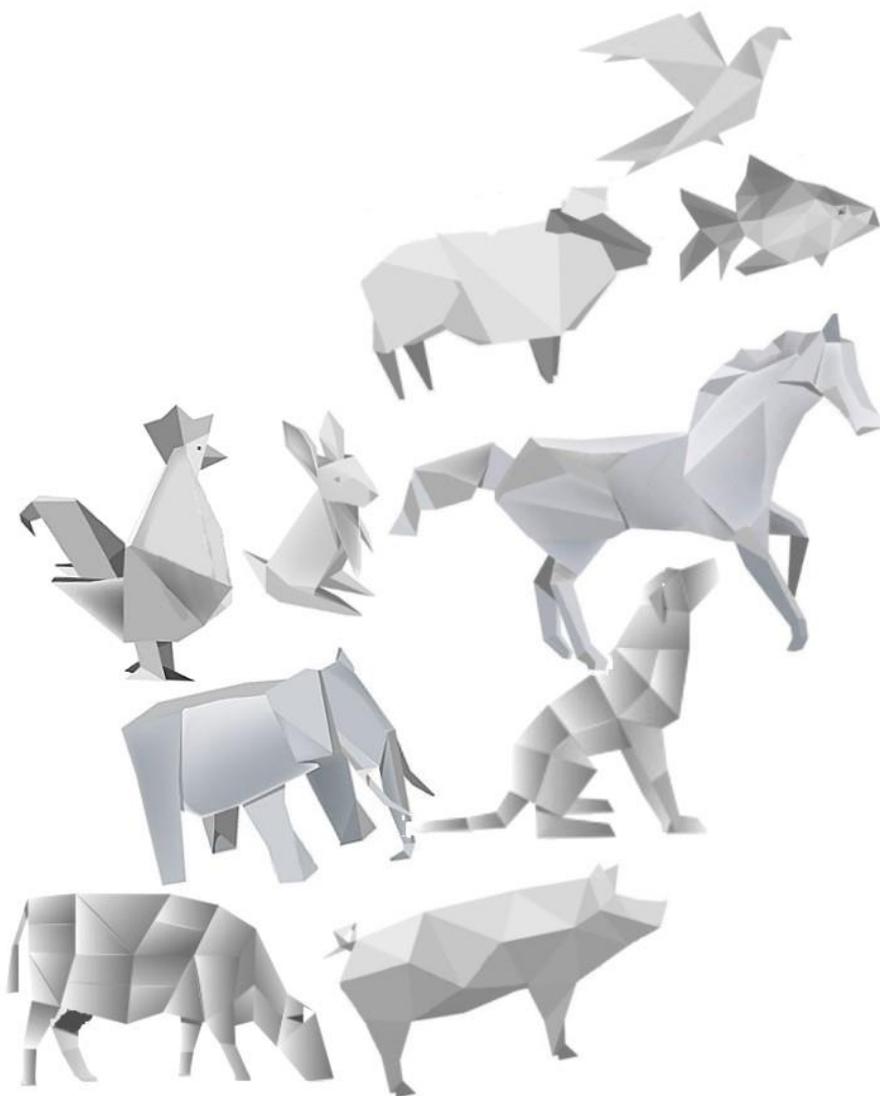


# Revista Portuguesa de Zootecnia



## Ficha Técnica

### Director:

Ana Sofia Santos

### Editor:

Ana Sofia Santos

### Editor adjunto:

Mariana Almeida

### Propriedade:

Associação Portuguesa de Engenharia  
Zootécnica (APEZ)

Apartado 60, 5001-909 Vila Real

### Composição e Montagem:

Telma G. Pinto

### Design Gráfico:

Mariana Almeida e Telma G. Pinto

### Contactos:

Apartado 60,  
5001-909 Vila Real

rpz@apez.pt

912 239 527



A publicação deste número foi possível graças ao apoio da Comissão Científica do XXI ZOOTECH – 21º Congresso Nacional de Zootecnia.

