P., Lin, Y., Tang, J., Pires, E. (1995). Cardosin A and B, aspartic proteinases from the flowers of cardoon. In *Aspartic Proteinases: Structure, Function, Biology and Biomedical Implications* (Takahashi, K., ed.), pp. 374–377, Plenum Press, New York.

## 5 – Referências Bibliográficas

- Fernández-Salguero, J., Tejada, L., Gomez, R. (2002). Use of powdered vegetable coagulant in the manufacture of ewe's milk cheeses. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(4), 464–468.
- Fernández-Salguero, J., Prados, F., Calixto, F., Vioque, M., Sampaio, P., Tejada, L. (2003). Use of recombinant cyprosin in the manufacture of ewe's milk cheese. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 51(25), 7426–7430.
- Fernández-Salguero, J. & Sanjuán, E. (1999). Influence of vegetable and animal rennet on proteolysis during ripening in ewes' milk cheese. *Food Chemistry*, 64(2), 177-183.
- Fernández-Salguero, J., Sánchez, E., Gomez, R., Mata, C., Vioque, M., Tejada, L. (1999). A preliminary study of microbiological quality of cardoons *Cynara L.* used in the manufacture of traditional cheeses. *Milchwissenschaft*, 54(12), 688-690.
- Galán, E., Prados, F., Pino, A., Tejada, L., Fernández-Salguero, 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.
- Gomes, S. (2012). Qualidade do leite cru de ovinos da área geográfica de produção do Queijo Terrincho DOP (Trás-os-Montes): dos factores de produção animal à qualidade do queijo. Relatório Final de Estágio Profissional para obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar, Escola Superior Agrária de Bragança.
- Heimgartner, U., Pietrzak, M., Geertsen, R., Brodelius, P., Figueiredo, A.C. da S., Pais, M. S. S. (1990). Purification and partial characterization of milk clotting proteases from flowers of *Cynara cardunculus*. *Phytochemistry*, 29 (5), 1405-1410.
- ISO 4833-1 (2013). Microbiology of the food chain – Horizontal method for the enumeration of microorganisms – Part 1: Colony count at 30°C by the pour plate technique. ISO, Geneva.
- ISO 6730|IDF 101 (2005). Milk – Enumeration of colony-forming units of psychrotrophic microorganisms – Colony-count technique at 6,5 °C. ISO, Geneva, IDF, Brussels.
- ISO 7218 (2007). Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examinations.
- ISO 21527-2 (2008). Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds – Part 2: Colony count technique in products with water activity less than or equal to 0,95. ISO, Geneva.

## 5 – Referências Bibliográficas

- ISO 21528-2 (2004). Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae – Part 2: Colony-count method. ISO, Geneva.
- ISO 23058|IDF 199 (2006). Milk and milk products - Ovine and caprine rennets – determination of total milk clotting activity. ISO, Geneva; IDF, Brussels.
- Jacob, M., Jaros, D., Rohm, H. (2010). The effect of coagulant type on yield and sensory properties of semihard cheese from laboratory-, pilot- and commercial-scale productions. *International Journal of Dairy Technology*, 63 (3), 370-380.
- Jacob, M., Jaros, D., Rohm, H. (2011). Recent advances in milk clotting enzymes. *International Journal of Dairy Technology*, 64 (1), 14–33.
- Luquet F. M. (1985). O Leite – Leites, queijos e produtos derivados. Vol. 2, Coleção EUROAGRO, Publicações Europa-América, Lda., Mem Martins.
- Macedo, I. Q., Faro, C. J., Pires, E. V. (1993). Specificity and kinetics of the milk-clotting enzyme from cardoon (*Cynara cardunculus* L.) toward bovine K-casein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, 1537–1540.
- Macedo, I. Q., Faro, C. J., Pires, E. V. (1996). Caseinolytic Specificity of Cardosin, an Aspartic Protease from the Cardoon *Cynara cardunculus* L.: Action on Bovine  $\alpha_s$ - and  $\beta$ -Casein and Comparison with Chymosin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 42-47.
- Martins, A. P. L. (1999). A flor de cardo (*Cynara cardunculus* L.) como agente coagulante no fabrico de queijo. Caracterização e influência dos processos de conservação na actividade coagulante. Dissertação apresentada ao ISA para prestação de provas de doutoramento em Engenharia Agro-Industrial, ISA-UTL, Lisboa.
- Martins, A. P. L. (2006). O papel do cardo na tecnologia tradicional de fabrico de queijo - Efeito dos principais factores tecnológicos. Comunicação apresentada em Portalegre, no âmbito do Projecto Leader+ “Cardum”.
- Martins, A. P. L., Vasconcelos, M. M., Sousa, R. B. (1996). Thistle (*Cynara cardunculus* L.) flower as a coagulant agent for cheesemaking. Short characterization. *Lait*, 76, 473-477.