## EFEITO DO EXTRATO AQUOSO DE *CYNARA CARDUNCULUS* L. NA DEGRADAÇÃO, HIDRÓLISE E PERFIL DE CASEÍNAS DO QUEIJO SERPA

Garrido, A.<sup>1</sup>, Silva, F.<sup>1</sup>, Pinheiro, C.<sup>1,2</sup>\*, Alvarenga, B.<sup>3,4,5</sup>, Dias, J.<sup>3,6</sup>, Lage, P.<sup>3</sup>, Martins, A.<sup>4,5</sup>, Gomes, S.<sup>7</sup>, Duarte, F.<sup>2,8</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Zootecnia, Universidade de Évora, Polo da Mitra 7002-554, Évora, Portugal; <sup>2</sup>ICAAM, Universidade de Évora, 7006-554 Évora, Portugal; <sup>3</sup>ESA-Instituto Politécnico de Beja, 7800-295 Beja, Portugal; <sup>4</sup>UTI-INIAV, Quinta do Marquês, 2780-157 Oeiras, Portugal; <sup>5</sup>LEAF-ISA, Universidade de Lisboa, Tapada da Ajuda, 1349-017 Lisboa, Portugal; <sup>6</sup>GeoBioTec, Universidade Nova de Lisboa, Campus da Caparica, 2829-516 Caparica, Portugal; <sup>7</sup>UEIPSA-INIAV, Pólo de Santarém, 2005-048 Vale de Santarém, Portugal; <sup>8</sup>CEBAL/IPBeja, 7801-908 Beja, Portugal

\* [ccp@uevora.pt](mailto:ccp@uevora.pt)

### INTRODUÇÃO

*Cynara cardunculus* L., vulgarmente conhecido por cardo, pertence à família *Asteraceae*, cresce abundantemente em solos secos, pedregosos e não cultivados, em diversas regiões da Bacia Mediterrânica, de onde é nativa (Barracosa, Oliveira, Barros, & Pires, 2018; Correia et al., 2016; Sousa & Malcata, 1997). A expansão de *Cynara cardunculus* L. remete para regiões onde o extrato dos pistilos da flor da planta tem sido utilizado com sucesso no fabrico de queijos tradicionais de ovelha, e que de acordo com a regulamentação, a sua utilização é obrigatória para que a maioria dos queijos sejam identificados como DOP - Denominação de Origem Protegida (Barracosa et al., 2018; Roseiro, Barbosa, Ames, & Wilbey, 2003a), conferindo características de textura e sensoriais únicas.

Estes queijos são normalmente fabricados em pequenas queijarias locais, pelo que a valorização deste produto através da utilização do extrato aquoso de *Cynara cardunculus* L. desempenha um papel muito importante para o seu desenvolvimento socioeconómico das populações (Almeida & Simões, 2018; Pinheiro, 2002; Roseiro et al., 2003a). Como exemplo de um queijo obtido por esgotamento da coalhada após coagulação do leite cru de ovelha, por ação do extrato aquoso de *Cynara cardunculus* L., temos o Queijo Serra da Estrala, Queijo de Nisa, Queijo de Azeitão, o Queijo de Évora e o Queijo Serpa. O Queijo Serpa é definido como um queijo curado, de pasta semimole, amanteigada, com

poucos ou nenhuns olhos e que é proveniente de uma região demarcada (Decreto Regulamentar n.º 39/87 de 29 de junho).

Durante a maturação dos queijos, ocorre a proteólise, considerada o processo bioquímico mais importante, uma vez que desempenha um papel fundamental no desenvolvimento da textura, assim como dos atributos olfato gustativos do queijo, sendo objeto de estudo de vários autores o efeito do *Cynara cardunculus* L. nas características do queijo. (Delgado, Rodríguez-Pinilla, González-Crespo, Ramírez, & Roa, 2010; Fox, 1989; Ordiales et al., 2013; Roseiro et al., 2003a; Roseiro, Wilbey, & Barbosa, 2003; Sousa, Ardö, & McSweeney, 2001; Sousa & Malcata, 2002)

É comum dividir a proteólise em proteólise primária e proteólise secundária, sendo a primária a hidrólise das caseínas em cadeias polipeptídicas de maiores dimensões, as quais são insolúveis em água, e em cadeias polipeptídicas de menor tamanho, que constituem os péptidos solúveis em água. Isto acontece principalmente pela ação das protéases aspárticas, essencialmente cardosinas A e B, presentes no agente coagulante, e numa menor extensão pelos plasmídeos constituintes do leite. A proteólise secundária diz respeito à degradação dos compostos proteicos pelas enzimas residuais do agente coagulante utilizado e por enzimas de culturas secundárias, que se desenvolvem durante o processo de maturação, que resulta nos pequenos péptidos e aminoácidos solúveis, como se encontra representado na Figura 1 (Fox, 1989; Hynes et al., 2001; Rank, Grappin, & Olson, 1985; Sousa et al., 2001).

O objetivo deste estudo foi avaliar a proteólise, ao longo da maturação, do Queijo Serpa, fabricado com o extrato aquoso de três populações de *Cynara cardunculus* L., considerando o perfil de degradação das caseínas e os índices de extensão de proteólise.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Três populações de *Cynara cardunculus* L. foram recolhidas de três campos na região do Alentejo. Os pistilos da flor foram cortados, secos e preservados até à sua utilização no fabrico do queijo. No dia anterior à sua utilização, os pistilos foram colocados em água e posteriormente macerados e filtrados, dando origem a um líquido acastanhado (extrato aquoso). Os queijos foram fabricados numa queijaria da região de produção do Queijo Serpa, e o fabrico seguiu as práticas tradicionais da queijaria. Três cubas de leite foram coaguladas com o extrato de três populações de *Cynara cardunculus* L. (C1, C2 e C3), e uma quarta cuba com agente coagulante controlo (Coagulante Animal – CA: 80%

quimosina, 20% pepsina). Quatro queijos foram selecionados aleatoriamente de cada cuba, durante três fases de maturação (1, 14 e 35 dias), perfazendo 48 amostras.

Após a extração das caseínas de acordo com o método descrito em Ordiales *et al.*, (2013), as caseínas foram analisadas por eletroforese em géis de poliacrilamida com ureia (ureia-PAGE), como descrito por Andrews (1983) com as modificações por Veloso *et al.* (2002). O azoto total (TN) foi determinado de acordo com o método AOAC (1990), o azoto solúvel (WSN) foi quantificado de acordo com o método de Kuchroo & Fox, (1982) e o azoto solúvel em ácido tricloroacético a 12% (TCASN-12%) de acordo com Freitas *et al.* (1997), sendo posteriormente analisados pelo método micro-Kjeldahl (m-K). Foi calculado o índice de extensão de proteólise (IEP), pela razão entre o WSN e TN; e o índice de profundidade de proteólise (IPP) pela razão entre TCASN-12% e TN (Alvarenga, Canada, & Sousa, 2011; Fernández-Salguero & Sanjuán, 1999).

A análise estatística dos resultados foi feita com o software SPSS, versão 24, e com o software Rstudio, versão 1.1.383, sendo estabelecido um intervalo de confiança de 95%. Todas as variáveis foram analisadas de modo a garantir os pressupostos de normalidade, independência e homocedasticidade, realizando-se neste caso uma análise de variância segundo o modelo ANOVA, utilizando o teste Tukey HSD para as comparações múltiplas. Quando os pressupostos não se verificaram um Teste Welch foi feito, com Tamhane and Games-Howell para as comparações múltiplas.

Foi utilizado um modelo de regressão linear (LRM) entre os produtos de degradação – variável dependente (pre- $\alpha_s$ -CN e  $\gamma$ -CN) e as caseínas – variável independente ( $\alpha_s$ -CN e  $\beta$ -CN).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pelo método de ureia-PAGE, oito bandas de caseínas foram identificadas (A, B, C, D, E, F, G, H), com diferentes mobilidades eletroforéticas e de acordo com a bibliografia consultada (Fernández-Salguero & Sanjuán, 1999; Marcos, Esteban, León, & Fernández-Salguero, 1979) foi possível classificar em quatro zonas de bandas de caseínas (CN):  $\gamma$ -CN,  $\beta$ -CN,  $\alpha_s$ -CN e pré- $\alpha_s$ -CN, ordenadas da menor para a maior mobilidade electroforética (Figura 2).