## 5 – Referências Bibliográficas

- Martins, S. M. C. (2011). Expressão de cardosinas A e B em linhas transgênicas de *Arabidopsis thaliana*: caracterização fenotípica e imunolocalização em flores. Trabalho de fim de Curso de Fisiologia Molecular de Plantas, FCUP, Porto.
- Pimentel, C., Van Der Straeten, D., Pires, E., Faro, C., Rodrigues-Pousada, C. (2007). Characterization and expression analysis of the aspartic protease gene family of *Cynara cardunculus* L. *FEBS Journal* 274, 2523-2539.
- Pina, D. G., Oliveira, C. S., Sarmiento, A. C., Barros, M., Pires, E., Zhadan, G. G., Villar, E., Gavilanes, F., Shnyrov, V. L. (2003). Thermostability of cardosin A from *Cynara cardunculus* L. *Thermochimica acta*, 402(1-2), 123-134.
- Pino, A., Prados, F., Galán, E., McSweeney, P. L., 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.
- Pires, E. F. C., Macedo, I., Esteves, C., Morgado, M., Veríssimo, P., Pereira, D., Gomes, D. (1994). Flor do cardo versus quimosina no fabrico de queijos artesanais. *Química — Bol. Soc. Port. Química*, 54, 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 & Technology*, 42(5), 556-561.
- Ramalho-Santos, M., Pissarra, J., Veríssimo, P., Pereira, S., Salema, R., Pires, E., Faro, C. J. (1997). Cardosin A, an abundant aspartic proteinase, accumulates in protein storage vacuoles in stigmatic papillae of *Cynara cardunculus*. *Planta*, 203, 204-212
- Roseiro, L., 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.
- Sarmiento, A. C., Lopes, H., Oliveira, C.S., Vitorino, R., Samyn, B., Sergeant, K., Debyser, G., Beeumen, J. V., Domingues, P., Amado, F., Pires, E., Domingues, M. R. M, Barros, M.T. (2009). Multiplicity of aspartic proteinases from *Cynara cardunculus* L. *Planta*, 230, 429-439.
- Sarmiento, A. C., Oliveira, C. S., Duarte, A. S., Pires, E., Barros, M. T. (2006). Evaluation of cardosin A as a probe for limited proteolysis in non-aqueous environments—complex substrates hydrolysis. *Enzyme and microbial technology*, 38(3-4), 415-421.

## 5 – Referências Bibliográficas

- Shah, M., Ahmad, S., Paray, M. (2014). Plant proteases as milk-clotting enzymes in cheesemaking: a review. *Dairy Science & Technology*, 94, 5-16.
- Shnyrova, A. V., Oliveira, C. S., Sarmiento, A. C., Barros, M. T., Zhadan, G. G., Roig, M. G., Shnyrov, V. L. (2006). Effect of acetonitrile on *Cynara cardunculus* L. cardosin A stability. *International journal of biological macromolecules*, 39(4-5), 273-279.
- Silva, S. V. & Malcata, F. X. (1998). Proteolysis of ovine caseins by cardosin A, an aspartic acid proteinase from *Cynara cardunculus* L.. *Lait*, 78, 513-519.
- Silva, S. V. & Malcata, F. X. (2005). Studies pertaining to coagulant and proteolytic activities of plant proteases from *Cynara cardunculus*. *Food Chemistry*, 89(1), 19-26.
- Sousa, M. J. & Malcata, F. X. (1998). Proteolysis of ovine and caprine caseins in solution by enzymatic extracts from flowers of *Cynara cardunculus*. *Enzyme and Microbial Technology*, 22(5), 305-314.
- 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
- Tavaria, F. K., Sousa, M. J., Malcata, F. X. (1997). Effect of storage and lyophilization on ovine and caprine casein degradation by extracts of *Cynara cardunculus* L.. In: 3º Encontro de Química de Alimentos - Alimentação Mediterrânica. Faro. 346–8.
- Tavaria, F. K., Sousa, M. J., Malcata, F. X (2001). Storage and lyophilization effects of extracts of *Cynara cardunculus* on the degradation of ovine and caprine caseins. *Food Chemistry*, 72, 79-88.
- Tejada, L. & Fernández-Salguero, J. (2003). Characteristics of ewe milk cheese (Los Pedroches) made with a powdered vegetable coagulant or calf rennet. *Italian Journal of Food Science*, 15(1), 125-132.
- 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(2), 139-146.
- Tejada, L., Vioque, M., Gomez, R., Fernández-Salguero, J. (2008). Effect of lyophilisation, refrigerated storage and frozen storage on the coagulant activity and microbiological quality of *Cynara cardunculus* L. extracts. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(8), 1301–1306.

## 5 – Referências Bibliográficas

- Toelstede, S. & Hofmann, T. (2008). Sensomics mapping and identification of key bitter metabolites in Gouda cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 2795-2804.
- Tsouli J. (1974). Étude comparée de l'activité enzymatique de 3 variétés d'artichauls du genre *Cynara Cardunculus* L. sur la coagulation du lait. *Le Lait*, 537, 415-421.
- Veríssimo, P., Faro, C., Moir, A. J. G., Lin, Y., Tang, J., Pires, E. (1995). Purification, characterization and partial amino acid sequencing of two new aspartic proteinases from fresh flowers of *Cynara cardunculus* L.. *European Journal of Biochemistry*, 235, 762-768
- Vieira, M., Pissarra, J., Veríssimo, P., Castanheira, P., Costa, Y., Pires, E., Faro, C. (2001). Molecular cloning and characterization of cDNA encoding cardosin B, na aspartic proteinase accumulations extracellular in the transmitting tissue of *Cynara cardunculus* L.. *Plant Molecular Biology*, 45, 529-539
- Vieira de Sá, F. (1974). Cuajos vegetales. *Revista Española de Lecheria*, nº 92, Junho, 107-109.
- Vieira de Sá, F. & Barbosa, M. (1972). Cheese-making with a vegetable rennet from cardo (*Cynara cardunculus* L.). *Journal of Dairy Research*, 39, 335-343.
- Walstra, P. (1999). Casein sub-micelles: do they exist? *International Dairy Journal*, 9, 189-192.
- Walstra, P., Geurts, T. J., Noomen, A., Jellema, A., van Boekel, M. A. J. S. (1999). Dairy science and technology: principles of milk properties and processes. Marcel Dekker Inc. New York.
- Wiklund, A. (1992). The genus *Cynara* L. (Asteraceae-Cardueae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 109, 75-123.
- Ysebaert (2000). Optigraph – User's manual. Dairy Division.