Ao longo da maturação, verificou-se uma degradação da  $\beta$ -CN e a  $\alpha_s$ -CN resultando, respetivamente as frações  $\gamma$ -CN e pré- $\alpha_s$ -CN. Os queijos fabricados com *C. cardunculus* L. apresentaram uma maior degradação de ambas as caseínas, verificando-se uma

superior degradação da  $\alpha$ -CN (47,61%) relativamente da  $\beta$ -CN (24,27%) entre os 1 e os 35 dias. Estes resultados estão de acordo com o observado por Delgado *et al.* (2010), Fernández-Salguero e Sanjuán, (1999), Freitas e Malcata (1996), Nuñez, Pozo, Rodríguez-Marin, Gaya, e Medina (1991).

Como pode ser observado no Quadro 1, os resultados obtidos pelo LRM demonstram que a relação entre as  $\alpha_s$ /pré- $\alpha_s$ , foi superior nos queijos fabricados com CA comparativamente aos queijos fabricados com *C. cardunculus* L.. O mesmo não aconteceu com a relação  $\beta/\gamma$ , sendo esta mais fraca, em especial nos queijos fabricados com CA. Os valores obtidos de  $R^2$  dos produtos da degradação da  $\alpha_s$ -CN e  $\beta$ -CN vem corroborar os resultados anteriores, e a fraca relação da  $\beta/\gamma$  pode evidenciar não só o aparecimento, não só de outras frações insolúveis, mas também o aumento do nível de péptidos solúveis como produtos da hidrólise das mesmas ao longo da maturação (Delgado *et al.*, 2010; Ordiales *et al.*, 2013).

O IEP aumentou ao longo da maturação, no entanto apenas a partir dos 14 dias é que os queijos fabricados com CA se diferenciam, com valores significativamente inferiores (Figura 3). Aos 35 dias de maturação, os resultados demonstram um IEP superior nos queijos fabricados com C1 (33,98%), C2 (32,35%) e C3 (42,00%) comparativamente com os queijos fabricados com CA (16,49%), resultados estes consistentes com os obtidos por outros autores noutras variedades de queijo (Fernández-Salguero & Sanjuán, 1999; Nuñez *et al.*, 1991). De acordo com Fox (1989), a extensão da proteólise é um fator indicativo da proteólise primária que ocorre principalmente pela ação do agente coagulante residual, sobre a  $\alpha_s$ -CN e numa menor escala sobre a  $\beta$ -CN, originando os péptidos de alto e médio peso molecular, enquanto a extensão da proteólise depende das enzimas do agente coagulante, o grau de profundidade da proteólise depende das enzimas microbianas que hidrolisam os péptidos resultados da ação do agente coagulante (Fox, 1989), sendo deste modo um indicador da proteólise secundária (Pereira, Gomes, Gomes, & Malcata, 2008). A partir dos 14 dias de maturação, o IPP apresenta-se significativamente superior nos queijos fabricados com *C. cardunculus* L. e aos 35 dias de maturação, os queijos fabricados com C3 (8,31%) apresentam uma profundidade de proteólise significativamente superior, quando comparados aos queijos fabricados com CA (6,71%) (Figura 3).

Em conclusão, os resultados obtidos demonstram uma proteólise superior nos queijos obtidos fabricados com o extrato aquoso obtido a partir das três populações de *C. cardunculus* L. (C1, C2 e C3), que se traduz numa degradação da  $\alpha_s$ -CN e  $\beta$ -CN,

apresentando esta última caseína uma maior resistência à degradação. Pelo LRM verificou-se uma maior relação entre a  $\alpha_s$ -CN e o produto da sua degradação, as pré- $\alpha_s$ -CN, em especial nos queijos fabricados com CA, pelo que o modelo pode ser utilizado como forma de estimar as pré- $\alpha_s$ -CN noutras fases de maturação.

Os queijos fabricados com *C. cardunculus* L. apresentaram uma extensão da proteólise significativamente superior aos queijos fabricados com agente coagulante animal, e numa menor extensão da profundidade da proteólise. Estes resultados demonstram que a hidrólise dos produtos da degradação das caseínas depende do agente coagulante utilizado, e numa menor extensão dos microrganismos presentes que desempenham um papel na formação dos pequenos péptidos, vindo desta forma diferenciar o agente coagulante *C. cardunculus* L. o fabrico de queijos DOP.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, CM e Simões, I, 2018. Appl Microbiol Biotechnol 102: 4675–4686. Alvarenga, N, Canada, J e Sousa, I, 2011. J Dairy Res 78: 80–87. Barracosa, P, Oliveira, J, Barros, M e Pires, E, 2018. Genet Resour Crop Evol 65(1): 17–28. Correia, P, Vítor, A, Tenreiro, M, Correia, AC, Madanelo, J e Guiné, R, 2016. Nutr Food Sci 46(4): 458–475. Delgado, FJ, Rodríguez-Pinilla, J, González-Crespo, J, Ramírez, R e Roa, I, 2010. Int J Food Sci Technol 45(3): 512–519. Fernández-Salguero, J e Sanjuán, E, 1999. Food Chem 64: 177–183. Fox, PF, 1989. J Dairy Sci. Freitas, AC e Malcata, FX, 1996. Dairy J 6: 1099–1116. Hynes, ER, Meinardi, CA, Sabbag, N, Cattaneo, T, Candioti, MC e Zalazar, CA, 2001. J Dairy Sci, 84(6): 1335–1340. Kuchroo, CN e Fox, PF, 1982. Milchwissenschaft 37: 331–335. Marcos, A, Esteban, MA, León, F e Fernández-Salguero, J, 1979. J Dairy Sci. Nuñez, M, Pozo, B, Rodríguez-Marin, M, Gaya, P e Medina, M, 1991. J Dairy Res 58(4): 511–519. Ordiales, E, Benito, MJ, Martin, A, Fernández, M, Hernández, A e Córdoba, MDG, 2013. J Dairy Res 80: 429–438. Pereira, I, Gomes, EO, Gomes, AMP e Malcata, FX, 2008. Food Chem 108: 862–868. Pinheiro, CMSC, 2002. Contributo para a caracterização do queijo de ovelha produzido na região de Évora: Aspectos químicos, bioquímicos do leite obtido em diferentes sistemas de produção e físico-químicos, bioquímicos, tecnológicos e organolépticos do queijo. Universidade de Évora. Rank, TC, Grappin, R e Olson, NF, 1985. J Dairy Sci 68(4): 801–805. Roseiro, LB, Barbosa, M, Ames, JM e Wilbey, RA, 2003a. Int J Dairy Technol 56(2): 76–85. Roseiro, LB, Wilbey, RA e Barbosa, M, 2003b. Lait 83(4): 469–481. Sousa, Ardö e McSweeney, 2001. Int Dairy J 11: 327–345. Sousa, MJ e Malcata, FX, 1997. Enzyme Microb Technol 22(5): 305–314.

Sousa, MJ e Malcata, FX, 2002. Lait 82: 151–170. Veloso, ACA, Teixeira, N e Ferreira, IMP, 2002. J Chromatogr 967: 209–218.

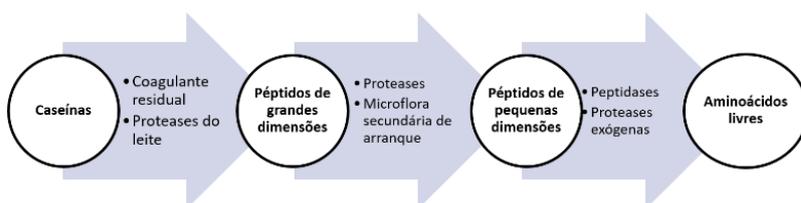
**Agradecimentos:**

Este trabalho foi financiado por Fundos FEDER através do Programa Alentejo 2020 no âmbito do projeto ValBioTecCynara – Valorização Económica do Cardo (*Cynara cardunculus*): variabilidade natural e suas aplicações biotecnológicas (ALT20-03-0145-FEDER-000038). Os autores agradecem à FCT – Fundação para a ciência e Tecnologia pelo apoio financeira ao centro de investigação ICAAM (FCT UID/AGR/00115/2013).

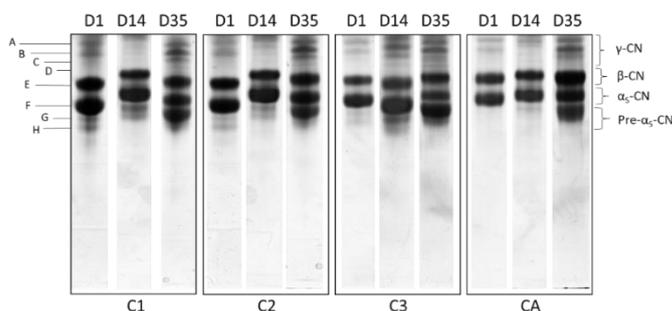
Quadros 1. Coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e níveis de significância obtidos pelo LRM (, para os queijos fabricados com diferentes agentes coagulantes (C1, C2, C3 e CA).

	C1	C2	C3	CA
$\alpha_s$ / pré- $\alpha_s$	0,914***	0,845***	0,875***	0,988***
$\beta$ / $\gamma$	0,423**	0,323*	0,362**	0,013

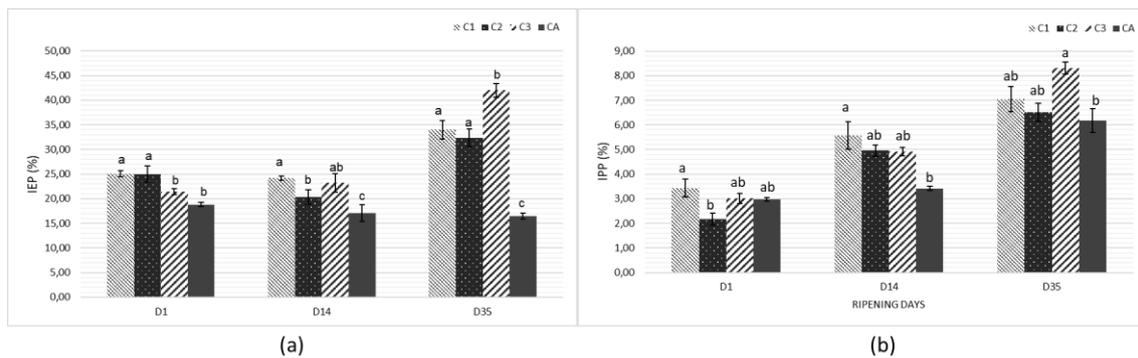
Legenda: \*\*\* P < 0,001, \*\* P < 0,05, \* P < 0,1



**Figura 1.** Agentes potenciadores da proteólise durante a maturação do queijo. Adaptado de Sousa *et al.* (2001).



**Figura 2.** Perfil de caseínas do Queijo Serpa ao longo da maturação (1, 14 e 35 dias) para os quatro agentes coagulantes (C1, C2, C3 e CA), e respetiva identificação de bandas proteicas (A-H) e de zonas de caseínas ( $\gamma$ -CN,  $\beta$ -CN,  $\alpha_s$ -CN e pré- $\alpha_s$ -CN).



**Figura 3.** Evolução do índice de extensão da proteólise (IEP) (a) e do índice de profundidade da proteólise (IPP) (b) dos quatro queijos (C1, C2, C3 e CA) ao longo da maturação (D1, D14 e D35).

### **CYNARA CARDUNCULUS. L. AQUEOUS EXTRACT EFFECT ON DEGRADATION, HYDROLYSIS AND CASEIN PROFILE OF SERPA CHEESE**

#### **ABSTRACT:**

The effect of *Cynara cardunculus* L. aqueous extracts (C1, C2, C3) was studied on Serpa PDO cheese proteolysis, during maturation (D1, D14, D35). Proteolysis was assessed by polyacrylamide gel electrophoresis with urea and by Kjeldahl methods. A casein profile pattern was found, and results showed a higher  $\alpha_s$ -CN degradation than  $\beta$ -CN. Results ( $R^2 \geq 80\%$ ) showed, that a linear regression model can be used to predict the degradation product of  $\alpha_s$ -CN, the pre- $\alpha_s$ -CN during more ripening phases. Casein hydrolysis was found to be more extensive in cheeses made using *Cynara cardunculus* L., which was confirmed by the higher levels of IEP during maturation on these cheeses. On the other hand, the degree of proteolysis in terms of IPP was similar in cheese produced using vegetable or animal coagulant. The evaluation of Queijo Serpa proteolysis and the deduction, through a LRM, of the  $\alpha_s$ -CN degradation products can be a way to add some value to the use of *Cynara cardunculus* L. in cheesemaking and to a socioeconomic valorization.

**Keywords:** *Cynara cardunculus* L; Queijo Serpa; caseins; proteolytic index.